

БИО ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

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

Том 19, № **4**
Октябрь – декабрь 2019



BIOp Preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment

В НОМЕРЕ

Применение биомедицинских клеточных продуктов для лечения онкологических заболеваний

Разработка ортотопической модели глиобластомы мыши с использованием клеточной линии GLi-261

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 — 0,448.

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, № 4
Октябрь — декабрь 2019

BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie
[**BIO**preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]

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

Volume 19, No. 4
October — December 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, д-р мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Амвросьева Тамара Васильевна, д-р мед. наук, проф., РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь)

Бакулин Михаил Константинович, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» Минздрава России (Москва, Россия)

Волчков Виктор Евгеньевич, д-р мед. наук, проф., Лионский университет I имени Клода Бернара (Лион, Франция)

Воробьева Мая Сергеевна, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

Дармов Илья Владимирович, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Дегтярев Сергей Харитонович, д-р биол. наук, проф., НПО «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия)

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Москва, Россия)

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Мовсисянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Пашенко Юрий Иванович, д-р биол. наук, проф., ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф., ООО «МБЦ «Генериум» (Вольгинский, Владимирская область, Россия)

Чумаков Константин Михайлович, д-р биол. наук, Центр оценки и изучения биологических препаратов, FDA (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР ПЕРЕВОДА

Губарева Ольга Николаевна, канд. филол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Дятлов Иван Алексеевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, Московская область, Россия)

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, проф., академик РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Москва, Россия)

Кутырев Владимир Викторович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, Россия)

Львов Дмитрий Константинович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Михайлов Михаил Иванович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, Россия)

Покровский Валентин Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия)

Савченко Валерий Григорьевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Учайкин Василий Федорович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, Ассоциация педиатров-инфекционистов (Москва, Россия)

Хаитов Рахим Мусаевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Лебединская Елена Владимировна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКТОР

Шестакова Алина Павловна, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (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, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate,
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITORS-IN-CHIEF

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Tamara V. Amvrosyeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

Mikhail K. Bakulin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning (Moscow, Russia)

Viktor E. Volchkov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Claude Bernard Lyon 1 University (Lyon, France)

Maya S. Vorobieva, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Ilya V. Darmov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Sergey Kh. Degtyarev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., SibEnzyme Ltd (Novosibirsk, Russia)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Chumakov FSC R&D IBP RAS (Moscow, Russia)

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Yuri I. Pashchenko, Dr. Sci. (Biol.), Prof., 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Oblast, Russia)

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., International Biotechnology Center «Generium» (Volginsky, Vladimir Oblast, Russia)

Konstantin M. Chumakov, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Center for Biologics Evaluation and Research, FDA (Silver Spring, Maryland, USA)

EXECUTIVE EDITOR

Vladimir I. Klimov, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

TRANSLATION EDITOR

Olga N. Gubareva, Cand. Sci. (Philology), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corr. Member of RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Oblast, Russia)

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya FRCM (Moscow, Russia)

Ivan A. Dyatlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, FBIS SRCAMB (Obolensk, Moscow Oblast, Russia)

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Vladimir V. Kutyrev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» (Saratov, Russia)

Dmitry K. Lvov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya FRCM (Moscow, Russia)

Nikolay V. Medunitsyn, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Mikhail I. Mikhaylov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Valentin I. Pokrovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Central Research Institute for Epidemiology (Moscow, Russia)

Valery G. Savchenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, National Research Center for Hematology (Moscow, Russia)

Vasily F. Uchaykin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Association of Pediatric Infectiologists of Russia (Moscow, Russia)

Rakhim M. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia (Moscow, Russia)

SCIENCE EDITORS

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Elena V. Lebedinskaya, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

EDITOR

Alina P. Shestakova, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

БИОПРЕПАРАТЫ

Том 19, № 4
Октябрь — декабрь 2019

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Применение биомедицинских клеточных продуктов для лечения онкологических заболеваний**
Е. А. Устюгова, М. В. Савкина, А. А. Горяев, В. П. Бондарев, В. А. Меркулов, Е. В. Мельникова 206
- Эффективность и безопасность вакцин для профилактики ротавирусной инфекции**
В. А. Шевцов, Е. Э. Евреинова, И. Н. Индикова, Л. М. Хантимирова, Д. В. Горенков,
А. В. Рукавишников 215
- Терапия генетических заболеваний: актуальные направления разработки биомедицинских клеточных продуктов**
О. А. Рачинская, М. А. Водякова, Е. В. Мельникова, В. А. Меркулов 225
- Разработка фармакопейных стандартов качества на лекарственные препараты — бактериофаги**
Т. М. Каргина, Е. И. Саканян, Д. С. Давыдов, Р. Л. Парфенюк 233

Оригинальные статьи

- Разработка ортотопической модели глиобластомы мышцы с использованием клеточной линии GLi-261**
А. А. Овсепян, А. А. Борзов, Е. И. Каторкина, Е. О. Анисимова, М. В. Лыков 242
- Применение метода коротких тандемных повторов для аутентификации клеточных линий**
М. Д. Хорольский, И. С. Семенова, Е. В. Мельникова, Ю. В. Олефир 251
- Апробация методики эксклюзионной хроматографии для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей**
Е. Ю. Мишалова, Е. В. Гордеев, В. Н. Лебедев, С. А. Мельников, С. А. Нимирская, С. В. Борисевич 261

Хроника

- Диана Тимофеевна Леви (к 80-летию со дня рождения)** 268

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: 22.11.2019

Формат 60×90/8. Усл. печ. л. 8,5

Бумага мелованная. Печать офсетная

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

CONTENTS

Reviews

The Current Use of Biomedical Cell Products for Cancer Treatment

E. A. Ustyugova, M. V. Savkina, A. A. Goryaev, V. P. Bondarev,
V. A. Merkulov, E. V. Melnikova 206

Vaccine Safety and Efficacy in Preventing Rotavirus Infection

V. A. Shevtsov, E. E. Evreinova, I. N. Indikova, L. M. Khantimirova, D. V. Gorenkov,
A. V. Rukavishnikov 215

Treatment of Genetic Diseases: Current Trends in the Development of Biomedical Cell Products

O. A. Rachinskaya, M. A. Vodyakova, E. V. Melnikova, V. A. Merkulov 225

Elaboration of Pharmacopoeial Quality Standards for Bacteriophage Products

T. M. Kargina, E. I. Sakanyan, D. S. Davydov, R. L. Parfenyuk 233

Original Articles

Development of a Mouse Glioblastoma Orthotopic Model Using the GLi-261 Cell Line

A. A. Ovsepyan, A. A. Borzov, E. I. Katorkina, E. O. Anisimova, M. V. Lykov 242

The Use of Short Tandem Repeat Analysis for Cell Line Authentication

M. D. Khorolsky, I. S. Semenova, E. V. Melnikova, Yu. V. Olefir 251

Experimental Testing of a Size-Exclusion Chromatography Method Used for Evaluation of Molecular Parameters of Equine Anti-Ebola Immunoglobulin

E. Yu. Mishalova, E. V. Gordeev, V. N. Lebedev, S. A. Melnikov, S. A. Nimirskaya, S. V. Borisevich 261

Chronicle

Diana Timofeevna Levi (on the 80th Anniversary) 268

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: November 22, 2019

Format 60×90/8. Conventional printed sheets: 8.5
Enamel-paper. Offset printing

Применение биомедицинских клеточных продуктов для лечения онкологических заболеваний

Е. А. Устюгова^{1,*}, М. В. Савкина¹, А. А. Горяев¹, В. П. Бондарев¹, В. А. Меркулов^{1,2}, Е. В. Мельникова¹

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

В настоящее время онкологические заболевания продолжают оставаться одной из причин смертности населения. Стандартные методы терапии, включая лучевую и химиотерапию, имеют ограниченную эффективность. В связи с этим разработка принципиально новых методов терапии онкологических заболеваний является актуальной задачей. Перспективным и многообещающим подходом считается лечение онкологии с помощью биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), к которым можно отнести adoptивную клеточную терапию и терапию вакцинами на основе дендритных клеток. Цель работы — обзор современных представлений о принципах терапии, а также имеющегося клинического опыта применения клеточных продуктов для лечения онкологических заболеваний. В работе представлены данные клинического применения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL-терапия), генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих специфические к опухолевым антигенам рецепторы (TCR/CAR-T-терапия), а также дендритно-клеточных вакцин. Применение *ex vivo* модифицированных клеток иммунной системы человека является новым подходом и имеет большие перспективы для лечения онкологических заболеваний. Представленные основные направления adoptивной клеточной терапии, базирующиеся на использовании генетически модифицированных Т-лимфоцитов, имеют различные преимущества и недостатки. В работе рассмотрены способы получения БМКП, приведены данные по эффективности применения adoptивной клеточной терапии и вакцин на основе дендритных клеток. Отдельное внимание уделено проблемам, связанным с безопасностью каждого метода терапии, а также другим факторам, ограничивающим применение данных терапевтических подходов в клинической практике. Ожидается, что дальнейшие исследования будут направлены на повышение эффективности и снижение побочных реакций при терапии БМКП.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные продукты; клеточная терапия; онкологические заболевания; adoptивная клеточная терапия; дендритные клетки; модифицированные Т-клетки; химерный антигенный рецептор; дендритно-клеточная вакцина

Для цитирования: Устюгова ЕА, Савкина МВ, Горяев АА, Бондарев ВП, Меркулов ВА, Мельникова ЕВ. Применение биомедицинских клеточных продуктов для лечения онкологических заболеваний. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):206–214. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-206-214>

Контактное лицо: Устюгова Екатерина Александровна; ustugova@expmed.ru

The Current Use of Biomedical Cell Products for Cancer Treatment

E. A. Ustyugova^{1,*}, M. V. Savkina¹, A. A. Goryaev¹, V. P. Bondarev¹, V. A. Merkulov^{1,2}, E. V. Melnikova¹

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

Cancer remains one of the leading causes of death. Conventional treatment methods, including radiation and chemotherapy, have limited effectiveness. Therefore, the development of novel approaches to cancer treatment is an urgent challenge. Biomedical cell products (BMCPs) which include adoptive cell therapy (ACT) and dendritic cells vaccines (DCVs) are considered a promising area of research. The aim of the study was to review current ideas about the principles of BMCP therapy, as well as clinical experience with cell-based products used for cancer treatment. The paper summarises the results of clinical use of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL-therapy), genetically modified T-cells that express tumour antigen-specific receptors (TCR/CAR T-therapy), as well as DCVs. The use of human immune cells genetically modified *ex vivo* is a novel and promising approach to cancer treatment. The main analysed ACT approaches which are based on the use of genetically modified T-lymphocytes have some benefits and drawbacks. The paper discusses the methods of BMCP production, provides data on

the effectiveness of ACT and DCVs. It pays special attention to safety concerns associated with each treatment method, as well as to other factors limiting their clinical use. It is expected that the main areas of further research will be aimed at increasing BMCP efficacy and reducing adverse reactions.

Key words: biomedical cell products; cell-based therapy; cancer; adoptive cell therapy; dendritic cells; genetically modified T cells; chimeric antigen receptor; dendritic cell vaccine

For citation: Ustyugova EA, Goryaev AA, Savkina MV, Bondarev VP, Merkulov VA, Melnikova EV. The current use of biomedical cell products for cancer treatment. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):206–214. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-206-214>

Corresponding author: Ekaterina A. Ustyugova; ustugova@expmed.ru

На сегодняшний день установлено, что заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний постоянно растут. По оценкам Международного агентства по изучению рака ВОЗ, в 2018 г. в мире было зарегистрировано около 18,1 млн новых случаев и 9,6 млн смертей в результате онкологических заболеваний [1]. В России в 2017 г. впервые выявлено около 540,9 тыс. онкобольных, смерть в результате заболевания наступила у 290,7 тыс. человек [2]. Одним из важных направлений предотвращения смертности от онкологических заболеваний является разработка новых и эффективных методов лечения, в том числе инновационных методов иммунотерапии, так как традиционные методы лечения рака (хирургия, химио- и лучевая терапия) имеют ограниченную эффективность, в особенности для пациентов на поздних стадиях заболеваний. Также химио- и лучевая терапия часто вызывают значительные побочные эффекты, снижая качество жизни пациентов. Успех терапии, основанной на применении моноклональных антител, ингибирующих контрольные точки иммунного ответа, например CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) и PD-1 (Programmed cell death 1; CD279), привел к тому, что иммунотерапия заняла ведущее направление в разработке новых методов лечения рака. К особому виду иммунотерапии относится применение культивированных жизнеспособных клеток человека, так называемых биомедицинских клеточных продуктов (БМКП). С учетом последних технологических достижений клеточной и молекулярной биологии применение БМКП является наиболее перспективным и многообещающим.

В данной работе рассмотрены современные подходы и направления создания БМКП с использованием лимфоцитов и дендритных клеток для лечения онкологических заболеваний, а также приведена сравнительная оценка их эффективности и безопасности. Цель работы — обзор современных представлений о принципах терапии, а также рассмотрение имеющегося опыта клинического применения клеточных продуктов для лечения онкологических заболеваний.

Применение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL-терапия)

Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из Т-лимфоцитов и NK-клеток (Natural killer cells), которые естественным образом мигрируют к опухоли и распознают специфические опухолевые антигены посредством Т-клеточных рецепторов (T-cell receptor, TCR). Установлено, что присутствие TILs в опухолевых очагах связано с благоприятным прогнозом при различных типах онкологических заболеваний [3, 4]. Первое применение TILs было предпринято в 1988 г., когда пациентам вводили опухолеспецифические Т-лимфоциты, предварительно выделенные из опухолевого очага и размноженные *ex vivo* [5]. В настоящее время TILs выделяют из резецированного опухолевого материала, после чего их культивируют и вводят тому же пациенту (рис. 1), пред-

варительно прошедшему курс химиотерапии с целью лимфодеплеции [6].

Для успешного применения терапии на основе TILs должны быть соблюдены следующие условия: 1) проведена немиелоабляционная лимфодеплеция с целью подавления популяции регуляторных Т-клеток (Tregs); 2) введено достаточно большое количество TILs; 3) после инфузии TILs необходимо введение интерлейкина-2 (ИЛ-2) для более длительной персистенции введенных лимфоцитов *in vivo* [7, 8]. Помимо этого, опухоль у пациентов должна быть доступна и операбельна.

Преимущество терапии на основе TILs заключается в их способности распознавать широкий спектр опухолевых антигенов. Несколькими исследователями была подтверждена способность TILs распознавать опухолевые неоантигены, возникшие в результате мутаций [9, 10]. Считается, что именно специфичные к опухолевым неоантигенам TILs играют ключевую роль в регрессии опухоли. Кроме того, это объясняет факт низкой токсичности TIL-терапии, возникающей в результате «атаки» здоровых тканей, экспрессирующих опухолевые антигены. В связи с этим предполагается, что TIL-терапия более эффективна при лечении опухолей, характеризующихся высоким уровнем мутаций, включая меланому и мелкоклеточный рак легких, а также опухолей с нарушением процесса репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, такими как опухоли вирусного происхождения (рак шейки матки, рак шеи и головы, ассоциированный с вирусом папилломы).

Как и в случае с другими видами adoptивной клеточной терапии (АКТ), получение клеточного продукта для TIL-терапии остается трудоемким и дорогостоящим процессом. Иссеченный образец опухоли разделяют на фрагменты, каждый из которых отдельно обрабатывают ферментами с целью получения суспензии индивидуальных клеток (клетки опухоли и лимфоциты). В присутствии ИЛ-2 происходит экспансия лимфоцитов и уничтожение опухолевых клеток в течение 3–5 недель. Далее проводят селекцию TILs на основании их способности к опухолеспецифичной секреции интерферона- γ и цитотоксичности [11]. После чего отобранные изоляты TILs используют для получения конечного продукта для инфузии, что занимает еще две недели. В результате проведенных манипуляций получают суспензию клеток с концентрацией до $2 \cdot 10^{11}$ Т-лимфоцитов [12]. Однако существуют способы ускоренного получения TILs, при которых сокращают начальную фазу экспансии до двух недель и минуют стадию селекции, используя «неотобранные TILs» для получения конечного продукта. При использовании данного метода получения TILs общий ответ на лечение в клинических исследованиях (КИ) с участием пациентов с меланомой был сравним с ответом, полученным при использовании TILs, приготовленных с включением стадии селекции [13, 14]. Установлено, что такие параметры, как количество Т-лимфоцитов в суспензии, количество и процентное содержание CD8⁺ клеток, коррелировали с клиническим ответом [15].

Применение TIL-терапии, главным образом, было изучено в КИ с участием пациентов с поздними стадиями меланомы при

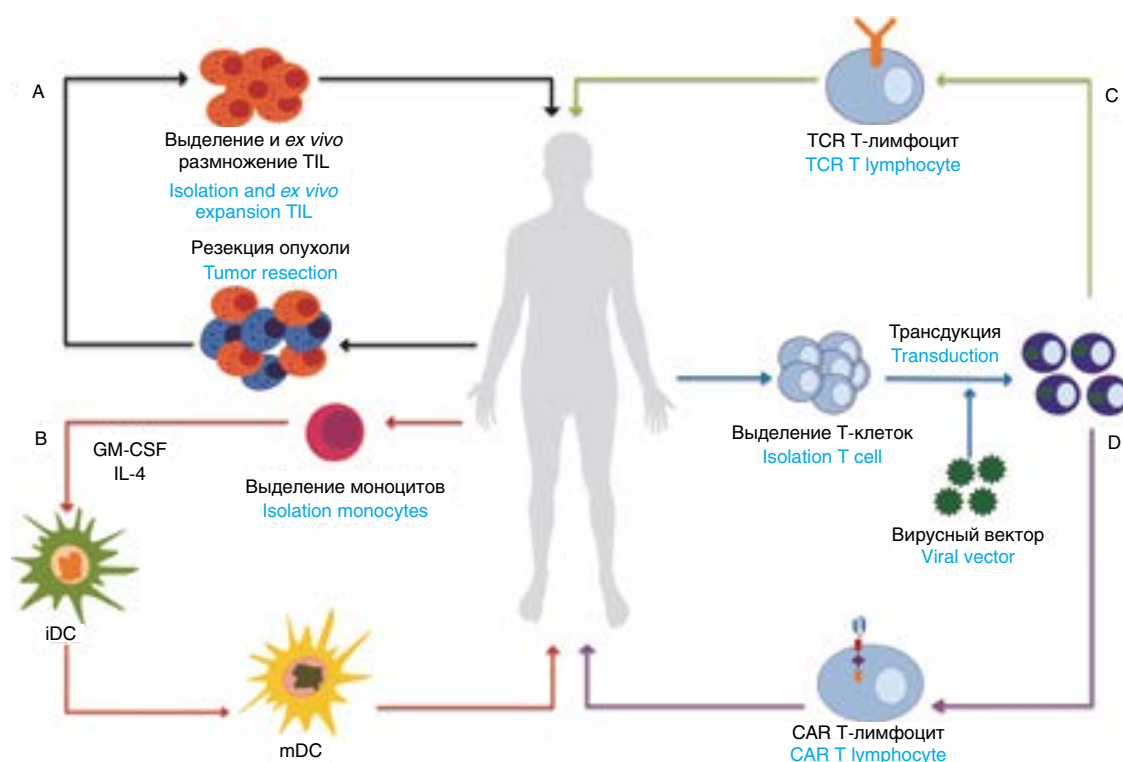


Рис. 1. Схема создания препаратов адоптивной клеточной терапии и дендритно-клеточных вакцин (по M.W. Rohaan [6] с изменениями). А — TIL-терапия; выделенные из опухоли после ее резекции TILs культивируют *ex vivo*, после чего их вводят тому же пациенту; В — вакцины на основе дендритных клеток; моноциты или CD34⁺-клетки, полученные из периферической крови, инкубируют в присутствии GM-CSF и ИЛ-4. Затем полученные незрелые дендритные клетки (iDC) активируют комбинацией цитокинов и нагружают опухолевыми антигенами, и уже «зрелые» дендритные клетки (mDC) вводят в организм пациента; С и D — TCR- и CAR T-терапия; выделенные Т-клетки из периферической крови путем лейкофереза трансдуцируют вирусными векторами для экспрессии TCR (С) или CAR (D) специфичных к опухолевым антигенам.

Fig. 1. Schematic overview of the development of adoptive cell therapy products and dendritic cell vaccines (modified from M.W. Rohaan [6]). A — TIL-therapy; TILs are isolated and expanded *ex vivo* after surgical resection of the tumour. Thereafter, the TILs are injected intravenously to the patient; B — Dendritic cell vaccines; monocytes or CD34⁺ cells are isolated from the peripheral blood and incubated with GM-CSF and IL-4. The resulting immature dendritic cells (iDCs) are activated by a combination of cytokines and loaded with relevant tumor antigens. Subsequently, mature DCs are injected to the patient; C, D — TCR and CAR T-therapy; T cells are isolated from the peripheral blood via leukapheresis. These T cells are then transduced by viral vectors to either express tumour antigen-specific TCRs (C) or CARs (D).

отсутствии у них клинического ответа на проведение стандартной терапии. Объективный ответ на лечение, подтвержденный в нескольких независимых КИ, был достигнут у 40–50 % пациентов, включая случаи полной регрессии опухоли, наблюдавшейся у 10–25 % пациентов [8]. Более того, среди пациентов, достигших полной регрессии опухоли, наблюдаемый клинический ответ на проведение TIL-терапии был длительным [5, 16, 17]. Для сравнения, при лечении меланомы моноклональными антителами, направленными на рецепторы CTLA-4 или PD-1, в качестве монотерапии или в комбинации, полную регрессию опухоли наблюдали от 2,2 до 11,5 % пациентов [18].

Применение TILs связано с проявлением токсичности 3 и 4 категории, что объясняется введением высоких доз ИЛ-2 после введения клеток [5]. Наиболее часто возникающими токсическими явлениями были синдром повышенной проницаемости капилляров, гипотензия и тахикардия. Кроме того, предварительная лимфодеплегия зачастую является причиной развития гематологической токсичности. Однако данные нежелательные реакции были сравнительно легко устранимы.

В связи с риском проявления токсичности и высокой стоимостью терапии необходим поиск надежных биомаркеров и установление прогностических критериев клинического ответа для применения TIL-терапии у ограниченного числа паци-

ентов, у которых возможно получение значимого клинического ответа.

Данные по эффективности применения TIL-терапии при лечении меланомы послужили основанием для продолжения исследований при других типах онкологических заболеваний внутренних органов, таких как рак яичников, рак груди, рак шейки матки, саркома и рак почки [8, 12]. Однако в данном случае эффективность применения TILs оказалась невысокой. Имеется сообщение об успешном применении TILs у пациентов с метастатическим раком шейки матки, не поддающимся лечению химиотерапией и бевацизумабом. В данном случае TILs были отобраны на основании их реактивности в отношении опухолевых антигенов вируса папилломы человека (Е6 и Е7), после чего однократно введены пациентам. Средний возраст пациентов составлял 37 лет (от 18 до 66). Это привело к полной ремиссии заболевания в течение 22 и 15 месяцев у двух пациенток [19].

Использование TIL-терапии ограничено, во-первых, тем, что не всегда имеется возможность сделать резекцию опухоли у пациента. Во-вторых, среди тех пациентов, у которых опухоль была операбельна, не всегда удается получить из нее лимфоциты. В-третьих, если лимфоциты все-таки были получены, то они могут не обладать противоопухолевой активностью.

В связи с этим, несмотря на эффективность и перспективность данного подхода, он не нашел широкого применения в клинической практике.

TCR Т-лимфоциты

TCR (T-cell receptor) — представляют собой мембранные рецепторы Т-клеток, распознающие пептидные антигены, презентруемые клетками организма, в составе главного комплекса гистосовместимости (Major histocompatibility complex, МНС). TCR-терапия подразумевает введение пациенту генетически модифицированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих TCR, специфичные к определенным опухолевым антигенам пациента. Это достигается за счет трансдукции Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, генами опухолеспецифичных TCR в составе лентивирусных или ретровирусных генетических конструкций (рис. 1). Критическим моментом, определяющим эффективность и безопасность данной терапии, является аффинность выбранного TCR в отношении выбранного антигена. Другим важным моментом является встречаемость данного антигена в разных органах и тканях человека. В идеальном случае целевой для TCR антиген должен экспрессироваться только клетками опухоли [8].

Несколько КИ терапии с помощью TCR-модифицированных лимфоцитов было проведено с участием пациентов с меланомой [20, 21], колоректальным раком [22], раком пищевода [23], множественной миеломой [24]. Наибольший успех данного типа АКТ-терапии был достигнут в исследованиях с введением лимфоцитов, экспрессирующих TCR, специфичных к антигенам зародышевых клеток опухоли, таким как ассоциированный с меланомой антиген MAGE-A3 и антиген NY-ESO-1 плоскоклеточного рака пищевода [23, 25]. В исследовании с лимфоцитами, трансфицированными TCR, специфичным к NY-ESO-1 антигену, объективный клинический ответ наблюдали у 4 из 6 пациентов с саркомой и 5 из 11 пациентов с меланомой, что продемонстрировало высокую эффективность данного способа лечения [25].

Так же как и в случае TIL-терапии, пациентам предварительно проводится лимфодеплегация, а после инфузии Т-лимфоцитов вводится высокая доза ИЛ-2. Аналогично TIL-терапии, токсичность при терапии TCR-модифицированными лимфоцитами обусловлена лимфодеплекцией и применением высоких доз ИЛ-2. Кроме того, в результате данной терапии может развиваться опасный для жизни синдром высвобождения цитокинов и возникнуть аутоиммунные реакции [26]. Аутоиммунные реакции возникают в том случае, когда мишени модифицированных TCR-лимфоцитов расположены не только в тканях опухоли, но и присутствуют в здоровых тканях. К примеру, применение лимфоцитов с TCR, специфичными к карциноэмбриональному антигену (Carcinoembryonic antigen, CEA), присутствующему как в тканях опухоли желудочно-кишечного тракта, так и в незначительной степени в здоровых тканях кишечника, приводило к развитию колитов тяжелой степени [22].

Значительным недостатком терапии с помощью TCR Т-лимфоцитов является их токсичность, возникающая вследствие кроссреактивности введенных TCR-рецепторов к схожим мишеням, расположенным вне опухолевых тканей. В частности, было установлено, что TCR, сконструированные к MAGE-A3 (Melanoma-associated antigen 3), были способны распознавать пептидный эпитоп, расположенный в тканях сердца, что в ре-

зультате привело к кардиогенному шоку и смерти пациентов в течение нескольких дней после инфузии [27]. В связи с этим выбор мишени для TCR-терапии должен проводиться с большой осторожностью. К настоящему времени относительно безопасным признан антиген NY-ESO-1, так как терапия анти-NY-ESO-1 TCR Т-клетками продемонстрировала клиническую эффективность, не сопровождавшуюся серьезной токсичностью [25].

CAR Т-лимфоциты

Одним из важных недостатков разработки и применения TCR Т-лимфоцитов является распознавание только процессированных протеасомой антигенов, презентированных в комплексе с МНС класса I. Этого недостатка лишен подход, основанный на генетической модификации Т-клеток генами, кодирующими химерный антигенный рецептор (Chimeric antigen receptor, CAR).

CAR состоят из внеклеточного антигенраспознающего домена (scFv), специфичного к определенному опухолевому антигену, шарнирной области, трансмембранного домена и одного или нескольких внутриклеточных доменов (костимулирующего и/или сигнального, рис. 2). В зависимости от строения внутриклеточного домена CAR делят на 4 поколения: первое поколение содержит только один сигнальный домен CD3ζ, во время как второе или третье поколение помимо CD3ζ содержат костимулирующие домены CD28 и/или 4–1 BB (один домен — 2 поколение, два — 3 поколение), улучшающие пролиферацию, секрецию цитокинов, устойчивость к апоптозу и персистенцию *in vivo*. CAR четвертого поколения, или TRUCKs (T cells redirected for universal cytokine-mediated killing), обладают активностью CAR 2 поколения и способностью к секреции цитокинов (например, ИЛ-12), которые направляют действие иммунных клеток на уничтожение клеток опухоли [28].

К настоящему времени в мире проведено или проводится около 600 КИ¹, большинство которых находятся на ранних стадиях исследований (I и II фазы КИ). По данным F. Arabi с соавт. [29], 57 % всех КИ с использованием CAR Т-лимфоцитов (CAR Т-терапия) приходится на лечение гематологических злокачественных заболеваний, при этом из 17 мишеней основной является CD19 антиген. Выбор в качестве мишени CD19 обусловлен его высокой экспрессией в опухолевых В-клетках, что обусловило успех анти-CD19 CAR Т-терапии при лечении В-клеточных лимфом и лейкозов [30–32].

В 2017 г. на основании проведенного КИ ELIANA, в котором из 63 пациентов 52 (83 %) достигли полной или частичной ремиссии, Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило первую CD19 специфическую CAR Т-терапию для лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) — Kymriah (Novartis Pharmaceuticals Corporation). По результатам КИ JULIET, в котором у 52 % пациентов наблюдали полный или частичный ответ, было одобрено показание Kymriah для лечения рецидивирующей или рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДБКЛ)². Также для лечения ДБКЛ в 2017 г. был одобрен второй препарат — Yescarta (Kite Pharma, Inc.). При исследовании Yescarta в КИ у 51 % пациентов наблюдался полный и у 21 % — частичный ответ³. Несмотря на достигнутые успехи анти-CD19 CAR Т-терапии, основной проблемой при ее применении является высокий риск развития серьезных нежелательных реакций (например, синдром высвобождения цитокинов и нейротоксичность), которые

¹ <https://clinicaltrials.gov/>

² Summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_en.pdf

³ Summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yescarta-epar-product-information_en.pdf

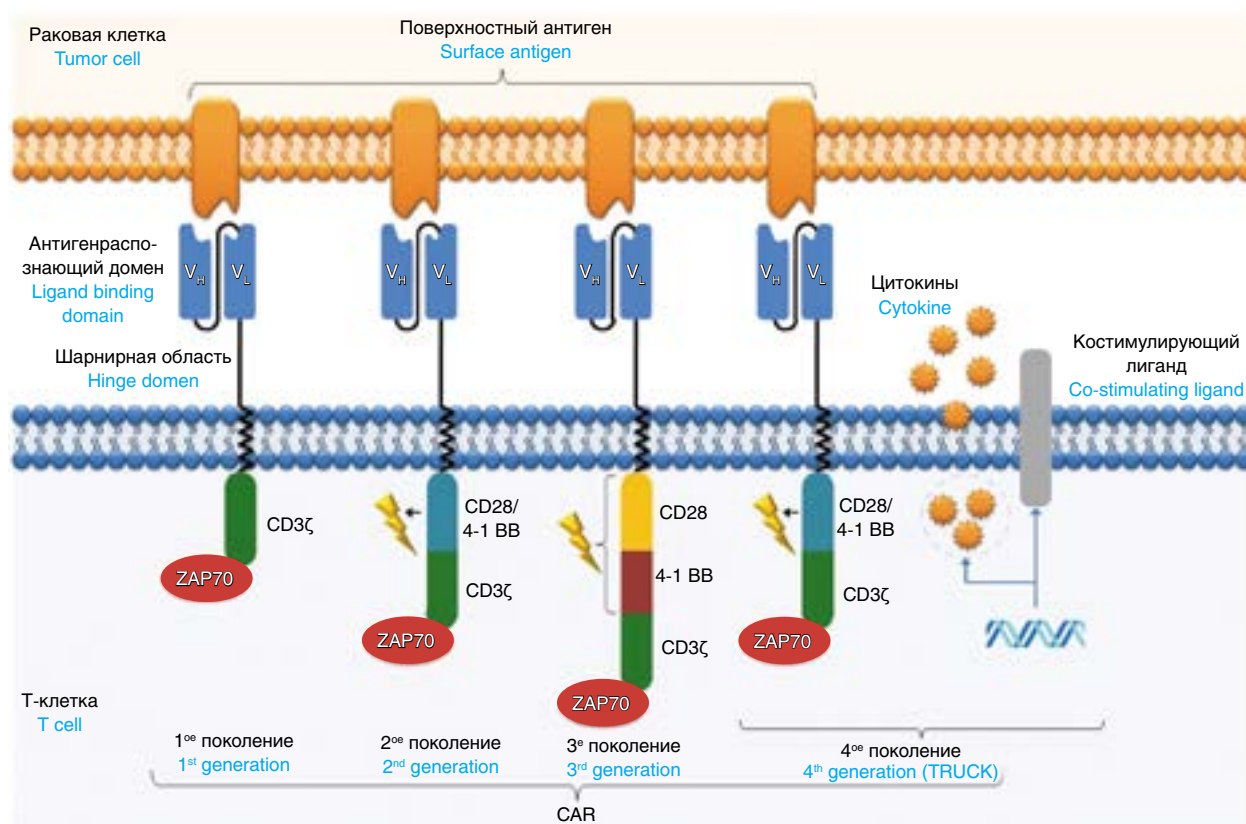


Рис. 2. Строение химерных антигенных рецепторов (CARs) (по J. Hartmann [28] с изменениями). Голубым цветом обозначен связывающийся с лигандом одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), опосредующий распознавание клеток опухоли. V_H и V_L домены scFv связаны посредством трансмембранного домена с внутриклеточным сигнальным доменом. Провоспалительные цитокины или костимулирующие лиганды, экспрессируемые CAR T-клетками, указаны для CAR четвертого поколения.

Fig. 2. Structure of chimeric antigen receptors (CARs) (modified from J. Hartmann [28]). The single-chain variable fragment (scFv) mediating tumor cell recognition is shown in light blue. V_H and V_L domains are connected via a long flexible linker and transmembrane domain to intracellular signaling domains. Pro-inflammatory cytokines or co-stimulatory ligands expressed by the CAR T cells are depicted for the 4th generation.

могут привести к гибели пациента. Другой проблемой, требующей решения, является развитие рецидивов заболевания, связанных с избыточным ростом опухолевых клеток, неэкспрессирующих целевой опухолевый антиген [33].

Несмотря на активные исследования применения CAR T-терапии для лечения солидных опухолей, убедительных данных об эффективности пока нет, возможно, это связано с несколькими причинами: труднодоступность клеток-мишеней солидных опухолей; цитотоксическое и иммуносупрессивное действие микроокружения опухоли; сложность при выборе универсальной и специфичной антигенной мишени [34, 35].

Дендритно-клеточные вакцины

Дендритные клетки (ДК) представляют собой гетерогенную группу антигенпрезентирующих клеток, происходящих из $CD34^+$ стволовых клеток костного мозга. Главная функция ДК в организме заключается в поглощении антигенов посредством фаго- и пиноцитоза, процессинге и последующей презентации антигенов посредством молекул главного комплекса гистосовместимости Т-лимфоцитам. Захваченные антигены процессируются либо по эндогенному пути и презентуются посредством МНС I класса $CD8^+$ Т-лимфоцитам, либо процессируются через экзогенный путь и презентуются посредством МНС II класса $CD4^+$ Т-лимфоцитам [36]. Аналогичным

образом ДК могут захватывать и представлять Т-лимфоцитам опухолевые антигены.

Зрелые ДК мигрируют во вторичные лимфоидные ткани: лимфоузлы, селезенку, Пейеровы бляшки, где происходит их контакт с Т- и В-клетками. Т-лимфоциты посредством TCR-рецепторов узнают специфические антигены, связанные с МНС молекулами на поверхности ДК. Активация Т-лимфоцитов зависит от интенсивности и продолжительности взаимодействия их с ДК. Данные свойства ДК лежат в основе разработки вакцин на их основе для противораковой иммунотерапии [37, 38].

Терапия на основе дендритных клеток включает в себя получение ДК из аутологичных предшественников, «нагрузка» их опухолевыми антигенами и последующее введение в организм пациента с целью индукции высокоспецифичного противоопухолевого иммунного ответа [39, 40]. Стандартный протокол производства вакцин на основе ДК включает в себя следующие стадии.

1) Моноциты, полученные из периферической крови, инкубируют в присутствии гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и ИЛ-4 в течение 5–6 суток.

2) Полученные незрелые ДК подвергают процессу созревания посредством инкубирования в присутствии нескольких провоспалительных цитокинов.

3) На следующей стадии происходит нагрузка ДК опухолевыми антигенами с последующим введением в организм пациента.

Наиболее важными стадиями получения ДК-вакцин являются стадии созревания и нагрузки антигенами. От стадии созревания зависит иммуногенность получаемой ДК-вакцины. В свою очередь, способ нагрузки антигенами дендритных клеток напрямую влияет на способность к презентации антигенов. ДК могут быть подвергнуты экспозиции антигенами в виде пептидов, белков, цельных лизатов убитых опухолевых клеток или стволовых клеток опухоли; либо трансфицированы мРНК или кДНК, кодирующими опухолевые антигены. Нагрузка антигенами также возможна за счет комбинации нескольких методов (обработки лизатами опухолевых клеток и трансфекции мРНК), что позволяет антигенам задействовать оба класса МНС I и II [41]. Установлено, что для более эффективной доставки ДК в периферические лимфоузлы наиболее подходящим способом введения является внутривенный/подкожный или непосредственное введение в лимфатический узел [42].

К настоящему времени проведено около 200 КИ с участием пациентов с меланомой (применено у >1250 пациентов), раком предстательной железы (применено у >750 пациентов), глиомой (применено у >500 пациентов) и почечно-клеточным раком (применено у >250 пациентов) [43]. Большинство этих исследований являются небольшими исследованиями с целью оптимизации иммунологических параметров вакцин и измерения иммунного ответа. Безопасность иммунотерапии на основе ДК-вакцин была подтверждена в многочисленных исследованиях I и II фазы. Наблюдаемые побочные эффекты были относительно умеренными и преходящими. Наиболее частыми проявлениями были реакции в месте введения (боль, покраснение, зуд). Системные реакции включали лихорадку и другие гриппоподобные симптомы. Применение вакцин на основе ДК не вызывало серьезных осложнений со стороны иммунной системы. Таким образом, применение вакцин на основе ДК не приводит к ухудшению качества жизни пациентов с онкологическими заболеваниями.

Несмотря на благоприятный профиль безопасности, применение ДК-вакцин в клинической практике выглядит не очень успешным в связи с их относительно низкой терапевтической эффективностью. В работе S. Anguille [43] проведен систематический анализ опубликованных результатов КИ. В случае меланомы объективный ответ наблюдался у 8,5 % пациентов, что показывало схожую эффективность с дакарбазином. Среди пациентов с раком простаты объективный ответ после применения иммунотерапии на основе ДК наблюдали у 7,1 % пациентов, тогда как при применении традиционной терапии ответ наблюдается у 10 % пациентов. При проведении иммунотерапии у пациентов со злокачественной глиомой ответ наблюдался в 15,6 % случаев, у пациентов с раком почки — 11,5 % [43].

Наиболее убедительным исследованием, демонстрирующим увеличение медианы общей выживаемости, является КИ III фазы IMPACT, в котором была продемонстрирована эффективность препарата Sipuleucel-T для лечения гормонустойчивого рака простаты. В данном исследовании медиана общей выживаемости составила 25,8 мес. в экспериментальной группе и 21,7 мес. в контрольной группе. На основании данного исследования Sipuleucel-T был одобрен FDA, несмотря на то что объективный ответ наблюдался только у <5 % пациентов. В данном исследовании также была подтверждена корреляция между антиген-специфичным иммунным ответом вследствие

введения Sipuleucel-T и увеличением общей выживаемости [44]. В течение трехлетнего наблюдения за пациентами численность выживших пациентов в группе, получавших Sipuleucel-T, была на 50 % больше по сравнению с контрольной группой. В настоящее время Sipuleucel-T, зарегистрированный под торговой маркой Provenge, является единственным препаратом на основе ДК, одобренным FDA.

Клиническая эффективность ДК-вакцин считается неоптимальной [45]. Частично это объясняется тяжелой опухолевой иммуносупрессией и включением в КИ пациентов с прогрессирующим статусом заболевания. Основными способами увеличения эффективности иммунотерапии на основе дендритных клеток являются: 1) усиление иммуностимулирующих свойств препаратов на основе ДК; 2) усиление их эффективности посредством применения в комбинации с другими противоопухолевыми лекарственными препаратами. В настоящее время проводятся КИ с целью увеличения эффективности препарата Sipuleucel-T при применении в комплексной терапии с другими химио- или иммунотерапевтическими лекарственными средствами: с ипилимумабом (NCT01804465), атезолизумабом (NCT03024216), индоксимодом (завершено, NCT01560923), бустерной ДНК-вакциной rTVG-HP (завершено, NCT01706458), радием (NCT02463799), разнообразными способами радиации (NCT02232230, NCT01833208, NCT01818986) и ИЛ-7 (NCT01881867) при лечении рака простаты⁴.

Другим перспективным продуктом, разрабатываемым на основе ДК, является вакцина DCVax-L[®], представляющая собой аутологичные ДК, «нагруженные» опухолевым лизатом, полученным из резецированной глиобластомы [46]. Глиобластома является наиболее агрессивной опухолью у взрослых. Стандартное лечение включает в себя хирургическое удаление с последующей радиотерапией и назначением темозоломида [47]. При этом медиана общей выживаемости составляет 15–17 мес., ≤5 % пациентов переживают пятилетний период. В работе L. M. Liao с соавт. [46] приводятся промежуточные данные, полученные в КИ III фазы с участием 331 пациента, из которых 232 получили вакцину DCVax-L[®]. Медиана общей выживаемости в данном КИ была 23,1 мес. от времени проведения резекции опухоли. Двухлетний период выживания достигли 46,2 % пациентов, трехлетнего — 25,4 % пациентов. Несмотря на то что на данном этапе было подтверждено увеличение продолжительности жизни пациентов, получивших DCVax-L[®], данное КИ продолжается по настоящее время с целью получения более точных данных по выживаемости в разных подгруппах пациентов.

В связи с тем фактом, что объективный ответ на лечение ДК-вакцинами считается неоптимальным, общепринятым мнением является возможность их применения в клинической онкологии в том случае, когда наблюдаются рецидивы заболевания после использования химио-/радиотерапии, ингибиторов иммунных точек (Immune checkpoint inhibitors, ICIs) или при невозможности применения CAR-T терапии. Критериями, косвенно подтверждающими возможность эффективного применения ДК-вакцин, могут быть появление устойчивых к первой и второй линиям терапии опухолевых клеток, низкий иммуногенный потенциал опухоли, низкий уровень TILs. Несмотря на то что в настоящее время соотношение цены и терапевтической эффективности ДК-вакцин является неоптимальным, дальнейшие исследования по оптимизации производства ДК-вакцин и получения препаратов воспроизводимого качества и эффективности могут изменить ситуацию.

⁴ <https://clinicaltrials.gov/>

Заключение

Применение *ex vivo* модифицированных клеток иммунной системы человека является новым подходом и имеет большие перспективы для лечения онкологических заболеваний, что, в частности, подтверждается значительным количеством проводимых КИ. Рассмотренные в статье основные направления адоптивной клеточной терапии, базирующиеся на использовании TILs или генетически модифицированных Т-лимфоцитов, имеют различные преимущества и недостатки. Дальнейшие исследования будут направлены на повышение эффективности и снижение побочных реакций при терапии БМКП. При TCR-терапии важным является поиск новых антигенов, которые будут экспрессироваться только на опухолевых клетках, а также возможность использования неоантигенов в качестве мишеней. Для CAR-терапии в КИ уже исследуются новые модификации, содержащие молекулярные переключатели или гены «самоубийства» с целью контроля терапии и снижения серьезных нежелательных реакций. Терапия ДК-вакцинами является безопасной, однако не отличается высокой клинической эффективностью и может быть применима при невозможности проведения терапии на основе TILs или генно-модифицированных Т-лимфоцитов. Также перспективным направлением является комбинирование методов иммунотерапии с применением традиционных методов лечения онкологических заболеваний, что активно изучается в проводимых КИ.

Несмотря на имеющийся положительный опыт применения БМКП для лечения онкологических заболеваний, в настоящий момент остается много нерешенных проблем как научных, так экономических и регуляторных, решение которых необходимо для успешного внедрения новых методов клеточной терапии.

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 a part of publicly funded research project № 056-00154-19-00 and was supported by Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

Конфликт 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. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Каприна АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ, ред. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018. [Kaprina AD, Starinsky VV, Petrova GV, eds. Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Moscow: Herzen P.A. MNIIOI — a branch of the Federal State Budgetary Scientific Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia; 2018 (In Russ.)]
3. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high

- CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *PNAS*. 2005;102(51):18538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509182102>
4. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–4. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
5. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4550–7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0116>
6. Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen JBAG. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch*. 2019;474(4):449–61. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2484-0>
7. Salas-Benito D, Casares N, Sarobe P, Lasarte JJ, Hervás-Stubbs S. Pre-selection of PD-1⁺ tumor-infiltrating CD8⁺ T cells improves the efficacy of adoptive T-cell therapy. *J Immunol Sci*. 2018;2(1):55–9.
8. Met Ö, Jensen K.M, Chamberlain CA, Donia M, Svane IM. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol*. 2019;41(1):49–58. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0703-z>
9. Lu YC, Yao X, Li YF, El-Gamil M, Dudley ME, Yang JC, et al. Mutated PPP1R3B is recognized by T cells used to treat a melanoma patient who experienced a durable complete tumor regression. *J Immunol*. 2013;190(12):6034–42. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202830>
10. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science*. 2014;344(6184):641–5. <https://doi.org/10.1126/science.1251102>
11. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother*. 2003;26(4):332–42.
12. Andersen R, Borch TH, Draghi A, Gokuldass A, Rana MAH, Pedersen M, et al. T cells isolated from patients with checkpoint inhibitor-resistant melanoma are functional and can mediate tumor regression. *Ann Oncol*. 2018;29(7):1575–81. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy139>
13. Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Hershkovitz L, et al. Clinical responses in a phase II study using adoptive transfer of short-term cultured tumor infiltration lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2010;16(9):2646–55. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0041>
14. Besser MJ, Shapira-Frommer R, Treves AJ, Zippel D, Itzhaki O, Schalmach E, et al. Minimally cultured or selected autologous tumor-infiltrating lymphocytes after a lymphodepleting chemotherapy regimen in metastatic melanoma patients. *J Immunother*. 2009;32(4):415–23. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31819c8bda>
15. Cohen IJ, Blasberg R. Impact of the tumor microenvironment on tumor-infiltrating lymphocytes: focus on breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)*. 2017;11:1178223417731565. <https://doi.org/10.1177/1178223417731565>
16. Andersen R, Donia M, Ellebaek E, Borch TH, Kongsted P, Iversen TZ, et al. Long-lasting complete responses in patients with metastatic melanoma after adoptive cell therapy with tumorinfiltrating lymphocytes and an attenuated IL2 regimen. *Clin Cancer Res*. 2016;22(15):3734–45. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1879>
17. Pilon-Thomas S, Kuhn L, Ellwanger S, Janssen W, Royster E, Marzban S, et al. Efficacy of adoptive cell transfer of tumor-infiltrating lymphocytes after lymphopenia induction for metastatic melanoma. *J Immunother*. 2012;35(8):615–20. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31826e8f5f>

18. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504030>
19. Stevanović S, Draper LM, Langan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol.* 2015;33(14):1543–50. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.9093>
20. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood.* 2009;114(3):535–46. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-211714>
21. Chodon T, Comin-Anduix B, Chmielowski B, Koya RC, Wu Z, Auerbach M, et al. Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20(9):2457–65. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3017>
22. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, Dudley ME, Nathan DA, Feldman SA, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther.* 2011;19(3):620–6. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.272>
23. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother.* 2013;36(2):133–51. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3182829903>
24. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Golubeva O, Vogl DT, Lacey SF, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med.* 2015;21(8):914–21. <https://doi.org/10.1038/nm.3910>
25. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol.* 2011;29(7):917–24. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.2537>
26. Wolf B, Zimmermann S, Arber C, Irving M, Trueb L, Coukos G. Safety and tolerability of adoptive cell therapy in cancer. *Drug Saf.* 2019;42(2):315–34. <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0779-3>
27. Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L, et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood.* 2013;122(6):863–71. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-490565>
28. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med.* 2017;9(9):1183–97. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607485>
29. Arabi F, Torabi-Rahvar M, Shariati A, Ahmadbeigi N, Naderi M. Antigenic targets of CAR T cell therapy. A retrospective view on clinical trials. *Exp Cell Res.* 2018;369(1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.05.009>
30. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood.* 2010;116(20):4099–102. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281931>
31. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368:1509–18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215134>
32. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365(8):725–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103849>
33. Wang Z, Wu Z, Liu Y, Han W. New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):53. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0423-1>
34. Charrot S, Hallam S. CAR-T cells: future perspectives. *HemaSphere.* 2019;3(2):e188. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000188>
35. Long KB, Young RM, Boesteanu AC, Davis MM, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. CAR T cell therapy of non-hematopoietic malignancies: detours on the road to clinical success. *Front Immunol.* 2018;9:2740. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02740>
36. Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P. Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. *Front Immunol.* 2013;4:438. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00438>
37. Garg AD, Vara Perez M, Schaaf M, Agostinis P, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial watch: dendritic cell-based anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2017;6(7):e1328341. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1328341>
38. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* 2017;27(1):74–95. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.157>
39. Anguille S, Smits EL, Bryant C, Van Acker HH, Goossens H, Lion E, et al. Dendritic cells as pharmacological tools for cancer immunotherapy. *Pharmacol Rev.* 2015;67(4):731–53. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009456>
40. Cohn L, Delamarre L. Dendritic cell-targeted vaccines. *Front Immunol.* 2014;5:255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00255>
41. Decker WK, Xing D, Li S, Robinson SN, Yang H, Yao X, et al. Double loading of dendritic cell MHC class I and MHC class II with an AML antigen repertoire enhances correlates of T-cell immunity *in vitro* via amplification of T-cell help. *Vaccine.* 2006;24(16):3203–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.01.029>
42. Draube A, Klein-González N, Mattheus S, Brillant C, Hellmich M, Engert A, von Bergwelt-Baildon M. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(4):e18801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018801>
43. Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):e257–67. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70585-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70585-0)
44. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(5):411–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294>
45. Vandenberk L, Belmans J, Van Woensel M, Riva M, Van Gool SW. Exploiting the immunogenic potential of cancer cells for improved dendritic cell vaccines. *Front Immunol.* 2016;6:663. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00663>
46. Liao LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, et al. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J Transl Med.* 2018;16(1):142. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1507-6>
47. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987–96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Об авторах / Authors

Устюгова Екатерина Александровна, канд. биол. наук. *Ekaterina A. Ustyugova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6553-5303>

Савкина Мария Владимировна, канд. биол. наук. *Maria V. Savkina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

Горяев Артем Анатольевич, канд. биол. наук. *Artem A. Goryaev*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1620-6233>

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф. *Vladimir P. Bondarev*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. *Vadim A. Merkulov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. *Ekaterina V. Melnikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Поступила 04.10.2019

После доработки 28.10.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 4 October 2019

Revised 28 October 2019

Accepted 22 November 2019

Эффективность и безопасность вакцин для профилактики ротавирусной инфекции

В. А. Шевцов, Е. Э. Евреинова*, И. Н. Индикова, Л. М. Хантимирова, Д. В. Горенков, А. В. Рукавишников

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

Ротавирусная инфекция вызывает острый гастроэнтерит и является одной из основных причин приводящей к смерти от тяжелой дегидратирующей диареи у детей младше 5 лет во всем мире. Живые аттенуированные ротавирусные вакцины являются единственным средством профилактики тяжелых форм заболевания. Цель работы — анализ двадцатилетнего опыта иммунопрофилактики ротавирусной инфекции в мире. Представлены результаты анализа эффективности и безопасности при одновременном применении вакцин Rotarix® (Бельгия) и RotaTeq® (США) против ротавирусной инфекции в государствах Европейского региона ВОЗ, Европейского Союза (ЕС) и других стран. Рассмотрены вопросы разработки корреляционных показателей иммунной защиты вакцин, а также экспертная оценка эффективности и безопасности новых вакцин Rotavac® и Rotasil® (Индия) в клинических исследованиях. Проведен анализ мирового опыта их применения в странах, в которых детская смертность от диареи не регистрируется. Обобщены результаты клинических исследований по применению новых вакцин, преквалифицированных ВОЗ в 2018 г., в регионах, в которых регистрируется высокая детская смертность от диареи. Обоснована целесообразность массовой вакцинации. Установлено, что вакцинация не только уменьшает количество случаев госпитализаций иммунизированных детей, но и обеспечивает формирование популяционного иммунитета. Вакцины Rotarix® и RotaTeq® разрешены к применению или включены в национальные календари профилактических прививок многих стран, но вакцинация в большинстве государств не является обязательной. Охват вакцинацией в странах ЕС — 24 %. Для снижения имеющегося риска предназначены альтернативные схемы вакцинации живыми аттенуированными вакцинами на основе штаммов, выделенных от новорожденных детей, а также парентеральными ротавирусными вакцинами, которые не способны к размножению в кишечнике. Сделан вывод о том, что внедрение живых ротавирусных вакцин в календарь профилактических прививок должно сопровождаться изучением частоты возникновения инвагинации тонкого кишечника до и после введения массовой иммунизации и проведением мероприятий по активному фармаконадзору.

Ключевые слова: ротавирусная инфекция; живые аттенуированные вакцины; нереплицирующиеся вакцины; эффективность и безопасность вакцин; инвагинация; популяционный иммунитет

Для цитирования: Шевцов ВА, Евреинова ЕЭ, Индикова ИН, Хантимирова ЛМ, Горенков ДВ, Рукавишников АВ. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики ротавирусной инфекции. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):215–224. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-215-224>

Контактное лицо: Евреинова Елена Эдуардовна; Evreinova@expmed.ru

Vaccine Safety and Efficacy in Preventing Rotavirus Infection

V. A. Shevtsov, E. E. Evreinova*, I. N. Indikova, L. M. Khantimirova, D. V. Gorenkov, A. V. Rukavishnikov

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

The rotavirus infection causes acute gastroenteritis and is a major cause of lethal severe dehydrating diarrhoea in children under 5 years of age worldwide. Live attenuated rotavirus vaccines are the only means of preventing severe forms of the disease. The aim of the study was to analyse the twenty-year international experience of prophylactic immunisation against rotavirus infection. The paper summarises safety and efficacy data on the long-term use of Rotarix® (Belgium) and RotaTeq® (USA) for the prevention of rotavirus infection in the WHO European Region, the European Union and other countries. It addresses the development of correlates of immune protection for vaccines as well as evaluation of efficacy and safety of the new vaccines Rotavac® and Rotasil® (India) in clinical trials. The authors analysed international experience of using the vaccines in countries that do not keep records of infant mortality from diarrhoea. The study summarises the results of clinical studies on the use of new vaccines prequalified by WHO in 2018 in regions with high rates of infant mortality from diarrhoea. It was demonstrated that vaccination not only reduces the rates of hospital admission of immunised children, but also contributes to the development of herd immunity. Rotarix® and RotaTeq® vaccines are authorised or included in the national immunisation schedules of many countries, but this type of vaccination is not mandatory in most of these countries. Vaccination coverage in the EU countries is about 24 %. Alternative vaccination schemes using live attenuated vaccines based on strains derived from newborn children, and parenteral rotavirus vaccines which do not replicate in the intestine may help reduce existing risks. It was concluded that the introduction of live rotavirus vaccines in immunisation schedules should be accompanied by the analysis of incidence of intussusception of the

small intestine before and after the introduction of mass immunisation, and by active pharmacovigilance.

Key words: rotavirus infection; live attenuated vaccine; non-replicating vaccines; efficacy and safety of vaccines; intussusception; herd immunity

For citation: Shevtsov VA, Evreinova EE, Indikova IN, Khantimirova LM, Gorenkov DV, Rukavishnikov AV. Vaccine safety and efficacy in preventing rotavirus infection. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):215–224. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-215-224>

Corresponding author: Elena E. Evreinova; Evreinova@expmed.ru

Ротавирусная инфекция (РВИ) вызывает острый гастроэнтерит и является во всем мире одной из основных причин тяжелой дегидратирующей диареи у детей младше 5 лет¹. Симптомы острого гастроэнтерита при РВИ у детей младше пяти лет включают водянистую диарею, рвоту и лихорадку. Тяжелая форма заболевания вызывает обезвоживание организма и заканчивается смертью. Ротавирус обладает высокой устойчивостью в окружающей среде, распространяется фекально-оральным, капельным или контактным путем передачи. Вакцинация против РВИ предотвращает заболевание и летальный исход, тогда как грудное вскармливание, применение антибиотиков, низкоосмолярных солей для пероральной регидратации (oral rehydration solution, ORS), препаратов цинка облегчают состояние больных. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) предложено деление стран по уровню доходов и регистрируемой смертности, в том числе смертности от диареи среди детей младше пяти лет². ВОЗ рекомендует включение вакцин против РВИ в национальные календари профилактических прививок всех стран. Для стран регионов Южной, Юго-Восточной и Юго-Западной Азии, а также Африки к югу от Сахары, в которых регистрируют высокую детскую смертность от диареи, первоочередное внедрение данных вакцин является обязательным³. Приоритетность включения вакцин против РВИ в национальный календарь профилактических прививок определяется государством в зависимости от уровня регистрируемой детской смертности от диареи, экономических и социальных факторов.

В настоящее время против РВИ применяют живые аттенуированные вакцины. В Европейском Союзе (ЕС) и США с 2006–2008 гг. разрешены к применению вакцины RotaTeq™ (Merck & Co. Inc, США) и Rotarix™ (GlaxoSmithKline, Бельгия). С 2018 г. на международном уровне доступны преквалифицированные ВОЗ вакцины Rotavac™ (Индия) и RotaSiil™ (Индия), эффективность и безопасность которых была подтверждена только в Индии и в странах Африки. В этих странах отличий по эффективности от преквалифицированных ранее вакцин RotaTeq™ и Rotarix™ установлено не было⁴.

По результатам изучения эффективности и безопасности, а также на основании опыта длительного применения живых аттенуированных ротавирусных вакцин RotaTeq™ и Rotarix™, включенных в национальные календари прививок ряда стран, была отмечена их высокая эффективность для снижения дет-

ской смертности от диареи и сделан вывод о превышении пользы над риском при их использовании⁵.

Эффективность применения вакцин в странах, где детская смертность от диареи не регистрируется, определяется на основе изменения статистики заболеваемости тяжелыми формами ротавирусного гастроэнтерита. Основным риском при вакцинации является повышение вероятности инвагинации тонкого кишечника у привитых по сравнению с установленным уровнем идиопатической инвагинации. ВОЗ рекомендованы клинические исследования по оценке идиопатической инвагинации до введения ротавирусных вакцин в национальный календарь прививок и широкие исследования в рамках активного надзора за безопасностью вакцин после начала массовой иммунизации.

Цель работы — обзор двадцатилетнего опыта иммунопрофилактики ротавирусной инфекции в мире. Задачами исследования было изучение актуальных данных по охвату вакцинацией против ротавирусной инфекции в государствах Европейского региона ВОЗ и других странах, публикаций по разработке корреляционных показателей иммунной защиты, безопасности вакцин в клинических исследованиях, а также анализ целесообразности иммунопрофилактики по результатам их длительного применения в различных странах.

Целесообразность иммунопрофилактики ротавирусной инфекции

В соответствии с рекомендациями календаря прививок против РВИ государств ЕС⁶ и с рекомендациями календаря прививок против РВИ в Канаде⁷, календарей прививок в других странах, в которых уровень детской смертности от диареи низкий или не регистрируется, вакцины RotaTeq™ и Rotarix™ могут быть включены в национальные календари профилактических прививок, но их применение не носит обязательного характера. На принятие уполномоченными органами в области здравоохранения положительного решения о целесообразности и обязательности массовой вакцинации существенным образом влияет стоимость и источник финансирования для курса вакцинации, а также вопросы индивидуальной безопасности при иммунизации⁸ [1–8]. На популяционном уровне существуют риски, связанные с возможной недостаточной эффективностью вакцины против новых штаммов ротавирусов, возможностью возникновения реассортантов с нежелательными

¹ Rotavirus vaccines. WHO position paper – January 2013. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;88(5):49–64.

² List of member states by WHO region and mortality stratum. https://www.who.int/whr/2003/en/member_states_182-184_en.pdf

³ Rotavirus vaccines. WHO position paper — January 2013. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;88(5):49–64.

⁴ Summary of key characteristics of currently WHO-prequalified rotavirus vaccines. https://www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/WHO_Summary_xtics_PQ'd_rotav_vaccines.PDF?ua=1

⁵ Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 11–12 December 2013. *Wkly Epidemiol Rec*. 2014;89(7):53–60. https://www.who.int/vaccine_safety/committee/reports/wer8907.pdf?ua=1

⁶ Rotavirus infection: recommended vaccinations. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Scheduler/ByDisease?SelectedDiseaseId=32&SelectedCountryIdByDisease=-1>

⁷ Canada's provincial and territorial routine (and catch-up) vaccination routine schedule programs for infants and children. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/provincial-territorial-immunization-information/provincial-territorial-routine-vaccination-programs-infants-children.html>

⁸ VIEW-hub report: Global vaccine introduction and implementation. International vaccine access center. 2018. https://www.jhsph.edu/ivac/wp-content/uploads/2018/08/VIEW-hub_Report_Jun2018.pdf

ми эпидемиологическими характеристиками при вакцинации ослабленных детей [5–7] и увеличением вероятности развития инвагинации тонкого кишечника у привитых⁹.

Вакцинация не только уменьшает количество случаев госпитализации иммунизированных детей, но и обеспечивает формирование популяционного иммунитета, наблюдаемого даже в соседних государствах. В настоящее время вакцины RotaTeq™ и Rotarix™ защищают от возникающих новых штаммов ротавирусов, подтипы которых отличаются от штаммов, включенных в вакцины против РВИ¹⁰. Популяционный иммунитет приводит к снижению количества случаев заболеваний ротавирусным гастроэнтеритом, требующих госпитализации, и таких осложнений РВИ, как почечная недостаточность, судороги, энцефалит и энцефалопатия [9–11]. Все это способствует значительному снижению затрат на медицинское обслуживание как в амбулаторном, так и госпитальном секторах (с учетом внутрибольничных инфекций)¹¹ [12].

Целесообразность массовой вакцинации в странах мира связана с оценкой бюджетных затрат на ее проведение в соответствии с предлагаемыми ВОЗ механизмами оценки¹² [13–15]. Наиболее целесообразно введение массовой вакцинации [1], при этом вакцинация по эпидемическим показаниям в России¹³ или целевая вакцинация в странах Европейского региона ВОЗ [1] могут рассматриваться как ее более экономичная альтернатива.

Вместе с тем уполномоченные органы здравоохранения ряда стран или региональных отделений в государствах Европейского региона ВОЗ (Франция, Дания, Швеция, Испания и некоторые другие) в связи с низкой детской смертностью от диареи не считают целесообразным финансировать вакцинацию против РВИ на национальном уровне.

Международные консультативные группы ROTA (The Rotavirus Organization of Technical Allies) и GRADE (The Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation), сотрудничающие с ВОЗ, оказывают информационную поддержку уполномоченным органам в области здравоохранения и населению, способствуют внедрению массовой вакцинации. В странах с более высоким доходом и низкой смертностью показатели госпитализации оказывают большее влияние на структуру затрат¹⁴. В Российской Федерации массовая вакцинопрофилактика ротавирусного гастроэнтерита считается экономически обоснованной и поддерживается Правительством Российской Федерации, Министерством здравоохранения и Союзом педиатров России [16–18]. Согласно расчетам [17], ежегодная вакцинация 95 % новорожденных в Российской Федерации позволит в течение первых 10 лет снизить затраты на 45,31 млрд руб., из них 18,98 млрд руб. — затра-

ты на амбулаторные случаи ротавирусного гастроэнтерита, 26,33 млрд руб. — на случаи ротавирусного гастроэнтерита, потребовавшие госпитализации. Предотвращенные затраты системы здравоохранения составят при этом 20,04 млрд руб., предотвращенные не прямые затраты — 25,27 млрд руб.

Вакцины для профилактики ротавирусной инфекции

Живые вакцины против ротавирусного гастроэнтерита первого поколения представляли собой аттенуированные штаммы ротавирусов животных: ротавирусов обезьян RRV (Rhesus Rotavirus Vaccine Strain MMU18006 G3P5B[3]), бычьих — NCDV (Bovine Rotavirus Vaccine Strain RIT4237 G6[P6], UK G6[P5]), WC3 (Bovine Rotavirus Vaccine Strain WC3 G6 P7 [5]), ягненка LLR G10P[12] (Lanzhou lamb rotavirus vaccine). Эффективность вакцин против ротавирусного гастроэнтерита (на основе штамма RIT4237) колебалась от 0 до 64 %, а против тяжелых форм — от 0 до 84 %. Вакцины не обеспечивали воспроизводимой гетеротипичной защиты [19, 20]. В дальнейшем производственные вакцинные штаммы были применены в разработке вакцин второго поколения. Из них были получены реассортанты эпидемиологически важных серотипов штаммов ротавируса человека G1–G4 и штаммов ротавирусов животных, способных размножаться в кишечнике человека, не вызывая заболевания. На основе штамма ротавируса обезьян резус RRV и штамма ротавируса телят UK были разработаны тетравалентные вакцины RRV-TV и BRV-TV (резус ротавирусная вакцина и бычья ротавирусная вакцина). Реактогенность, иммуногенность и эффективность двух доз каждой из вакцин (RRV-TV и BRV-TV) в сравнении с плацебо определяли в двух параллельных клинических исследованиях, проведенных в 1997 г. в Финляндии. Для обеих вакцин была установлена сходная эффективность: 68–69 % против любого вида ротавирусного гастроэнтерита и 88–100 % против тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита в течение первого эпидемического сезона [21, 22].

Первая лицензированная вакцина RotaShield® (Wyeth Lederle Vaccines and Pediatrics, Marietta, Pennsylvania, США) (RRV-TV) была разрешена к применению в США. Она содержала 3 реассортантных штамма, имевших по 10 генов аттенуированного штамма RRV и по одному гену ротавируса человека, кодирующему VP7 серотипов G1, G2, G4, и штамм RRV с антигеном VP7 серотипа G3. Для нейтрализации желудочного сока в состав препарата был введен буферный раствор. По результатам пострегистрационного надзора лицензия была отозвана производителем вакцины [21, 22].

В 2005 г. лицензия на разработку, производство и реализацию реассортантных поливалентных вакцин на основе штамма

⁹ Available rotavirus vaccine products. A global recommendation. The Rotavirus Organization of Technical Allies. 2018. <http://rotacouncil.org/vaccine-evidence/available-rotavirus-vaccine-products>

How to use and interpret findings from qualitative evidence syntheses assessed using the CERQual approach. A practical guide for decision makers in health and social care and other users. The GRADE-CERQual Project Group. 2018. <https://drive.google.com/file/d/1tF0rhDmihpzd3B6BDFHcD8msDu1rqYjR/view>

¹⁰ Generic protocol for monitoring impact of rotavirus vaccination on gastroenteritis disease burden and viral strains (WHO/IVB/08.16). WHO; 2008.

¹¹ Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 11–12 December 2013. Wkly Epidemiol Rec. 2014;89(7):53–60. https://www.who.int/vaccine_safety/committee/reports/wer8907.pdf?ua=1

¹² European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC Expert opinion on rotavirus vaccination in infancy. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/rotavirus-vaccination-expert%20opinion-september-2017.pdf>

Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 11–12 December 2013. Wkly Epidemiol Rec. 2014;89(7):53–60. https://www.who.int/vaccine_safety/committee/reports/wer8907.pdf?ua=1

¹³ Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции у детей. Минздрав России, Союз педиатров России; 2017. https://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_vri.pdf

Приказ Минздрава России от 21.03.2014 № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

¹⁴ Rotavirus: common, severe, devastating, preventable. ROTA Council; 2016. <http://rotacouncil.org/wp-content/uploads/2016/03/White-paper-FINAL-v2.pdf>

УК ротавируса крупного рогатого скота для производства дешевых региональных вакцин была передана Национальным институтом здоровья США производителям в Китае, Индии и Бразилии. Предполагалось, что в состав вакцины будут включены дополнительные штаммы-реассортанты, содержащие гены, экспрессирующие VP7 с серотипом G8 и G9 ротавируса человека [21].

На основе штамма UK ротавируса крупного рогатого скота в Индии была разработана вакцина Rotasiil® (Serum Institute of India), которая содержит реассортанты штаммов ротавируса человека и штамма ротавируса крупного рогатого скота, экспрессирующие антигены с типовой специфичностью G1, G2, G3, G4 и G9 [23, 24].

На основе штамма Wistar Calf 3 (WC3) и штамма ротавируса человека Wa-DS-1 была разработана вакцина RotaTaq™ (Merck & Co. Inc, США), содержащая антигены пяти реассортантных штаммов ротавируса, геномы которых экспрессируют белки VP7 (G1–G4) и VP4 (P1A[8]) ротавируса человека и белки VP7(G6) и VP4 (P7[5]) ротавируса телят¹⁵ [20].

Другое направление разработки живых вакцин предусматривает создание моновалентной вакцины на основе ослабленного штамма ротавируса человеческого происхождения [20]. На основе G1P[8]-Ва-подобного штамма ротавируса человека (RIX4414), аттенуированного путем многократного пассирования на культуре клеток Vero, создана моновалентная вакцина Rotarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals Rixensart, Бельгия)¹⁶. На основе аттенуированного путем многократного пассирования на культуре клеток Vero местного штамма КН0118-2003 типа G1P[8], выделенного от больного ребенка во Вьетнаме, была разработана вакцина Rotavin-M1 (Center for Research and Production of Vaccines and Biologicals (POLYVAC), Вьетнам) [20, 25]. На основе местного штамма 116Е, выделенного от новорожденного ребенка, являющегося естественным человеком-бычьим реассортантным штаммом, создана вакцина Rotavac™ (Bharat Biotech International Limited, Hyderabad, Индия) [20, 26]. Продолжаются клинические исследования моновалентной вакцины RV3-BB (G3P[6]), созданной на основе естественно-аттенуированного штамма ротавируса, выделенного от новорожденного ребенка в Мельбурне [20, 27].

В целях совершенствования специфической профилактики проводится разработка ротавирусных вакцин следующего поколения, эффективных и безопасных (не способных размножаться в организме вакцинируемого) — нереплицирующихся вакцин для парентерального применения (НВПП). На различных этапах исследований находятся инактивированные вакцины (цельновирионная вакцина на основе G1P[8]), рекомбинантные субъединичные вакцины (на основе гибридных рекомбинантных белков VP8 P[8], P[4] или P[6] генотипов ротавируса человека), вакцины на основе вирусоподобных частиц [20, 28–30].

Корреляционные показатели иммунной защиты при определении эффективности вакцины

До начала массового применения клиническая эффективность ротавирусных вакцин изучалась по снижению таких показателей, как смертность, частота случаев тяжелых форм

ротавирусного гастроэнтерита и гастроэнтерита всех форм тяжести [31].

Была установлена корреляция нескольких гуморальных факторов¹⁷ как с защитой от инфекции, так и со степенью тяжести ротавирусного гастроэнтерита. В качестве корреляционных показателей иммунной защиты в клинических исследованиях применяли показатели гуморального ответа: среднегеометрические титры иммуноглобулинов (IgA, IgG), мукозального иммуноглобулина А (IgA) и данные по сероконверсии [31–38].

Выбор среднегеометрического титра IgA оказался успешным, так как была установлена обратная зависимость между общей детской смертностью до 5 лет, эффективностью вакцинации и титром IgA. Титр сывороточного ротавирус-специфичного IgA рассматривается как показатель иммуногенности вакцины, коррелирующий с эффективностью вакцины на популяционном уровне, что особенно характерно для стран с низким доходом и высокой детской смертностью от диареи [36, 37].

Была показана возможность использования в качестве корреляционного показателя иммунной защиты титра нейтрализующих антител к белкам G1 и титра анти-RV IgA, определяемых после третьего введения вакцины в курсе иммунизации RotaTaq™. Этот подход также применяли в клинических исследованиях эффективности вакцины при определении иммунного ответа и среднегеометрического титра антител (нейтрализующих антител и антител против P2-VP8-P[8] IgA и IgG) через 4 недели после третьей инъекции [29]. В ряде публикаций была рассмотрена возможность применения в качестве корреляционных показателей иммунной защиты определяемых в сыворотке крови при РВИ антител IgM и IgA из кишечника или их секреторного компонента [31, 35]. Изменение титра не обладающих нейтрализующей способностью интестинальных IgA в слюне, содержимом двенадцатиперстной кишки и фекалиях также может рассматриваться в качестве лабораторного маркера эффективности иммунитета против ротавирусов.

В связи с тем, что корреляционный показатель иммунной защиты до настоящего времени не установлен¹⁸ [31, 38], для живых ротавирусных вакцин изучали возможность использования других факторов иммунологического ответа (ASC-клеток, секретирующих антител и Т-клеток) [39, 40]. Многие исследователи при оценке эффективности вакцины как альтернативу корреляционным показателям иммунной защиты рассматривают так называемые «лабораторные маркеры» эффективности иммунитета, например уменьшение количества ротавирусов, выделяемых с фекалиями, что является прямым отражением способности вакцины подавлять размножение вируса в кишечнике [41]. Увеличение концентрации эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) в слюне может выступать в качестве лабораторного маркера эффективности иммунитета, так как РВИ связана с повышением экспрессии гена IFI27 в подчелюстных слюнных железах. Кроме того, концентрация EGF в слюне коррелирует с продолжительностью госпитализации при ротавирусном гастроэнтерите [42].

¹⁵ Highlights of prescribing information. RotaTaq (Rotavirus Vaccine, Live, Oral, Pentavalent). https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/r/ro-tateq/ro-tateq_pi.pdf

¹⁶ Highlights of prescribing information. ROTARIX (Rotavirus Vaccine, Live, Oral). https://www.gsksource.com/pharma/content/dam/GlaxoSmithKline/US/en/Prescribing_Information/Rotarix/pdf/ROTARIX-PI-PIL.PDF

¹⁷ Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). WHO Technical Report Series No. 941; 2007. <https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/rotavirus/Annex%203%20rotavirus%20vaccines.pdf>

¹⁸ Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations (WHO/BS/2016.2287). WHO; 2016.

WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-seventh report. WHO Technical Report Series No. 1004; 2017. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255657/9789241210133-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Безопасность и реактогенность живых ротавирусных вакцин

При проведении постмаркетингового эпидемиологического надзора вакцин против РВИ было выявлено небольшое увеличение риска возникновения инвагинации кишечника (примерно 1–2 случая на 100 тысяч привитых детей младшего возраста) после введения первой дозы вакцины. Инвагинация кишечника — смешанный вариант кишечной непроходимости, обусловленный, как правило, изоперистальтическим внедрением проксимального участка кишки в дистальный¹⁹. Число зарегистрированных случаев идиопатической инвагинации различается в разных странах и составляет в среднем 74 случая на 100 тысяч детей младше одного года жизни (от 9 до 328 случаев на 100 тысяч детей младше одного года жизни) [43]. Из них 2/3 — дети грудного (от 4 до 9 месяцев) возраста, большей частью мальчики²⁰. В Российской Федерации частота острой кишечной непроходимости составляет около 5 заболевших на 100 тысяч человек, являясь причиной от 3 до 5 % поступлений больных в хирургические стационары²¹.

В качестве одного из возможных факторов развития кишечной непроходимости рассматриваются вирусные и бактериальные инфекции. По результатам ретроспективного изучения сохраненных образцов фекалий детей с инвагинацией кишечника и контрольных групп показано, что при инвагинациях выявляются преимущественно не бактериальные патогены (*Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* и др.), а вирусы кишечной группы. При изучении фекальных образцов методами геномной амплификации в группе детей с подтвержденной инвагинацией вирусы выявляли чаще, чем в образцах фекалий детей без инвагинации. Преобладали аденовирусы группы С (HAdV-1, HAdV-2), энтеровирусы группы В, ротавирусы. Взаимосвязи между инвагинацией и выявлением норовирусов, риновирусов, астровирусов, пареховирусов, бокавирусов в фекалиях установлено не было [44–47].

Инвагинация тонкого кишечника в крайне редких случаях была отмечена после совместной иммунизации живыми оральными полиомиелитными вакцинами и ротавирусными вакцинами разных производителей [48, 49]. Ротавирусные вакцины RotaTeq™ и Rotarix™ могут повышать риск инвагинации в течение первых 7 сут после вакцинации [50, 51]. В США и Австралии было выявлено от 1 до 6 дополнительных случаев инвагинации на 100 тысяч вакцинированных [52]. У невакцинированных до одного года жизни инвагинации выявлялись с частотой от 33 до 101 на 100 тысяч детей в год [53]. Инвагинация после вакцинации была выявлена в Мексике, Бразилии, США, Франции, в то же время, в африканских странах не было обнаружено превышения числа инвагинаций в группе детей, иммунизированных вакциной [49].

При проведении клинических исследований вакцин Rotavac™ (Индия) и Rotasiil™ (Индия) в Индии и Африке повышение числа инвагинаций в группах иммунизированных детей по сравнению с числом инвагинаций в контрольных группах было незначительным [41, 51, 52]. Тем не менее польза от вакцинации против РВИ, благодаря профилактике развития тяжелой диареи и смертельного исхода в результате ротавирусного заболевания, намного превышает риск развития инвагинации кишечника²².

Причина различий в потенциальном риске инвагинации кишечника у детей вследствие вакцинации в разных странах не ясна, в настоящее время существуют предположения о следующих факторах:

- различие в возрасте при вакцинации;
- различие в эффективности вакцины (например, более низкая эффективность может быть связана с более низким риском инвазионного восприятия);
- гипотеза «триггера» (предполагает, что вакцинация может спровоцировать инвагинацию у восприимчивого человека, у которого инвагинация, возможно, развилась бы и без иммунизации, только в более поздний период) [4, 53, 54].

В связи с территориальными различиями в эффективности диагностики, лечения и исходах инвагинации рекомендуется изучение статистики частоты возникновения случаев инвагинации кишечника²³.

По данным ВОЗ²⁴, ротавирусные вакцины обладают благоприятным клиническим профилем безопасности и реактогенности, подобным профилю безопасности плацебо, и не увеличивают риск возникновения серьезных нежелательных реакций, включая риск инвагинации. Вместе с тем, низкий уровень достоверности не позволяет полностью исключить риски возникновения инвагинации при применении указанных вакцин [51]. Для дальнейшей оценки соотношения пользы и риска вакцин с учетом возможных различий в риске инвагинации в странах, где ротавирусные вакцины включены в национальные календари прививок, необходимо проводить активное наблюдение за выявлением инвагинаций и других нежелательных поствакцинальных реакций²⁵.

Схемы вакцинации и их эффективность

Уполномоченные органы государств принимают решение о включении вакцинации против РВИ в национальные календари прививок и устанавливают схемы вакцинации на основе рекомендаций ВОЗ по эффективности и безопасности вакцин²⁶, учитывая локальную эпидемиологическую ситуацию по РВИ и идиопатической инвагинации [55–57].

В ЕС с 2006 года²⁷ разрешены к применению вакцины RotaTeq™ (США) и Rotarix™ (Бельгия).

¹⁹ Инвагинация кишечника у детей. Клинические рекомендации. Минздрав России, Российская ассоциация детских хирургов; 2016. http://www.radh.ru/invaginacia_guidelines_new.pdf

²⁰ Vaccines and Biologicals. Acute intussusception in infants and children. Incidence, clinical presentation and management: a global perspective (WHO/V&B/02.19). WHO; 2002. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67720/WHO_V-B_02.19_eng.pdf

²¹ Инвагинация кишечника у детей. Клинические рекомендации. Минздрав России, Российская ассоциация детских хирургов; 2016. http://www.radh.ru/invaginacia_guidelines_new.pdf

²² Rotavirus vaccines: WHO position paper — January 2013. Wkly Epidemiol Rec. 2013;88(5):49–64. <http://www.who.int/wer/2013/wer8805.pdf>

²³ Meeting of the Global Advisory Committee on Vaccine Safety, June 2011. Wkly Epidemiol Rec. 2011;86(30):321–4. <https://www.who.int/wer/2011/wer8630.pdf?ua=1>

²⁴ Rotavirus vaccines: WHO position paper — January 2013. Wkly Epidemiol Rec. 2013;88(5):49–64. <http://www.who.int/wer/2013/wer8805.pdf>

²⁵ Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 6–7 December 2017. Wkly Epidemiol Rec. 2018;93(3):17–30. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259874/WER9303.pdf?sequence=1>

²⁶ Progress with the implementation of rotavirus surveillance and vaccines in countries of the WHO African Region, 2007–2016. Wkly Epidemiol Rec. 2017;92(44):673–80.

²⁷ Summary of product characteristics. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rotarix-epar-product-information_en.pdf
Summary of product characteristics https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rota-teq-epar-product-information_en.pdf

Rotarix™ назначают в виде двух доз с интервалом не менее четырех недель. Первую дозу вводят ребенку старше шести недель. Рекомендуется завершить курс вакцинации до того, как ребенку исполнится 16 недель, но, в любом случае, не позднее 24-недельного возраста. Та же схема вакцинации может быть использована у детей, родившихся преждевременно (с 27-недельного гестационного возраста). Rotarix™ можно вводить одновременно с другими инактивированными вакцинами. Вакцину RotaTeq™ назначают в виде трех доз с интервалом не менее четырех недель между каждой дозой. Первую дозу вводят ребенку в возрасте от 6 до 12 недель. Рекомендуется, чтобы последняя доза была введена ребенку в возрасте от 20 до 22 недель. При необходимости вакцину можно назначать детям в возрасте до 32 недель. RotaTeq™ можно вводить одновременно с другими вакцинами, за исключением оральной вакцины против полиомиелита (необходим двухнедельный интервал между введениями данных вакцин). Вакциной RotaTeq™ можно иммунизировать недоношенных детей, если беременность длилась не менее 25 недель. В таком случае первая доза должна быть введена через шесть недель после рождения. В странах Европы обобщение опыта применения вакцин с 2006 г. показало высокую эффективность (95 %) вакцин против тяжелых форм болезни.

В государствах ЕС вакцинация по общим рекомендациям внедрена в 36 % стран. В Чешской Республике и Польше вакцинация не поддерживается государственным финансированием²⁸. Охват вакцинацией стран ЕС, по данным UNICEF²⁹ за 2017 год, составляет 24 %.

В Европейском регионе ВОЗ Программы иммунизации привели к сокращению на 60–90 % случаев госпитализаций и амбулаторных посещений при РВИ³⁰.

В Российской Федерации с 2012 г. зарегистрирована вакцина RotaTeq™, США (РотаТек®, вакцина для профилактики РВИ пентавалентная, живая, раствор для приема внутрь 1 доза; туба 2 мл; № ЛП-001865³¹). Вакцинация против РВИ проводится в рамках календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям (Приказ Минздрава России от 21.03.2014 № 125н, Приложение № 2) с учетом сроков введения вакцин Национального календаря профилактических прививок. По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году»³², за 2012–2017 гг. в нашу страну поступило 212310 доз вакцины, привито 76785 детей (в 2014 г. — 5904, в 2015 г. — 23268, в 2016 г. — 38023, в 2017 г. — 17956). Сделан вывод о том, что малые объемы иммунизации не могут существенно повлиять на течение эпидемического процесса в масштабах страны.

В США вакцинация зарегистрированными вакцинами против РВИ (RotaTeq™, США и Rotarix™, Бельгия) включена в Национальный календарь прививок для всех младенцев, начиная с возраста 2 месяцев. RotaTeq™ назначают в трех дозах (в возрасте 2, 4 и 6 месяцев). Rotarix™ назначают в двух дозах (в возрасте от 2 до 4 месяцев). Первая доза любой вакцины должна быть введена ребенку до достижения им возраста 15 недель. Кроме того, дети должны пройти весь курс вакцинации против РВИ до того, как им исполнится 8 месяцев. Охват вакцинацией составляет 88 (1 доза) и 73 % (последняя доза).

На основании рекомендации ВОЗ, благодаря программе Всемирного альянса по вакцинам и иммунизации (Global Alliance for Vaccines and Immunisation, GAVI), была субсидирована закупка преквалифицированных ВОЗ вакцин RotaTeq™ и Rotarix™ по цене 0,1–0,3 долларов США за дозу, которые, начиная с 2009 г., были введены в национальные программы иммунизации 72 стран мира с самым низким уровнем дохода. К настоящему времени ротавирусные вакцины RotaTeq™ и Rotarix™ внедрены более чем в 98 странах мира³³ с 70–99 % охватом детского населения для первой дозы вакцины и для полного курса³⁴.

В большинстве стран, включивших вакцину в календари прививок, применяют моновалентную вакцину Rotarix™. Пентавалентную вакцину RotaTeq™ применяют 74 страны, одновременно оба типа вакцин применяют 7 стран. В странах с низкой детской смертностью от диареи эффективность вакцин RotaTeq™ и Rotarix™ против тяжелых форм ротавирусного гастроэнтерита оценена как высокая [51, 58, 59]. Многолетний опыт применения показал, что эффективность ротавирусных вакцин в странах с высокой детской смертностью была существенно ниже [60–63]. Низкая эффективность вакцин из штаммов ротавируса с генотипом P[8] (Rotarix™, RotaTeq™) в клинических исследованиях наблюдается в регионах Африки и Юго-Восточной Азии, в которых большая часть детской популяции восприимчива к циркулирующим штаммам ротавирусов с генотипом P[6]. Предполагается, что успешному иммунному ответу на живые вирусные вакцины у детей в странах с высокой детской смертностью препятствует совокупность различных факторов: наличие антител в материнском молоке, интерференция с живой полиомиелитной вакциной, отличия в составе микробиома кишечника, энтеропатия, недоедание. После массовой иммунизации в 40 странах южной части Африки число случаев госпитализации сократилось на 33 %, что существенно снизило смертность и расходы в госпитальном секторе [51, 64–68]. С 2018 г. на международном уровне доступны преквалифицированные ВОЗ вакцины Rotavac™ (Индия) и RotaSiil™ (Индия), эффективность и безопасность которых была подтверждена в Индии и странах Африки. Отличий по эффек-

²⁸ Rotavirus infection: recommended vaccinations. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Scheduler/ByDisease?SelectedDiseaseId=32&SelectedCountryIdByDisease=-1>

²⁹ Global and regional immunization profile. WHO vaccine-preventable disease monitoring system; 2019 global summary. https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/gs_eurprofile.pdf?ua=1

³⁰ European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC Expert opinion on rotavirus vaccination in infancy. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/rotavirus-vaccination-expert%20opinion-september-2017.pdf>

³¹ Вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции у детей. Руководство по профилактике заболевания/синдрома. Минздрав России, Союз педиатров России; 2017. https://www.pediatr-russia.ru/sites/default/files/file/kr_vri.pdf

³² <https://rospotrebнадзор.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf>

³³ Reported estimates of Rota1 coverage. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2019 global summary. http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tscoverage/rota1.html

³⁴ Global introduction status. ROTA Council. <http://rotacouncil.org/vaccine-introduction/global-introduction-status/>

Reported estimates of Rota1 coverage. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2019 global summary. http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tscoverage/rota1.html

VIEW-hub report: Global vaccine introduction and implementation. International vaccine access center. 2018. https://www.jhsph.edu/ivac/wp-content/uploads/2018/08/VIEW-hub_Report_Jun2018.pdf

тивности в странах с низким доходом с преквалифицированными ранее вакцинами установлено не было³⁵ [51].

Для моновалентной вакцины Rotavac™, содержащей натуральный реассортантный штамм G9P[11], выделенный в 1980 г. в Нью-Дели (Индия) от младенца с бессимптомным течением инфекции, предложена также схема вакцинации при рождении (0–5 сут). Введение первой дозы вакцины в наиболее ранний период младенчества, сразу после рождения, когда идиопатические инвагинации не наблюдаются, может снизить риск инвагинации тонкого кишечника. Эта схема учитывает особенности развития иммунитета у новорожденных (отсутствие плазматических клеток), отсутствие молизирующих антител до начала грудного вскармливания, а также материнских секреторных IgA, которые не проходят через плаценту. Кроме того, в это время неблагоприятные факторы желудочно-кишечного тракта оказывают на вакцинный вирус минимальное негативное действие [26, 27, 30]. Для ранней иммунизации предложено использование вакцины RV3-BB на основе полностью человеческого штамма ротавируса G3P[6], выделенного в Мельбурне (Австралия) в 1975 году [26, 30].

Разрабатываемые НВПП, не увеличивающие риск инвагинации, способны снизить заболеваемость ротавирусной диареей среди детей младше пяти лет в странах с низким уровнем смертности от диарей³⁶.

Заключение

ВОЗ рекомендует включать живые аттенуированные вакцины против РВИ в национальные программы иммунизации и указывает на необходимость их обязательного применения в странах, где регистрируется высокая смертность от диарей у детей в возрасте менее 5 лет.

Данные по безопасности ротавирусных вакцин не позволяют полностью исключить риски развития такой серьезной нежелательной реакции, как инвагинация кишечника.

Учитывая низкую смертность от диарей среди детей младше 5 лет и незначительную заболеваемость РВИ в Российской Федерации, оправдано включение вакцинации против РВИ в Национальный календарь профилактических прививок Российской Федерации по эпидемическим показаниям. В соответствии с международным опытом применения ротавирусных вакцин дополнительно необходимы организация системы по активному фармаконадзору и установление уровня частоты возникновения инвагинации тонкого кишечника среди вакцинированных и не вакцинированных детей декретируемого возраста.

В целях минимизации рисков, связанных с применением живых аттенуированных ротавирусных вакцин, необходимо продолжение научных исследований в области разработки вакцин для парентерального введения, не способных к репликации в организме иммунизированных.

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).

Конфликт 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. Bruijning-Verhagen P, Mangen MJ, Felderhof M, Hartwig NG, van Houten M, Winkel L, et al. Targeted rotavirus vaccination of high-risk infants; a low cost and highly cost-effective alternative to universal vaccination. *BMC Med.* 2013;11:112. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-112>
2. Rheingans RD, Antil L, Dreifelbis R, Podewils LJ, Bresee JS, Parashar UD. Economic costs of rotavirus gastroenteritis and cost-effectiveness of vaccination in developing countries. *J Infect Dis.* 2009;200(Suppl. 1):S16–27. <https://doi.org/10.1086/605026>
3. Haider S, Chaikledkaew U, Thavorncharoensap M, Youngkong S, Islam MA, Thakkestian A. Systematic Review and Meta-Analysis of Cost-effectiveness of Rotavirus Vaccine in Low-Income and Lower-Middle-Income Countries. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(4):ofz117. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz117>
4. Paree N, Giaquinto C, Du Roure C, Martinon-Torres F, Spoulou V, Van Damme P, Vesikari T. Rotavirus vaccination in Europe: drivers and barriers. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(5):416–25. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70035-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70035-0)
5. Ricciardi GW, Toumi M, Weil-Olivier C, Ruitenberg EJ, Dankó D, Duru G, et al. Comparison of NITAG policies and working processes in selected developed countries. *Vaccine.* 2015;33(1):3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.023>
6. St-Martin G, Lindstrand A, Sandbu S, Fischer TK. Selection and interpretation of scientific evidence in preparation for policy decisions: a case study regarding introduction of rotavirus vaccine into National Immunization Programs in Sweden, Norway, Finland, and Denmark. *Front Public Health.* 2018;6:131. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00131>
7. Bernstein DI. Rotavirus vaccines: mind your Ps and Gs. *J Infect Dis.* 2018;218(4):519–21. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy203>
8. Tate JE, Parashar UD. Approaches to monitoring intussusception following rotavirus vaccination. *Expert Opin Drug Saf.* 2019;18(1):21–7. <https://doi.org/10.1080/14740338.2019.1561857>
9. Pollard SL, Malpica-Llanos T, Friberg IK, Fischer-Walker C, Ashraf S, Walker N. Estimating the herd immunity effect of rotavirus vaccine. *Vaccine.* 2015;33(32):3795–800. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.064>
10. Burke RM, Tate JE, Dahl RM, Aliabadi N, Parashar UD. Rotavirus vaccination is associated with reduced seizure hospitalization risk among commercially insured US children. *Clin Infect Dis.* 2018;67(10):1614–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy424>
11. Payne DC, Baggs J, Zerr DM, Klein NP, Yih K, Glanz J, et al. Protective association between rotavirus vaccination and childhood seizures in the year following vaccination in US children. *Clin Infect Dis.* 2014;58(2):173–7. <https://doi.org/10.1093/cid/cit671>
12. Standaert B, Strens D, Li X, Schecroun N, Raes M. The sustained rotavirus vaccination impact on nosocomial infection, duration of hospital stay, and age: the RotaBIS study (2005–2012). *Infect Dis Ther.* 2016;5(4):509–24. <https://doi.org/10.1007/s40121-016-0131-0>
13. Hutubessy RC, Baltussen RM, Torres-Edejer TT, Evans DB. Generalised cost-effectiveness analysis: an aid to decision making in health. *Appl Health Econ Health Policy.* 2002;1(2):89–95.

³⁵ Rotavirus vaccines. WHO position paper – January 2013. *Wkly Epidemiol Rec.* 2013;88(5):49–64.

³⁶ European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC Expert opinion on rotavirus vaccination in infancy. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/rotavirus-vaccination-expert%20opinion-september-2017.pdf>

14. Glass RI. Priority setting for the introduction of rotavirus vaccine: what evidence was essential? *Cost Eff Resour Alloc.* 2018;16(Suppl. 1):42. <https://doi.org/10.1186/s12962-018-0126-7>
15. Oldin C, Golsäter M, Schollin Ask L, Fredriksson S, Stenmarker M. Introduction of rotavirus vaccination in a Swedish region: assessing parental decision-making, obtained vaccination coverage and resulting hospital admissions. *Acta Paediatr.* 2019;108(7):1329–37. <https://doi.org/10.1111/apa.14674>
16. Баранов АА, Намазова-Баранова ЛС, Таточенко ВК, Вишнева ЕА, Федосеенко МВ, Селимзянова ЛР и др. Ротавирусная инфекция у детей — нерешенная проблема. Обзор рекомендаций по вакцинопрофилактике. *Педиатрическая фармакология.* 2017;14(4):248–57. [Baranov AA, Namazova-Baranova LS, Tatchenko VK, Vishneva EA, Fedoseenko MV, Selimzianova LR, et al. Rotavirus infection in children is an unsolved problem. Review of guidelines for vaccinal prevention. *Pediatricskaya farmakologiya = Pediatric pharmacology.* 2017;14(4):248–57 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15690/pf.v14i4.1756>
17. Рудакова АВ, Харит СМ, Усков АН, Лобзин ЮВ. Оценка предотвращенных затрат на терапию ротавирусной инфекции при вакцинации 5-валентной вакциной в Российской Федерации. *Журнал инфектологии.* 2014;6(2):71–5. [Rudakova AV, Kharit SM, Uskov AN, Lobzin YV. Assessment of reduction of rotavirus infection burden in case of vaccination with a pentavalent vaccine in Russian Federation. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology.* 2014;6(2):71–5 (In Russ.)]
18. Костинов МП, Зверев ВВ. Экономическая эффективность вакцинации против ротавирусной инфекции в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2012;(3):50–5. [Kostinov MP, Zverev VV. Economic efficiency of vaccination against rotavirus infection in the Russian Federation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2012;(3):50–5 (In Russ.)]
19. Midhun K, Kapikian AZ. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(3):423–34. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.3.423>
20. Ward RL, McNeal MM, Steele AD. Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):49–63. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s821>
21. Kapikian AZ, Simonsen L, Vesikari T, Hoshino Y, Morens DM, Chanock RM, et al. A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. *J Infect Dis.* 2005;192(Suppl. 1):S22–9. <https://doi.org/10.1086/431510>
22. Vesikari T, Karvonen AV, Majuri J, Zeng SQ, Pang XL, Kohberger R, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of 2 doses of bovine-human (UK) and rhesus–rhesus human rotavirus reassortant tetravalent vaccines in Finnish children. *J Infect Dis.* 2006;194(3):370–6. <https://doi.org/10.1086/505151>
23. Zade JK, Kulkarni PS, Desai SA, Sabale RN, Naik SP, Dhare RM. Bovine rotavirus pentavalent vaccine development in India. *Vaccine.* 2014;32(Suppl. 1):A124–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.003>
24. Desai S, Rath N, Kawade A, Venkatraman P, Kundu R, Lalwani SK, et al. Non-interference of Bovine-Human reassortant pentavalent rotavirus vaccine ROTASIL® with the immunogenicity of infant vaccines in comparison with a licensed rotavirus vaccine. *Vaccine.* 2018;36(37):5519–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.064>
25. Dang DA, Nguyen VT, Vu DT, Nguyen TH, Nguyen DM, Yuhuan W, et al. A dose-escalation safety and immunogenicity study of a low live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children. *Vaccine.* 2012;30(Suppl. 1):A114–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.118>
26. Madhi SA, Parashar UD. 116E rotavirus vaccine development: a successful alliance. *Lancet.* 2014;383(9935):2106–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62701-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62701-4)
27. Bines JE, At Thobari J, Satria CD, Handley A, Watts E, Cowley D, et al. Human neonatal rotavirus vaccine (RV3-BB) to target rotavirus from birth. *N Engl J Med.* 2018;378(8):719–30. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706804>
28. Arnold MM. Rotavirus vaccines: why continued investment in research is necessary. *Curr Clin Microbiol Rep.* 2018;5(1):73–81.
29. Groome MJ, Koen A, Fix A, Page N, Jose L, Madhi SA, et al. Safety and immunogenicity of a parenteral P2-VP8-P[8] subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(8):843–53. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30242-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30242-6)
30. Wen X, Cao D, Jones RW, Li J, Szu S, Hoshino Y. Construction and characterization of human rotavirus recombinant VP8* subunit parenteral vaccine candidates. *Vaccine.* 2012;30(43):6121–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.078>
31. Angel J, Steele AD, Franco MA. Correlates of protection for rotavirus vaccines: possible alternative trial endpoints, opportunities, and challenges. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(12):3659–71. <https://doi.org/10.4161/hv.34361>
32. Holmgren J, Parashar UD, Plotkin S, Louis J, Ng SP, Desautels E, et al. Correlates of protection for enteric vaccines. *Vaccine.* 2017;35(26):3355–63. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.005>
33. Desselberger U, Huppertz HI. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis.* 2011;203(2):188–95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq031>
34. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shultz J, Calva JJ, Morrow AL, et al. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1602–9. <https://doi.org/10.1086/317619>
35. Patel M, Glass RI, Jiang B, Santosham M, Lopman B, Parashar U. A systematic review of anti-rotavirus serum IgA antibody titer as a potential correlate of rotavirus vaccine efficacy. *J Infect Dis.* 2013;208(2):284–94. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit166>
36. Lee B, Carmolli M, Dickson DM, Colgate ER, Diehl SA, Uddin MI, et al. Rotavirus-specific immunoglobulin A responses are impaired and serve as a suboptimal correlate of protection among infants in Bangladesh. *Clin Infect Dis.* 2018;67(2):186–92. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy076>
37. Liu GF, Hille D, Kaplan SS, Goveia MG. Postdose 3 G1 serum neutralizing antibody as correlate of protection for pentavalent rotavirus vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(10):2357–63. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1356522>
38. Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis.* 2002;34(10):1351–61. <https://doi.org/10.1086/340103>
39. Blutt SE, Warfield KL, Lewis DE, Conner ME. Early response to rotavirus infection involves massive B cell activation. *J Immunol.* 2002;168(11):5716–21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5716>
40. Wang Y, Dennehy PH, Keyserling HL, Tang K, Gentsch JR, Glass RI, et al. Rotavirus infection alters peripheral T-cell homeostasis in children with acute diarrhea. *J Virol.* 2007;81(8):3904–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.01887-06>
41. Ella R, Bobba R, Muralidhar S, Babji S, Vadrevu KM, Bhan MK. A Phase 4, multicentre, randomized, single-blind clinical trial to evaluate the immunogenicity of the live, attenuated, oral rotavirus vaccine (116E), ROTAVAC®, administered simultaneously with or without the buffering

- agent in healthy infants in India. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(7):1791–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1450709>
42. Gómez-Rial J, Curras-Tuala MJ, Talavera-González C, Rodríguez-Tenreiro C, Vilanova-Trillo L, Gómez-Carballa A, et al. Salivary epidermal growth factor correlates with hospitalization length in rotavirus infection. *BMC Infect Dis.* 2017;17:370. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2463-0>
43. Jiang J, Jiang B, Parashar U, Nguyen T, Bines J, Patel MM. Childhood intussusception: a literature review. *PloS One.* 2013;8(7):e68482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068482>
44. Mansour AM, El Koutby M, El Barbary MM, Mohamed W, Shehata S, El Mohammady H, et al. Enteric viral infections as potential risk factors for intussusception. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7(1):28–35. <https://doi.org/10.3855/jidc.2321>
45. Clarke EJ Jr, Phillips IA, Alexander ER. Adenovirus infection in intussusception in children in Taiwan. *JAMA.* 1969;208(9):1671–4. <https://doi.org/10.1001/jama.1969.03160090031007>
46. Minney-Smith CA, Levy A, Hodge M, Jacoby P, Williams SH, Carcione D, et al. Intussusception is associated with the detection of adenovirus C, enterovirus B and rotavirus in a rotavirus vaccinated population. *J Clin Virol.* 2014;61(4):579–84. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.10.018>
47. Nylund CM, Denson LA, Noel JM. Bacterial enteritis as a risk factor for childhood intussusception: a retrospective cohort study. *J Pediatr.* 2010;156(5):761–5. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.026>
48. Weintraub ES, Baggs J, Duffy J, Vellozzi C, Belongia EA, Irving S, et al. Risk of intussusception after monovalent rotavirus vaccination. *N Engl J Med.* 2014;370(6):513–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311738>
49. Tate JE, Mwenda JM, Armah G, Jani B, Omoro R, Ademe A, et al. Evaluation of intussusception after monovalent rotavirus vaccination in Africa. *N Engl J Med.* 2018;378(16):1521–8. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713909>
50. Дармостукова МА, Снегирева ИИ, Вельц НЮ, Казаков АС, Аляутдин РН. Международный мониторинг безопасности вакцин. *Безопасность и риск фармакотерапии.* 2019;7(1):6–14. [Darmostukova MA, Snegireva II, Velts NYu, Kazakov AS, Alyautdin RN. Vaccine safety international monitoring. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy.* 2019;7(1):6–14 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2019-7-1-6-14>
51. Soares-Weiser K, Bergman H, Henschke N, Pitan F, Cunliffe N. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;(3):CD008521. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008521.pub4>
52. Yen C, Healy K, Tate JE, Parashar UD, Bines J, Neuzil K, et al. Rotavirus vaccination and intussusception — science, surveillance, and safety: a review of evidence and recommendations for future research priorities in low and middle income countries. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(10):2580–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1197452>
53. Tate JE, Parashar UD. Approaches to monitoring intussusception following rotavirus vaccination. *Expert Opin Drug Saf.* 2019;18(1):21–7. <https://doi.org/10.1080/14740338.2019.1561857>
54. Desselberger U. Differences of rotavirus vaccine effectiveness by country: likely causes and contributing factors. *Pathogens.* 2017;6(4):65. <https://doi.org/10.3390/pathogens6040065>
55. Dennehy PH, Bertrand HR, Silas PE, Damaso S, Friedland LR, Abu-Elyazeed R. Coadministration of RIX4414 oral human rotavirus vaccine does not impact the immune response to antigens contained in routine infant vaccines in the United States. *Pediatrics.* 2008;122(5):e1062–6. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1059>
56. Gruber JF, Gruber LM, Weber RP, Becker-Dreps S, Jonsson Funk M. Rotavirus vaccine schedules and vaccine response among infants in low- and middle-income countries: a systematic review. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(2):ofx066. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx066>
57. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17083. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
58. Willame C, Vonk Noordegraaf-Schouten M, Gvozdenović E, Kochems K, Oordt-Speets A, Praet N, et al. Effectiveness of the oral human attenuated rotavirus vaccine: a systematic review and meta-analysis—2006–2016. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5(11):ofy292. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy292>
59. Payne DC, Selvarangan R, Azimi PH, Boom JA, Englund JA, Staat MA, et al. Long-term consistency in rotavirus vaccine protection: RV5 and RV1 vaccine effectiveness in US children, 2012–2013. *Clin Infect Dis.* 2015;61(12):1792–9. <https://doi.org/10.1093/cid/civ872>
60. Inchauste L, Patzi M, Halvorsen K, Solano S, Montesano R, Iiguez V. Impact of rotavirus vaccination on child mortality, morbidity, and rotavirus-related hospitalizations in Bolivia. *Int J Infect Dis.* 2017;61:79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.06.006>
61. Burnett E, Jonesteller CL, Tate JE, Yen C, Parashar UD. Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. *J Infect Dis.* 2017;215(11):1666–72. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix186>
62. Abou-Nader AJ, Sauer MA, Steele AD, Tate JE, Atherly D, Parashar UD, et al. Global rotavirus vaccine introductions and coverage: 2006–2016. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(9):2281–96. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1470725>
63. Patel M, Shane AL, Parashar UD, Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? *J Infect Dis.* 2009;200(Suppl. 1):S39–48. <https://doi.org/10.1086/605035>
64. Atherly DE, Lewis KDC, Tate J, Parashar UD, Rheingans RD. Projected health and economic impact of rotavirus vaccination in GAVI-eligible countries: 2011–2030. *Vaccine.* 2012;30(Suppl. 1):A7–14. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.096>
65. Mwenda JM, Parashar UD, Cohen AL, Tate JE. Impact of rotavirus vaccines in Sub-Saharan African countries. *Vaccine.* 2018;36(47):7119–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.026>
66. Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med.* 2010;362(4):289–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904797>
67. Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9741):606–14. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60889-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60889-6)
68. Mwenda JM, Burke RM, Shaba K, Mihigo R, Tevi-Benissan MC, Mumba M, et al. Implementation of rotavirus surveillance and vaccine introduction — World Health Organization African Region, 2007–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66(43):1192–6. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6643a7>

Об авторах / Authors

Шевцов Владимир Александрович, канд. мед. наук. *Vladimir A. Shevtsov*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7164-2890>

Евреинова Елена Эдуардовна, канд. биол. наук. *Elena E. Evreinova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3250-0937>

Индикова Ирина Николаевна, канд. биол. наук. *Irina N. Indikova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0695-3446>

Хантимирова Лейсан Маратовна. *Leysan M. Khantimirova*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6269-0201>

Горенков Дмитрий Витальевич. *Dmitry V. Gorenkov*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Рукавишников Андрей Владимирович, канд. биол. наук. *Andrey V. Rukavishnikov*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4536-2040>

Поступила 05.06.2019

После доработки 04.10.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 5 June 2019

Revised 4 October 2019

Accepted 22 November 2019

Терапия генетических заболеваний: актуальные направления разработки биомедицинских клеточных продуктов

О. А. Рачинская^{1,*}, М. А. Водякова¹, Е. В. Мельникова¹, 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

Генетические заболевания в большинстве случаев носят прогрессирующий характер и без соответствующего лечения приводят к смерти или инвалидизации человека. Актуальными проблемами мирового здравоохранения являются как трудность диагностики, так и отсутствие эффективного лечения для многих генетических заболеваний. Медицинская помощь пациентам с генетическими заболеваниями часто сводится к симптоматическому и паллиативному лечению. Начиная с 2000-х годов перспективным направлением для терапии таких заболеваний являются препараты на основе жизнеспособных клеток человека (в соответствии с законодательством Российской Федерации — биомедицинские клеточные продукты) и генотерапевтические препараты. Цель работы — обзор актуальных направлений разработки биомедицинских клеточных продуктов для лечения генетических заболеваний. В работе рассмотрены препараты на основе клеток для лечения таких моногенных генетических заболеваний, как тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), рецессивный дистрофический буллезный эпидермолит (RDEB), β-гемоглобинопатии, дефицит альфа-1-антитрипсина, гемофилия А и мышечная дистрофия Дюшенна. Разработка подобных препаратов осуществляется во многих странах и находится на разных стадиях: до-клинические и разные фазы клинических исследований. Для одного заболевания могут разрабатываться препараты, содержащие разные типы жизнеспособных клеток: дифференцированных, стволовых и фибробластов, индуцированных плюрипотентных, а также *ex vivo* генетически модифицированных. Приоритетными задачами разработки таких препаратов являются отказ от проведения заместительной терапии или паллиативного лечения, а также существенное увеличение продолжительности и качества жизни пациентов.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные продукты; генетические заболевания; орфанные заболевания; генотерапевтические препараты; стволовые клетки; индуцированные плюрипотентные клетки

Для цитирования: Рачинская ОА, Водякова МА, Мельникова ЕВ, Меркулов ВА. Терапия генетических заболеваний: актуальные направления разработки биомедицинских клеточных продуктов. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):225–232. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-225-232>

Контактное лицо: Рачинская Ольга Анатольевна; Rachinskaya@expmed.ru

Treatment of Genetic Diseases: Current Trends in the Development of Biomedical Cell Products

O. A. Rachinskaya^{1,*}, M. A. Vodyakova¹, E. V. Melnikova¹, 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

Genetic diseases are often progressive in nature, and without proper treatment may result in disability or death. Difficulties with diagnosis of genetic diseases and lack of effective treatment are global public health challenges. Medical care for patients with genetic diseases is often confined to symptomatic and palliative care. Starting from the 2000s, great hopes have been placed on cell-based medicinal products (which are referred to as biomedical cell products in the Russian legislation) and gene therapy products. The aim of the study was to review current trends in the development of biomedical cell products for the treatment of genetic diseases. The paper focuses on cell-based products for the treatment of monogenic genetic diseases, such as severe combined immunodeficiency (SCID), recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB), beta-haemoglobinopathies, alpha-1-antitrypsin deficiency, haemophilia A, and Duchenne muscular dystrophy. Such drugs are being developed in many countries and are now entering preclinical and different stages of clinical trials. Products based on various types of viable

cells, including differentiated cells, stem cells, induced pluripotent cells, as well as cells genetically modified *ex vivo*, may be developed for the treatment of one and the same disease. The main priority is the creation of such products that will obviate the need for replacement therapy or palliative care, and that will significantly increase life expectancy and quality of life.

Key words: biomedical cell products; genetic diseases; orphan diseases; gene therapy products; stem cells; induced pluripotent cells

For citation: Rachinskaya OA, Vodyakova MA, Melnikova EV, Merkulov VA. Treatment of genetic diseases: current trends in the development of biomedical cell products. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):225–232. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-225-232>

Corresponding author: Olga A. Rachinskaya; Rachinskaya@expmed.ru

На протяжении долгого эволюционного пути человечеством было приобретено около 6000–7000 редких заболеваний и расстройств. Международные определения редких (орфанных) (англ. rare disease, orphan disease) заболеваний различны. Например, в Соединенных Штатах заболевание считается «редким», если оно встречается менее чем у 200 тысяч человек¹, а в Европе — если уровень заболеваемости не превышает 10 случаев на 20 тысяч человек². В соответствии с российским законодательством к таким патологиям относятся заболевания, которые имеют распространенность не более 10 случаев на 100 тысяч населения³. В список орфанных болезней в России Минздравом России на 11 ноября 2019 года внесено 256 заболеваний⁴. Российский регистр людей с орфанными заболеваниями включает менее 30 тысяч человек, но, по оценкам экспертов, реальное число пациентов достигает 1,5 млн⁵.

Большинство редких заболеваний (до 80%) вызваны генетическими нарушениями, многие из которых являются наследственными и сопровождают человека на протяжении всей жизни, даже в случае позднего проявления симптомов. Если нарушения (замена нуклеотидов, небольшие дупликации, делеции, инверсии) затрагивают один ген, то речь идет о моногенных заболеваниях, которые, как правило, проявляются в уменьшении продуцирования клетками какого-либо белка или в снижении его активности. В настоящее время идентифицировано более 1000 генов, мутации в которых приводят к развитию заболеваний [1]. Если нарушения затрагивают большие районы или даже целые хромосомы (крупные структурные перестройки, изменение числа хромосом), то говорят о хромосомных болезнях. Такие патологии, как правило, характеризуются множественными клиническими проявлениями⁶.

На сегодняшний день из всего огромного числа генетических заболеваний методы лечения/лекарственные препараты существуют примерно для 300. Чаще всего медицинская помощь сводится к симптоматическому и паллиативному лечению. При этом диагностика с использованием молекулярно-генетических методов анализа и лечение таких заболеваний являются в основном дорогостоящими, и в постоянной терапии пациенты часто нуждаются на протяжении всей жизни. Кроме того, необходимо обратить внимание на то, что для лечения некоторых генетических заболеваний прибегают к пересадке костного мозга, что не всегда осуществимо вследствие отсутствия подходящего донора и большого числа возможных побочных явлений. Поэтому в последние пару десятилетий ак-

тивно ведутся разработки, проводятся доклинические (ДКИ) и клинические исследования (КИ) препаратов на основе клеточной и генной терапии, прежде всего, для лечения моногенных заболеваний. Разрабатываемые в настоящее время генотерапевтические препараты позволяют осуществлять точное воздействие на определенный ген благодаря появлению новых технологий коррекции генома и других биотехнологических подходов [2]. Большинство современных разработок в области терапии генетических заболеваний приходится на генотерапевтические препараты, с помощью которых осуществляют коррекцию генома *in vivo*.

Однако сходные механизмы генетических модификаций, основанные на применении векторных конструкций и систем редактирования генома, позволяют осуществить устранение гена с мутацией или внесение копии корректного гена в геном предварительно выделенных из организма донора клеток (генная терапия *ex vivo*). При этом зачастую различные векторные конструкции используют для трансдукции стволовых клеток (СК), например гемопоэтических стволовых клеток, для лечения различных орфанных заболеваний крови и обмена веществ. Препараты генной терапии *ex vivo* в соответствии с национальным законодательством отнесены к биомедицинским клеточным продуктам (БМКП)⁷. Область БМКП является новой для фармацевтического рынка Российской Федерации, в настоящее время ни один БМКП не зарегистрирован в нашей стране. Основываясь на опыте регуляторной практики применения подобных препаратов в мире, необходимо отметить, что они используются главным образом для терапии генетических заболеваний, для которых отсутствуют доступные методы/препараты лечения, направленные на устранение причины заболевания, а также для лечения онкологических заболеваний и жизнеугрожающих состояний. Учитывая сложность состава БМКП — наличие жизнеспособных клеток человека со своим набором генов и секретируемых факторов, существуют определенные риски применения БМКП в медицинской практике (главным образом проявление опухолевого и онкогенного потенциала) [3]. Поэтому разработка, проведение ДКИ и КИ БМКП представляют собой процесс значительно более сложный, трудоемкий, долгосрочный и дорогостоящий по сравнению с традиционными лекарственными препаратами. Что касается генетических заболеваний, дополнительными сдерживающими факторами для разработки БМКП в Российской Федерации являются незначительное количество пациентов и необходимость продолжительных КИ. В настоящее время

¹ Orphan Drug Act of 1983. US Food and Drug Administration. 4 January 1983. Retrieved 27 October 2015.

² www.orpha.net

³ Федеральный закон Российской Федерации от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

⁴ Перечень редких (орфанных) заболеваний. Минздрав России. <https://www.rosminzdrav.ru/documents/8048-perechen-redkih-orfannyh-zabolevaniy>

⁵ Попович ЛД. Нельзя подходить к космосу с линейкой. Редкие болезни в России. 2019;14:14–26.

⁶ Гинтер ЕК. Медицинская генетика. М.: Медицина; 2003.

⁷ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

в мире зарегистрировано два препарата на основе генетически модифицированных клеток человека для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с недостатком гена аденозиндезаминазы (Strimvelis, GSK)⁸, и для лечения β-талассемии (Zynteglo, bluebird bio)⁹.

Цель работы — обзор актуальных направлений разработки препаратов на основе жизнеспособных клеток человека (биомедицинских клеточных продуктов) для лечения генетических заболеваний. В рамках поставленной цели были рассмотрены возможные способы терапии некоторых генетических заболеваний с помощью разных типов клеток, в том числе генетически модифицированных, а также приведены результаты исследований эффективности применяемых клеточных препаратов.

Клеточная терапия тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID)

Первый генотерапевтический препарат *ex vivo* был применен для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита (severe combined immunodeficiency, SCID), вызванного недостаточностью фермента аденозиндезаминазы (adenosine deaminase, ADA) [4, 5]. К развитию заболевания приводят мутации в гене, кодирующем фермент ADA, что проявляется в снижении иммунитета и появлении осложнений, связанных с нарушением обмена веществ. До появления генотерапевтических препаратов единственным способом лечения SCID с дефицитом ADA, приводящим к полному выздоровлению, была аллогенная трансплантация костного мозга (КМ) от родственников реципиента с идентичным главным комплексом гистосовместимости (Human Leukocyte Antigens, HLA). В случае отсутствия подходящих доноров пациентам осуществляли заместительную терапию бычьей аденозиндезаминазой, конъюгированной с полиэтиленгликолем, которая не могла привести к долговременному восстановлению иммунитета [6].

Генотерапевтический препарат *ex vivo* для лечения SCID основан на применении системы переноса гена фермента ADA с помощью ретровирусного вектора в лимфоциты периферической крови [7]. При этом было показано, что, несмотря на заметные улучшения состояния больных (восстановление иммунитета, исчезновение симптомов сопутствующих заболеваний, отказ от заместительной терапии), уровень фермента ADA у них в крови был недостаточным для полного исчезновения токсичных метаболитов, образующихся в результате нарушения обмена веществ [8]. Поэтому перенос гена фермента стали осуществлять в плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки, что позволило существенно увеличить число клеток с корректированным геномом, способных к пролиферации и передаче генетической конструкции в дочерние клетки. Последующее совершенствование процедуры генной терапии, например применение цитокинов, использование ретронектина для увеличения проникающей способности вектора в клетку, привело к долгосрочной ремиссии заболевания и прекращению какого-либо лечения у пациентов [9].

В 2016 году Европейским агентством по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) было выдано разрешение на коммерческое использование генотерапевтического препарата Strimvelis (Orchard Therapeutics (Netherlands)

BV) пациентам, для которых отсутствует подходящий HLA-идентичный донор. Препарат представляет собой фракцию клеток, содержащую аутологичные CD34⁺ клетки, трансдуцированные ретровирусным вектором GSK3336223, несущим последовательность кДНК ADA человека, полученную из гемопоэтических CD34⁺ стволовых клеток здоровых доноров. Strimvelis относится к группе препаратов — иммуностимуляторов. Клетки препарата трансплантируются в КМ пациента, где они восстанавливают гемопоэтическую систему, экспрессируя активный фермент ADA. После успешного приживления клеток у пациентов возможен пожизненный терапевтический эффект¹⁰.

В результате трехлетнего открытого клинического исследования в общей сложности 18 пациентов разных рас в возрасте до 6 лет (12 пациентов в основном исследовании), для которых не было возможности подобрать донора и у которых не было адекватного ответа на заместительную терапию бычьей ADA, прошли лечение с помощью Strimvelis. Терапия привела к 100 % выживанию пациентов через 7 лет, снижению тяжести сопутствующих инфекционных заболеваний, увеличению числа Т-лимфоцитов (CD3⁺) и снижению содержания дезоксиаденозина в венозных эритроцитах ниже патологического уровня. После лечения Strimvelis 7 человек (58 %) не нуждались в терапии иммуноглобулинами в течение трех лет¹¹.

Клеточная терапия рецессивного дистрофического буллезного эпидермолиза (RDEB)

Ярким примером заболевания, для лечения которого признаются перспективы клеточной терапии в целом и генотерапии *ex vivo* в частности является рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз (recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB) — тяжелое наследственное кожное заболевание, вызванное рецессивными мутациями в гене Col7a1, кодирующем коллаген VII типа (C7), который имеет большое значение для формирования устойчивого контакта между слоями дермы и эпидермиса. Нарушение контакта приводит к появлению пузырей и эрозий на коже и слизистых оболочках. Кроме того, дефект коллагена VII типа ассоциирован с хронической анемией и остеопатией, а также с повышением вероятности развития тяжелых осложнений, в том числе плоскоклеточного рака кожи. На сегодняшний день медицинская помощь для пациентов с RDEB сводится в основном к паллиативному лечению, направленному на облегчение симптомов заболевания и защиту от инфекций, попадающих через дефекты кожи. При образовании контрактур проводится оперативное лечение [10].

Тем не менее разработаны способы лечения, основанные на аутологичной и аллогенной трансплантации клеток кожи, зачастую прошедших стадию культивирования. Так, способность заживления кожных ран при RDEB была показана для аллогенных фибробластов, синтезирующих коллаген VII типа, при этом обладающих низкой иммуногенностью и полностью элиминирующихся из организма реципиента в течение двух недель [11]. Более высокая эффективность препарата отмечалась у пациентов с RDEB, у которых сохранялся некоторый базовый уровень экспрессии белка C7 [12].

⁸ Annex 1 — summary of product characteristics. EMA. https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information_en.pdf

⁹ Annex 1 — summary of product characteristics. EMA. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information_en.pdf

¹⁰ Annex 1 — summary of product characteristics. EMA. https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information_en.pdf

¹¹ Там же.

Для лечения трудноизлечимых язвенных поражений кожи у пациентов с RDEB также применяли Apligraf (Organogenesis, Canton, MA, USA), который представляет собой дермальный эквивалент из кератиноцитов и фибробластов на бычьем коллагене. Первоначально препарат использовался для лечения диабетических язв, впоследствии был многократно применен для лечения разных подтипов буллезного эпидермолиза [13]. Например, одним из первых описан случай лечения новорожденной девочки с генерализованным подтипом RDEB с эрозиями, затрагивающими 80 % кожных покровов. Кожный эквивалент помещался на участки кожи ног, ягодиц и рук с наибольшим числом булл и эрозий. Значительные улучшения состояния кожных покровов в местах трансплантации наблюдались уже через 3 суток. Повторного образования булл и эрозий кожи в местах трансплантации не отмечалось на протяжении периода наблюдения (6 недель). У девочки также не обнаруживались признаки развития инфекции и сепсиса [14].

Для лечения буллезного эпидермолиза также имеется опыт применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК). МСК обладают способностью мигрировать в поврежденные участки ткани и стимулировать регенерацию, выделяя различные факторы роста и цитокины, при последующей полной элиминации клеток из организма [15]. Эффективность от введения МСК при RDEB была впервые зарегистрирована у 13-летнего и 25-летнего пациентов из Чили в 2010 году. Оба пациента имели клинически выраженное образование булл на фоне полного отсутствия экспрессии белка C7. Используемые для лечения МСК были аллогенными, полученными из КМ донора, и подкожно вводились как в интактные, так и в поврежденные участки кожи, что приводило к сокращению раневых поверхностей через 12 недель. Новообразованный коллаген обнаруживался между эпидермисом и дермой, что свидетельствовало о возможности экспрессии белка C7 *de novo*. Однако терапевтический эффект сохранялся лишь в течение 4 месяцев, после чего свойства кожных покровов становились исходными [16].

Еще один тип клеточной терапии, разрабатываемый для лечения RDEB, — лечение ревертантными кератиноцитами. У пациентов с наследственными заболеваниями кожи иногда спонтанно появляются участки с нормальной кожей, где преобладают ревертантные клетки — клетки, геном которых вторично потерял мутацию, приводящую к заболеванию. Это явление получило название «ревертантный мозаицизм» или «естественная генная терапия» [17]. Накопление кератиноцитов, выделенных из участка кожи с ревертантными клетками, позволяет осуществлять персонализированную и специфичную для пациентов форму терапии. В культуре клеток или в сформированных эпидермальных лоскутах содержится 30 % ревертантных кератиноцитов, однако после трансплантации в участки с поврежденной кожей остается только 3 % таких клеток. Несмотря на это, трансплантация ревертантных кератиноцитов осуществлялась, при этом было продемонстрировано устойчивое улучшение состояния кожи пациентов: заживление кожи в участках трансплантации. Однако отмечалось повторное образование булл [18].

В настоящее время ведутся разработки препаратов с использованием клеток с индуцированной плюрипотентностью (induced pluripotent stem cells, iPSCs), полученных из ревертантных кератиноцитов, которые в дальнейшем могут быть дифференцированы в любые необходимые типы клеток, включая кератиноциты [19, 20].

Существуют попытки терапии различных типов буллезного эпидермолиза генетически модифицированными *ex vivo* клетками, которые могут быть трансплантированы пациенту в форме кожных эквивалентов, а также с помощью внутривенных инъекций. При этом трансдуцированные эпидермальные стволовые клетки и фибробласты демонстрируют свой потенциал к делению и пролиферации, обеспечивая возможность долгосрочной экспрессии белков, необходимых для формирования нормальной структуры дермы и эпидермиса¹².

Первое КИ такого препарата было проведено для генетически модифицированных *ex vivo* эпидермальных СК, трансдуцированных вектором на основе ретровируса, содержащим ген LAMB3, ответственный за экспрессию гликопротеина ламинина-332. Наблюдения на протяжении восьми лет показали устойчивый синтез белка ламинина-332 и отсутствие в участках трансплантации булл, воспаления и опухолей [21].

Приживление кожных эквивалентов, содержащих клетки, трансдуцированные вектором на основе гамма-ретровируса, несущим полноразмерный ген Col7a1, через 3 месяца приводило к увеличению экспрессии белка C7 в 90 % трансплантированных участков, через 6 месяцев — в 66 %, через 12 месяцев — в 42 %. Отмечалось уменьшение кожных повреждений в течение года [22].

С целью снижения рисков инсерционного мутагенеза вирусные векторные конструкции подвергались модификации — появилось новое поколение самоинактивирующихся (SIN) вирусных векторов, не способных активировать гены трансдуцированных клеток. Использование такой векторной конструкции привело к трансдукции 95 % клеток и позволило получить стойкий синтез белка C7 в течение 5 месяцев *in vitro* [23].

В настоящее время разработан препарат, представляющий собой трансплантат аутологичного кожного эквивалента. Трансплантаты изготавливаются из клеток-предшественников кератиноцитов и фибробластов (эпидермальных стволовых клеток), генетически исправленных с помощью безопасного (SIN) ретровирусного вектора, экспрессирующего коллаген VII типа под контролем промотора EF1alpha. Используемый SIN-вектор был охарактеризован EUFETS (BioNTech IMFS, Германия) и назван pCMS-EF1.COL7A1.SIN1 (E890)¹³.

Следует отметить, что были разработаны и другие системы трансфекции, например на основе фагов, демонстрирующие более низкий трансфекционный потенциал по сравнению с векторами на основе ретровирусов, что компенсировалось последующим культивированием и отбором трансдуцированных клеток. При этом отмечалось устойчивое продуцирование белка C7 несколькими поколениями фибробластов на протяжении 14 недель в культуре клеток, а также в коже [24].

Клеточная терапия β-гемоглобинопатий

β-гемоглобинопатии, которые включают β-талассемию и серповидноклеточную анемию, являются одними из самых распространенных моногенных заболеваний в мире [25]. β-талассемию могут вызвать более 200 различных мутаций в гене глобина HBB, который кодирует бета-цепь гемоглобина А человека. Мутации в этом гене приводят или к снижению (β+), или к полному отсутствию (β0) синтеза β-глобина, что обуславливает возникновение мишеневидных форм эритроцитов, нарушение эритропоэза, хронический гемолиз и тяжелую анемию [26]. При самых тяжелых клинических проявлениях заболевания пациенты нуждаются в постоянном переливании

¹² Phase I/II *ex vivo* gene therapy clinical trial for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using skin equivalent grafts genetically corrected with a COL7A1-encoding SIN retroviral vector. GENEGRAFT Project. CORDIS. European Commission. https://cordis.europa.eu/project/rcn/98248_en.html

¹³ Там же.

эритроцитарной массы и сопутствующей терапии, направленной на хелирование избытков железа, возникающих при частых переливаниях крови. На данный момент единственным вариантом лечения, приводящим к полному излечению заболевания, является аллогенная пересадка костного мозга [27].

Сложность подбора доноров и риски, связанные с трансплантацией, ограничивают широкое использование аллогенных гемопоэтических клеток пациентам с β -талассемией. Эту проблему, а также необходимость регулярного переливания эритроцитарной массы можно решить, используя векторные конструкции, кодирующие функционально-активные формы β -глобина. Так, аутологичные CD34⁺ гемопоэтические клетки, трансдуцированные *ex vivo* с помощью вектора LentiGlobin BB305, который несет ген гемоглобина взрослого человека с аминокислотной заменой T87Q (HbAT87Q), вводили в кровь пациентам с разным генотипом, в том числе с генотипом β^0/β^0 [28]. Терапия привела к снижению или даже полному отказу пациентов от переливания крови, увеличению уровня HbAT87Q и общего гемоглобина. У пациентов также отмечалась коррекция биологических маркеров дизэритропоэза [29].

Другой вид β -гемоглобинопатии — серповидноклеточная анемия возникает в результате гомозиготной миссенс-мутации (замены) в одном из экзонов гена β -глобина (HBB) (Glu6Val), что приводит к образованию аномального гемоглобина S [30]. В условиях гипоксии гемоглобин S полимеризуется, в результате чего эритроциты приобретают серповидную форму. У больных наблюдаются болезненные вазоокклюзивные кризы, приводящие к повреждению разных органов, снижению качества и продолжительности жизни [31].

На сегодняшний день единственным одобренным видом терапии серповидноклеточной анемии является применение гидроксимочевина — цитотоксического соединения, способного приводить к повышению уровня фетального гемоглобина. Для некоторых пациентов, страдающих этим заболеванием, возможно лечение с помощью аллогенной трансплантации гемопоэтическими стволовыми клетками [32].

Несколько лет назад подход, разработанный для лечения β -талассемии, был применен и для лечения пациента с серповидноклеточной анемией — 13-летнего мальчика с генотипом β^S/β^S с осложненным клиническим анамнезом. В связи с низкой чувствительностью к терапии дезоксимочевиной пациенту регулярно проводилось переливание эритроцитарной массы с хелированием железа. Введение пациенту аутологичных CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток, полученных из КМ и трансдуцированных самоинактивирующимся лентивирусным вектором LentiGlobin BB305, несущим ген β -глобина (человеческий вариант HBB β A-T87Q), привело к значительному увеличению уровня β -глобина и отсутствию рецидивов заболевания. В результате терапии биохимические параметры крови пришли в норму, и переливание эритроцитарной массы было прекращено на 88 сутки после трансплантации. Пациент был выписан на 50 сутки после трансплантации, и повторных госпитализаций, связанных с заболеванием, у него не было на протяжении более 15 месяцев [33].

В июне 2019 года ЕМА было выдано разрешение на коммерческое использование препарата на основе аутологичных генетически модифицированных CD34⁺ клеток, содержащих корректную копию гена β A-T87Q-глобина, под торговым названием Zynteglo (bluebird bio). Препарат предназначен для пациентов старше 12 лет, нуждающихся в регулярном переливании крови и для которых отсутствует донор для пересад-

ки КМ. Так же, как в случае с препаратом Strimvelis, клетки препарата Zynteglo трансплантируются в КМ пациента, где они восстанавливают гемопоэтическую систему. При применении препарата ожидается пожизненный терапевтический эффект¹⁴.

Таким образом, эффект при лечении генетических заболеваний с помощью клеток, модифицированных векторной конструкцией, достигается путем трансфекции в клетку гена, экспрессирующего функционально-активный белок, недостаток которого и приводит к развитию заболевания. Другой стратегией лечения генетических заболеваний с помощью *ex vivo* генотерапевтических препаратов является применение модифицированных с помощью различных систем редактирования генома клеток, в которых выключены или изменены аномальные гены.

Клеточная терапия дефицита альфа-1-антитрипсина

Дефицит альфа-1-антитрипсина (A1AT, также известного как SERPINA1) — генетически детерминированное заболевание, вызванное недостаточностью белка A1AT в сыворотке крови и проявляющееся в виде хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), эмфиземы легких, поражения печени и сосудов. Белок A1AT — это ингибитор сериновой протеазы, в основном экспрессируемый и секретируемый гепатоцитами и защищающий соединительную ткань от деградации нейтрофильной эластазой и другими протеазами [34]. Дефицит A1AT является аутосомно-рецессивным заболеванием, обнаруживаемым у 1 из 2000 европейцев, и представляет собой наиболее распространенное наследственное заболевание обмена, приводящее к поражению печени [35]. В основе заболевания лежит единственная точечная мутация (Glu342Lys) в гене, кодирующем белок A1AT. В настоящее время единственным способом лечения является пересадка печени. Растущая нехватка доноров и отрицательные эффекты иммуносупрессивного лечения накладывают серьезные ограничения на трансплантацию органов, что делает применение индуцированных плюрипотентных клеток человека весьма привлекательным для терапии генетического заболевания, связанного с дефицитом A1AT.

K. Yusa с соавт. [36] применили систему коррекции генома ZFN совместно с *piggyBac*-технологией в iPSCs для биллельной коррекции точечной мутации в гене A1AT. Транспозон *piggyBac* выделен из клеток *Trichoplusia ni*, может эффективно транспонироваться в геном клеток млекопитающих и осуществлять бесшовное удаление участков ДНК, окруженных инвертированными повторами (inverted terminal repeat sequences, ITRs) [37]. iPSCs с скорректированным геномом дифференцировали *in vitro* в гепатоцитоподобные клетки. Полученные клетки секретируют белок A1AT, который проявлял ферментативную ингибирующую активность, сравнимую с активностью фермента из нормальных гепатоцитов. Полученные iPSCs через 14 суток после инъекции в печень мышей демонстрировали способность дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки, которые были способны заселять печень *in vivo* и проявлять функциональную активность [36].

Клеточная терапия гемофилии А

Гемофилия А — одно из наиболее распространенных генетических заболеваний, вызванное мутациями в гене фактора свертывания крови VIII (F8), локализованном в хромосоме X.

¹⁴ Annex 1 — summary of product characteristics. EMA. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information_en.pdf

В зависимости от видов мутаций выделяют три степени тяжести протекания заболевания, которые связаны с количеством и активностью фактора VIII в крови: легкий (активность фермента варьирует от 5 до 30% от нормы), умеренный (активность фермента варьирует от 2 до 5% от нормы) и тяжелый (активность фермента составляет менее 1% от нормы). Почти половина всех случаев тяжелой гемофилии А является результатом двух грубых хромосомных инверсий размером 140 т.п.н. в области интрона 1 (int1h-1/int1h-2) и 600 т.п.н. в области интрона 22 (int22h-1/int22h-2.3) гена F8 [38].

Для лечения данного генетического заболевания было предложено осуществить восстановление нормальной последовательности нуклеотидов в инвертированном участке с помощью системы CRISPR/Cas9 — РНК-направляемых нуклеаз (RNA-guided engineered nucleases, RGENs) в iPSCs. Эндотелиальные клетки, дифференцированные из iPSCs с отредактированным геном F8, были способны экспрессировать активный фактор свертывания крови VIII и приводить к устранению его дефицита в крови иммунодефицитных мышей. У мышей, которым трансплантировали клетки с отредактированным геном, наблюдалось значительное увеличение продолжительности жизни и более высокие показатели активности фактора VIII [39].

Клеточная терапия мышечной дистрофии Дюшенна

Возможность использования системы CRISPR/Cas9 предлагается для лечения другого генетического заболевания — мышечной дистрофии Дюшенна (МДД). МДД — наиболее распространенное детское, чаще встречающееся у мальчиков генетическое заболевание с летальным исходом, сцепленное с хромосомой X. Заболевание вызывается различными мутациями, в том числе точечными делециями и дупликациями, в экзонных областях (чаще в экзонах 45–55) гена дистрофина, приводящими к сдвигу рамки считывания, что проявляется в изменении структуры или снижении количества белка дистрофина в клетках мышечной ткани [40]. Функция дистрофина в мышечных волокнах заключается в стабилизации сарколеммы за счет образования дистрофин-ассоциированного гликопротеинового (ДАГ) комплекса, при деградации которого происходит нарушение целостности клеточной мембраны с последующей дегенерацией мышечных волокон.

В настоящее время не существует высокоэффективных методов лечения МДД, есть лишь способы замедления скорости прогрессирования заболевания. Однако ведутся разработки клеточной и генной терапии, которые позволяют восстановить синтез дистрофина либо путем встраивания в клетки нормального гена дистрофина, либо с помощью коррекции мутации в самом гене дистрофина или в его мРНК [41]. Многочисленные доклинические и клинические исследования продемонстрировали, что удаление из гена экзонов 45–55 приводит к частичному исправлению структуры дистрофина и к более легкому течению заболевания по типу мышечной дистрофии Беккера, при котором симптомы заболевания могут не проявляться даже к 60 годам [40].

Именно на удаление экзонов 45–55 с последующим негомологичным соединением концов ДНК направлена система коррекции генома на основе CRISPR/Cas9. В результате ее действия происходит устранение сдвига рамки считывания и экспрессия стабильного и функционально-активного белка DYS45–55. Полученная система была применена к клеткам iPSCs, полученным из фибробластов людей с миодистрофией, с последующей их дифференцировкой в кар-

диомиоциты и клетки скелетных мышц. Клетки скелетных мышц, полученные из iPSCs, инъецированные в переднюю большеберцовую мышцу иммунодефицитных мышей, секретируют дистрофин и β -дистрогликан правильной структуры, что приводило к образованию функционально-активного ДАГ комплекса [42].

Кроме подхода с использованием генотерапевтических препаратов для лечения МДД с 1990-х годов проводятся клинические исследования внутримышечных инъекций СК людям. Так, при введении миобластов, полученных путем культивирования из биопсии мышечной ткани здоровых доноров, в мышцы-разгибатели стопы и пальцев, у пациентов с МДД отмечалось увеличение изометрической силы и произвольных сокращений мышц [43]. В другом исследовании проводили имплантацию в переднюю большеберцовую мышцу культивированных миобластов, полученных от здоровых доноров. Гистологическое и молекулярно-биологическое исследование биопсийного материала подтвердили увеличение числа мышечных волокон, экспрессирующих донорский дистрофин [44].

Заключение

Таким образом, клеточные препараты (БМКП), в том числе генотерапевтические *ex vivo*, в настоящее время все больше применяются для терапии моногенных генетических заболеваний. Интерес к разработке БМКП, содержащих генетически модифицированные клетки, обусловлен проблемами лечения генетических заболеваний, связанными с отсутствием совместимого донора для пересадки костного мозга, отсутствием препаратов/методов лечения или ответа на стандартное лечение (в частности, на заместительную терапию). Разработки подобных препаратов осуществляются во многих странах и находятся на разных стадиях: ДКИ и разные фазы КИ. Для одного заболевания могут разрабатываться различные подходы к лечению с применением БМКП, основанных на разных типах жизнеспособных клеток: дифференцированных, СК и фибробластов, iPSCs, а также *ex vivo* генетически модифицированных. Генетическая модификация выделенных из организма клеток может заключаться в исправлении дефектного гена либо его нокауте, а также внесении в клетку корректной копии гена. Именно использование генотерапевтических препаратов, в том числе для генной терапии *ex vivo*, позволит добиться долгосрочного эффекта и устойчивой ремиссии заболевания. Целью дальнейшей разработки и совершенствования таких препаратов является отказ от проведения заместительной терапии или паллиативного лечения, а также существенное продление продолжительности и качества жизни пациентов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР AAAA-A18-118021590045-2).

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 «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590045-2).

Конфликт 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

- Gutmacher AE, Collins FS. Genomic medicine — a primer. *N Engl J Med*. 2002;347(19):1512–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMra012240>
- Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet*. 2008;371(9629):2044–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60874-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60874-0)
- Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Рачинская ОА, Чапленко АА, Меркулов ВА, Олефир ЮВ и др. Современные подходы к проведению оценки качества препаратов для клеточной терапии. *Биофармацевтический журнал = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2016;8(4):35–46. [Melnikova EV, Merkulova OV, Rachinskaya OA, Chaplenko AA, Merkulov VA, Olefir YuV, et al. Modern approaches to the assessment of the quality control of cell-therapy products. *Biopharmaceuticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2016;8(4):35–46 (In Russ.)]
- Abbott A. Italians first to use stem cells. *Nature*. 1992;356(6369):465. <https://doi.org/10.1038/356465a0>
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science*. 1995;270(5235):470–5. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.470>
- Chan B, Wara D, Bastian J, Hershfield MS, Bohnsack J, Azen CG, et al. Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for Adenosine deaminase (ADA)-deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID). *Clin Immunol*. 2005;117(2):133–43. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.07.006>
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270(5235):475–80. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>
- Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, Casorati G, Ficara F, Andolfi G, et al. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med*. 2002;8(5):423–5. <https://doi.org/10.1038/nm0502-423>
- Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002;296(5577):2410–3. <https://doi.org/10.1126/science.1070104>
- Rashidghamat E, McGrath JA. Novel and emerging therapies in the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Intractable Rare Dis Res*. 2017;6(1):6–20. <https://doi.org/10.5582/iridr.2017.01005>
- Wong T, Gammon L, Liu L, Mellerio JE, Dopping-Hepenstal PJ, Pacy J, et al. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2008;128(9):2179–89. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.78>
- Nagy N, Almaani N, Tanaka A, Lai-Cheong JE, Techanukul T, Mellerio JE, McGrath JA. HB-EGF induces COL7A1 expression in keratinocytes and fibroblasts: possible mechanism underlying allogeneic fibroblast therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1771–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.85>
- Natsuga K, Sawamura D, Goto M, Homma E, Goto-Ohguchi Y, Aoyagi S, et al. Response of intractable skin ulcers in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients to an allogeneic cultured dermal substitute. *Acta Derm Venereol*. 2010;90(2):165–9. <https://doi.org/10.2340/00015555-0776>
- Falabella AF, Schachner LA, Valencia IC, Eaglstein WH. The use of tissue-engineered skin (Apligraf) to treat a newborn with epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*. 1999;135(10):1219–22. <https://doi.org/10.1001/archderm.135.10.1219>
- Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther*. 2009;17(6):939–46. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.62>
- Conget P, Rodriguez F, Kramer S, Allers C, Simon V, Paillasson F, et al. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intra-dermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*. 2010;12(3):429–31. <https://doi.org/10.3109/14653241003587637>
- Jonkman MF, Scheffer H, Stulp R, Pas HH, Nijenhuis M, Heeres K, et al. Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell*. 1997;88(4):543–51. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81894-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81894-2)
- Gostynski A, Deviaene FC, Pasmooij AM, Pas HH, Jonkman MF. Adhesive stripping to remove epidermis in junctional epidermolysis bullosa for revertant cell therapy. *Br J Dermatol*. 2009;161(2):444–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09118.x>
- Tolar J, McGrath JA, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide C, et al. Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2014;134(5):1246–54. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.523>
- Umegaki-Arao N, Pasmooij AM, Itoh M, Cerise JE, Guo Z, Levy B, et al. Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med*. 2014;6(264):264ra164. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009342>
- De Rosa L, Carulli S, Cocchiarella F, Quaglini D, Enzo E, Franchini E, et al. Long-term stability and safety of transgenic cultured epidermal stem cells in gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Stem Cell Reports*. 2013;2(1):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.001>
- Siprashvili Z, Nguyen NT, Gorell ES, Loutit K, Khuu P, Furukawa LK, et al. Safety and wound outcomes following genetically corrected autologous epidermal grafts in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JAMA*. 2016;316(17):1808–17. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.15588>
- Titeux M, Pendaries V, Zanta-Boussif MA, Décha A, Pironon N, Tonasso L, et al. SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther*. 2010;18(8):1509–18. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.91>
- Ortiz-Urda S, Lin Q, Green CL, Keene DR, Marinkovich MP, Khavari PA. Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue. *J Clin Invest*. 2003;111(2):251–5. <https://doi.org/10.1172/JCI17193>
- Piel FB. The present and future global burden of the inherited disorders of hemoglobin. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(2):327–41. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.11.004>
- Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010;12(2):61–76. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed>
- Lucarelli G, Isgrò A, Sodani P, Gaziev J. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(5):a011825. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011825>
- Takekoshi KJ, Oh YH, Westerman KW, London IM, Leboulch P. Retroviral transfer of a human beta-globin/delta-globin hybrid gene linked to beta locus control region hypersensitive site 2 aimed at the gene therapy of sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(7):3014–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.3014>
- Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JEJ, Ribeil JA, Hongeng S, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent β -thalassemia. *N Engl J Med*. 2018;378(16):1479–93. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705342>
- Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*. 1956;178(4537):792–4. <https://doi.org/10.1038/178792a0>
- Strouse JJ, Lanzkron S, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: a sys-

- tematic review for efficacy and toxicity in children. *Pediatrics*. 2008;122(6):1332–42. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0441>
32. Krishnamurti L, Abel S, Maiers M, Flesch S. Availability of unrelated donors for hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31(7):547–50. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703887>
33. Badat M, Davies J. Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2017;376(21):2093–4. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1704009>
34. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(8):2136–41.
35. Gooptu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:147–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082107.133320>
36. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, et al. Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;478(7369):391–6. <https://doi.org/10.1038/nature10424>
37. Wang W, Lin C, Lu D, Ning Z, Cox T, Melvin D, et al. Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(27):9290–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801017105>
38. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*. 2005;6(6):488–501. <https://doi.org/10.1038/nrg1617>
39. Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, et al. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2015;17(2):213–20. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.001>
40. Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, Hamroun D, Humbertclaude V, Monnier N, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63 % of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat*. 2007;28(2):196–202. <https://doi.org/10.1002/humu.20428>
41. Wilton SD, Lloyd F, Carville K, Fletcher S, Honeyman K, Agrawal S, Kole R. Specific removal of the nonsense mutation from the *mdx* dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord*. 1999;9(5):330–8. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(99\)00010-3](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(99)00010-3)
42. Young CS, Hicks MR, Ermolova NV, Nakano H, Jan M, Younesi S, et al. A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18(4):533–40. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.021>
43. Law PK, Goodwin TG, Fang Q, Duggirala V, Larkin C, Florendo JA, et al. Feasibility, safety, and efficacy of myoblast transfer therapy on Duchenne muscular dystrophy boys. *Cell Transplant*. 1992;1(2-3):235–44. <https://doi.org/10.1177/0963689792001002-305>
44. Skuk D, Goulet M, Roy B, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, et al. Dystrophin expression in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(4):371–86. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218443.45782.81>

Об авторах / Authors

Рачинская Ольга Анатольевна, канд. биол. наук. Olga A. Rachinskaya, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9555-1950>

Водякова Марина Андреевна. Marina A. Vodyakova. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6008-0554>

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 26.09.2019

После доработки 13.11.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 26 September 2019

Revised 13 November 2019

Accepted 22 November 2019

Разработка фармакопейных стандартов качества на лекарственные препараты — бактериофаги

Т. М. Каргина^{1,*}, Е. И. Саканян², Д. С. Давыдов¹, Р. Л. Парфенюк¹

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

²Акционерное общество «Научно-производственное объединение
по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»,
1-я Дубровская ул., д. 15, стр. 2, Москва, 115088, Российская Федерация

Лечебно-профилактические бактериофаги — современные безопасные эффективные лекарственные средства, предназначенные для терапии кишечных инфекций и гнойно-воспалительных заболеваний. Возможность адаптировать вирулентные фаги к антибиотикоустойчивым бактериальным штаммам делает перспективным использование этой группы лекарственных средств при лечении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Разработка стандартов качества на препараты бактериофагов позволит унифицировать требования к показателям их качества и методам контроля. Необходимо отметить, что в зарубежных фармакопеях монографии на препараты бактериофагов не представлены. В связи с этим весьма актуальной и своевременной стала разработка общих фармакопейных статей (ОФС) на группы методов контроля качества бактериофагов и фармакопейных статей (ФС) на бактериофаги и включение их в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ). Цель работы — разработка фармакопейных стандартов качества на препараты лечебно-профилактических бактериофагов, зарегистрированные на территории России, для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации. В результате анализа ФС предприятий и технологических регламентов на лечебно-профилактические препараты бактериофагов, выпускаемые в Российской Федерации, были выявлены единые технологические этапы производства препаратов бактериофагов в соответствии с требованиями GMP, критерии подбора штаммов бактериофагов и производственных штаммов бактерий, определены условия их культивирования и хранения, стандартизированы показатели качества бактериофагов, методы определения которых приведены в соответствии с методиками ГФ РФ XIV изд. Приведены методы определения подлинности и специфической активности бактериофагов. Основные положения этой работы вошли в ОФС Бактериофаги и ФС на отдельные препараты бактериофагов, которые были включены в действующую ГФ РФ. Дальнейшие исследования и разработка новых стандартов качества на моно- и комплексные препараты бактериофагов, а также успешное применение их в медицинской практике повысят эффективность профилактики и лечения различных инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: бактериофаги; лекарственные препараты; общая фармакопейная статья; фармакопейная статья; методы испытания; показатели качества

Для цитирования: Каргина ТМ, Саканян ЕИ, Давыдов ДС, Парфенюк РЛ. Разработка фармакопейных стандартов качества на лекарственные препараты — бактериофаги. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):233–241. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-233-241>

***Контактное лицо:** Каргина Татьяна Михайловна; kargina@expmed.ru

Elaboration of Pharmacopoeial Quality Standards for Bacteriophage Products

T. M. Kargina^{1,*}, E. I. Sakanyan², D. S. Davydov¹, R. L. Parfenyuk¹

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

²Scientific and Production Association for
Immunological Preparations «Microgen»,
15/2 1st Dubrovskaya St., Moscow 115088, Russian Federation

Bacteriophages are novel safe and efficacious medicinal products that are used for treatment of intestinal infections and purulent inflammations. The fact that virulent phages can be adapted to fight antibiotic-resistant bacterial strains makes this group of medicines a promising means of treatment of infections associated with medical interventions. The elaboration of quality standards for bacteriophage products will enable alignment of the quality requirements and test methods. There are no monographs on bacteriophage products in pharmacopoeias of other countries, therefore, the development of general chapters on groups of test methods used in bacteriophage quality control and monographs on bacteriophages for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (Ph. Rus.)

was a very relevant and timely initiative. The aim of the study was to elaborate pharmacopoeial quality standards for bacteriophages approved in the Russian Federation for therapeutic and prophylactic indications. The authors of the study analysed product specification files and master production records for bacteriophages produced in the Russian Federation. They determined common GMP-compliant production steps, the selection criteria for bacteriophage strains and bacteria production strains, and cultivation and storage conditions. The authors standardised bacteriophage quality parameters and brought the test methods in line with the test procedures described in the Ph. Rus., 14th ed. The study summarised test methods used for identification of bacteriophages and determination of their specific activity. The main results of the study were included into the general monograph «Bacteriophages» and individual monographs on bacteriophage products that were included into the current edition of the Ph. Rus. Further studies and elaboration of new quality standards for mono- and multicomponent bacteriophage products, and the use of such products in clinical practice will improve prophylaxis and treatment of various infectious diseases.

Key words: bacteriophages; medicinal products; general chapter; general monograph; monograph; test methods; quality parameters

For citation: Kargina TM, Sakanyan EI, Davydov DS, Parfenyuk RL. Elaboration of pharmacopoeial quality standards for bacteriophage products. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):233–241. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-233-241>

***Corresponding author:** Tatyana M. Kargina; Kargina@expmed.ru

Успешный опыт многолетнего использования лечебно-профилактических бактериофагов, огромный практический интерес к созданию новых лекарственных форм и лекарственных препаратов, активных в отношении новых клинически значимых видов условно-патогенных микроорганизмов, привели к необходимости создания нормативных документов, имеющих государственный статус и являющихся обязательными для производства и применения этой группы лекарственных препаратов на территории Российской Федерации.

Качество, безопасность и эффективность — основные требования, которые предъявляются к любому зарегистрированному лекарственному средству. Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ) служит основным документом, содержащим совокупность методов анализа (физических, химических, биологических и т. д.), позволяющих установить качество лекарственного средства в соответствии с областью его применения.

Цель работы — разработка фармакопейных стандартов качества на препараты лечебно-профилактических бактериофагов, зарегистрированные на территории Российской Федерации, для последующего включения в Государственную фармакопею Российской Федерации.

Активное использование антибиотикотерапии привело к формированию у бактерий, возбудителей инфекционных заболеваний, резистентности к различным группам антибиотиков. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) считает антибиотикорезистентность одной из главных проблем XXI века в связи с тем, что для лечения большинства инфекционных заболеваний применение медикаментозной терапии станет невозможным¹.

Открытие био пленок как способа существования бактериального сообщества, дающего значительные микробиологические преимущества в выживании бактерий и часто являющегося причиной развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, приводит к необходимости использования в терапии бактериальных инфекций всей совокупности известных антибактериальных агентов: антибиотиков, бактериофагов, антисептиков [1–6].

Одной из важных составляющих в борьбе с антибиотикостойчивыми возбудителями инфекционных заболеваний является фаготерапия [7, 8].

Фаготерапия как направление в лечении кишечных и гнойно-септических инфекций возникла более 100 лет назад, после того как канадский ученый Феликс Д'Эрелль не только описал явление «бактериофагии», но и применил дизентерийные и холерные фаги в лечении больных².

1920–1940 гг. в Европе и в Советском Союзе характеризовались интенсивным изучением природы бактериофагов, многочисленными экспериментальными исследованиями на лабораторных животных и первыми опытами применения бактериофагов при лечении инфекционных болезней у людей³.

В СССР начиная с 1930-х годов проводили клинические исследования эффективности профилактического и терапевтического использования дизентерийного и брюшнотифозного бактериофагов⁴. Отработывали оптимальные способы введения бактериофагов, дозировку и кратность применения, условия проведения массовой профилактики среди населения в эпидемических очагах. В результате этих исследований дизентерийный бактериофаг был признан эффективным противозидемическим средством и рекомендован для широкого профилактического использования⁵. В начале 1940-х годов были получены бактериофаги против основных возбудителей хирургических инфекций — стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, протей и синегнойной палочки. Препараты бактериофагов, так называемые «раневые фаги», успешно использовали во время Великой Отечественной войны при лечении хирургических гнойных ран и послеоперационных осложнений, а применение анаэробных бактериофагов позволило снизить в 2,5 раза летальность от газовой гангрены [9–11].

После окончания Великой Отечественной войны в СССР было налажено промышленное производство лечебно-профилактических бактериофагов. В 1949 году президиумом Ученого медицинского совета Минздрава СССР были утверждены Инструкции по изготовлению и контролю жидких дизентерийного и брюшнотифозного бактериофагов. В Инструкциях были введены понятия маточные бактериофаги и коллекционные

¹ Устойчивость к антибиотикам. ВОЗ. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

² Д'Эрелль Ф. Бактериофаг и феномен выздоровления. Тифлис; 1935.

³ Сутин И.А. Бактериофаги и их применение в медицинской практике. Сталинград: Областное книгоиздательство; 1947.

⁴ Александров МБ, Дьякова АА, Райхельсон ЗА, Мельник ЕГ. Бактериофаготерапия брюшного тифа. Межинститутская конференция по бактериофагу. 21–25 декабря 1940 г. М.: 1940.

⁵ Мельник МИ, Хастович РИ. Бактериофаг при дизентерии. М.: Государственное медицинское издательство; 1935.

штаммы бактерий; сформулированы основные критерии, по которым осуществляется подбор фагов и бактериальных штаммов; указаны основные производственные этапы при изготовлении препаратов; обозначены условия культивирования и фильтрации; рекомендованы питательные среды; установлены сроки годности и режим хранения препаратов; определены основные качественные характеристики препаратов: стерильность, безвредность, литическая активность и описаны методы их определения.

В 1960–1970-х гг., когда на фоне успехов антибиотикотерапии в Европе и в странах Северной Америки от использования бактериофагов полностью отказались, в Советском Союзе продолжали вести активную научно-исследовательскую работу, направленную на улучшение качества дизентерийного и сальмонеллезного бактериофагов, усиления их вирулентности, расширения диапазона литической активности. Впервые был предложен метод лечения адаптированным бактериофагом, приготовленным с использованием клинических штаммов, проявляющих слабую чувствительность или резистентность к бактериофагу [12, 13]. В городах Горьком и Уфе на предприятиях были разработаны таблетированные формы дизентерийного, брюшнотифозного и сальмонеллезного бактериофагов.

В 1980–1990 годы область применения бактериофагов была расширена. В связи с ростом частоты и тяжести послеоперационных осложнений в форме сочетанных инфекций комплексной бактериальной этиологии большую востребованность приобрели комбинированные препараты, состоящие из бактериофагов, активных в отношении бактерий различных таксономических групп (стафилококки, стрептококки, кишечная палочка, протей, синегнойная палочка, клебсиелла). На предприятиях г. Уфы (ГУП «Иммунопрепарат», ДП «Биофаг») разработали, а затем наладили выпуск полибактериофагов (поливалентного и комбинированного). В это время проводились исследования по созданию новых лекарственных форм на основе известных бактериофагов клебсиелл и стафилококков (линименты, суппозитории, таблетки).

В связи с проблемой формирования у возбудителей инфекционных болезней устойчивости к большинству используемых в терапии антибиотиков здравоохранение все чаще обращается к фаготерапии, используя препараты бактериофагов как средства монотерапии или в комплексе с другими антимикробными средствами.

Бактериофаги находят успешное применение в акушерстве и гинекологии, педиатрии и урологии, в хирургии при лечении послеоперационных инфицированных ран [14–18]. В сочетании с другими антимикробными препаратами бактериофаги использовали у больных с ожоговыми ранами и у онкологических больных для профилактики и лечения инфекционных осложнений после операций [19, 20]. Высокая клиническая эффективность фаготерапии достигалась при применении адаптированных к условиям данного стационара бактериофагов [21, 22].

Бактериофаги представляют собой вирусы, которые являются специфическими инфекционными агентами бактерий. Они лишены клеточного строения и состоят только из генетического материала (ДНК или РНК), заключенного в белковую или липопротеиновую оболочку. Являясь внутриклеточными паразитами, они используют клетки бактерий для количественного воспроизведения. По характеру взаимодействия с бактериями фаги бывают умеренными и литическими (вирулентными). Умеренные фаги, проникая в бактериальную клетку, либо лизируют ее, либо вызывают состояние лизогении, при котором фаговый геном, встраиваясь в бактериальный геном

или присутствуя в виде плазмиды, передается последующим поколениям бактериальной клетки в процессе деления [23]. При существовании подобных симбиотических форм на протяжении длительного времени фаги могут придавать бактериям новые свойства.

Литические (вирулентные) фаги вызывают необратимые структурные изменения в бактериальной клетке, используя ее синтетический аппарат для воспроизведения собственных белковых структурных образований и генома. В результате формирования новых фаговых частиц происходит гибель и разрушение бактерии. Вышедшие фаговые частицы повторяют цикл развития на других бактериальных клетках, вызывая лизис культуры.

Среди преимуществ использования бактериофагов в лечебно-профилактических целях по сравнению с антибиотиками следует отметить следующие:

- бактериофаги специфичны, то есть их литическая активность проявляется в отношении определенного вида или рода микроорганизмов;
- бактериофаги часто высокоактивны в отношении бактерий, обладающих устойчивостью к антибиотикам;
- бактериофаги свободно проникают в ткани организма человека и животного;
- результаты исследований бактериофагов *in vivo*, длительная практика их клинического применения указывают на незначительное количество возможных нежелательных реакций;
- бактериофаги не вызывают побочных эффектов, не подавляют рост индигенной симбиотической микрофлоры, не ослабляют иммунитет;
- противопоказанием к медицинскому применению бактериофагов служит только индивидуальная непереносимость компонентов лекарственного препарата;
- бактериофаги могут применяться у пациентов любого возраста [24].

Таким образом, бактериофаги повреждают лишь определенные бактериальные клетки, не нарушая при этом естественный биоценоз различных систем организма. В связи с этим бактериофаги являются весьма успешной альтернативой антибиотикам.

Исторически сложилось, что СССР занимал лидирующие позиции в области производства и применения лечебно-профилактических бактериофагов. Отечественное производство бактериофагов и до настоящего времени базируется на следующих критериях:

- препараты должны включать только вирулентные бактериофаги;
- фаги, входящие в препарат, должны обладать высокими показателями активности репликации;
- фаги, входящие в препарат, должны сохранять литическую активность при длительном хранении;
- фаги, входящие в препарат, не должны взаимодействовать с представителями облигатной симбиотической микрофлоры человека [25].

В настоящее время отечественная медицинская промышленность производит лекарственные препараты бактериофагов, предназначенные для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызванными патогенными и условно-патогенными возбудителями. Эти препараты представляют собой стерильные фильтраты фаголизатов соответствующих видов бактерий, очищенные от эндо- и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток, а также их антигенных комплексов и компонентов питательных сред. Главным условием клинической эффективности при назначении бактериофагов является

фагочувствительность бактерий-возбудителей. Современные лечебно-профилактические бактериофаги представляют собой комплекс поликлональных бактериальных вирусов, обладающих высокой литической активностью в отношении наиболее эпидемиологически значимых групп возбудителей бактериальных инфекций (бактерий сем. *Enterobacteriaceae*, родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* и пр.) [26].

На фармацевтическом рынке Российской Федерации находятся в обращении 16 наименований зарегистрированных лекарственных препаратов бактериофагов, выпускаемых в виде растворов и таблеток⁶. Продолжается разработка новых лекарственных форм известных наименований бактериофагов.

Поскольку фаготерапия признается перспективным направлением в лечении инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами бактерий, а также рассматривается в комплексе мер по предотвращению возникновения биопленок при терапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, проводится активный научный поиск в области разработки новых препаратов. Ведутся работы по выделению новых бактериофагов к возбудителям инфекционных заболеваний таких родов, как *Serratia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* [27].

Таким образом, весьма актуальным и своевременным является совершенствование системы стандартизации и оценки качества данной группы биологических препаратов путем разработки и включения соответствующих общих фармакопейных статей (ОФС) и фармакопейных статей (ФС), регламентирующих требования к их качеству и методам анализа, в ГФ РФ. Актуальность и необходимость данной работы подтверждается тем, что в зарубежных фармакопеях монографии по препаратам бактериофагов не представлены [28–30].

Первая и единственная ФС Бактериофаг дизентерийный была включена в Государственную фармакопею СССР VIII изд. (1946 г.). В настоящее время препараты бактериофагов используются в России и странах Евразийского экономического союза для лечения и профилактики гнойно-септических и кишечных инфекций, а также в диагностических целях для индикации, видового и внутривидового дифференцирования бактерий⁷. Использование бактериофагов предусмотрено «Комплексной программой развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года».

В ГФ РФ XIV изд. включена ОФС Бактериофаги⁸, которая является базовой для препаратов этой группы. В ОФС Бактериофаги приведены основные требования к порядку производства и требования к качеству лекарственных препаратов бактериофагов, обуславливающих их эффективность и безопасность. В данной ОФС обобщены и систематизированы основные требования к производственному процессу, унифицированы показатели качества в соответствии с областью применения препаратов и утверждены методы их контроля, приведена современная классификация лечебно-профилактических бактериофагов по их специфической направленности, подразделяющихся на монокомпонентные, содержащие вирулентные фаги против одного рода или вида бактерий и комбинированные, содержащие несколько видов монокомпонентных бактериофагов.

В ОФС Бактериофаги в разделе «Производство» уточнены этапы производства, обязательные для всех видов бактериофагов: выделение чистых культур перспективных штаммов бактерий (кандидатов в производственные штаммы бактерий) и вы-

деление вирулентных бактериофагов для пополнения коллекции маточных фагов. Определены требования к производственным штаммам и маточным бактериофагам. В состав маточных бактериофагов должны входить исключительно вирулентные фаги с широким диапазоном действия по отношению к штаммам гомологичного вида бактерий, обладающих высокой активностью, стабильностью лизиса, специфической направленностью антимикробного действия и высокой «урожайностью». Характеризуя вирулентные фаги, при отборе в состав маточных, рекомендуется проводить дополнительные испытания на основе современных молекулярно-биологических методов (электронная микроскопия, полногеномное секвенирование и т.д.). В разделе «Производство» рекомендованы питательные среды для работы с производственными штаммами, а также условия для их хранения, с учетом периодической проверки их культуральных, морфологических, биохимических свойств.

Приведено краткое описание технологического процесса, включающего работу с производственными штаммами, подбор к ним активных фаговых рас, культивирование, очистку фаголизатов методом ультрафильтрации, концентрирование и стерилизующую фильтрацию с последующим розливом и фасовкой. Указаны показатели качества, которые необходимо проверять еще на стадии производства препарата: специфическая активность, pH, стерильность, аномальная токсичность. В ОФС Бактериофаги приведены специфические методы исследования, характеризующие качество лечебно-профилактических бактериофагов: методы определения специфической активности бактериофагов и стабильности лизиса по методу Аппельмана и определение фаговых частиц в 1 мл по методу Грация на плотных питательных средах двухслойным методом.

В разделе «Испытания» перечислены все показатели качества препаратов в соответствии с их лекарственной формой и указаны методы контроля качества в соответствии с утвержденными в ГФ РФ XIV изд. физическими и биологическими методами анализа.

Позднее были разработаны проекты ФС на отдельные препараты бактериофагов с последующим включением их в очередное издание ГФ РФ XIV изд.

В результате впервые были разработаны и включены в ГФ РФ XIV изд. 12 ФС на лечебно-профилактические бактериофаги, из них 3 — ФС на поликомпонентные препараты, представляющие собой комплексы очищенных бактериофагов 6 или 7 различных родов бактерий⁹ (табл. 1).

Дополнительно разработаны еще два проекта ФС: Бактериофаг бактерий сальмонелл групп А, В, С, D, Е монокомпонентный, таблетки и Бактериофаг бактерий сальмонелл групп А, В, С, D, Е монокомпонентный, раствор для приема внутрь и ректального введения, которые будут включены в очередное издание ГФ РФ.

ФС для бактериофагов состоят из разделов: «Введение», «Производство» и «Испытания». В зависимости от группировочного наименования лекарственного средства раздел «Испытания» помимо стандартизованных показателей качества, соответствующих лекарственной форме препарата и методов контроля, содержит уникальную информацию об условиях проведения испытания по показателю «Специфическая активность».

Показатели качества и методы контроля препаратов бактериофагов представлены в таблице 2.

⁶ <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>

⁷ Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза (утв. решением Совета Евразийской экономической комиссии 03.11.2016 № 89).

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0002.15 Бактериофаги. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. 2018.

Таблица 1. Перечень фармакопейных статей на лечебно-профилактические бактериофаги, вошедших в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV изд.

Table 1. The list of monographs on therapeutic and prophylactic bacteriophages included in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed.

№ п/п	Название фармакопейной статьи Monograph	Специфическая направленность препарата Specific action of the product
Монокомпонентные Monocomponent products		
1	Бактериофаг бактерий стафилококка монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Monocomponent anti-Staphylococcus bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. aureus</i>)
2	Бактериофаг бактерий стрептококка монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Monocomponent anti-Streptococcus bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>Streptococcus</i> spp. (в том числе <i>Enterococcus</i> spp.) <i>Streptococcus</i> spp. (including <i>Enterococcus</i> spp.)
3	Бактериофаг бактерий синегнойной палочки монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Monocomponent anti-Pseudomonas aeruginosa bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4	Бактериофаг бактерий кишечной палочки монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Monocomponent anti-Escherichia coli bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>Escherichia coli</i>
5	Бактериофаг бактерий протей, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Anti-Proteus bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
6	Бактериофаг бактерий дизентерии поливалентный, раствор для приема внутрь и ректального введения Polyvalent anti-dysentery bacteriophage, solution for oral and rectal use	<i>Shigella flexneri</i> serotypes 1, 2, 3, 4, 6, <i>S. sonnei</i>
7	Бактериофаг бактерий брюшного тифа, таблетки Anti-typhoid bacteriophage, tablets	<i>Salmonella typhi</i>
8	Бактериофаг бактерий клебсиелл поливалентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Polyvalent anti-Klebsiella bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i>
Комбинированные Multicomponent products		
9	Бактериофаг бактерий кишечной палочки + протей поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Multicomponent anti-Escherichia coli+Proteus bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
10	Бактериофаг бактерий стафилококка + энтерококка + стрептококка + синегнойной палочки + клебсиелл + кишечной палочки + протей поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Multicomponent anti-Staphylococcus + Enterococcus + Streptococcus + Pseudomonas aeruginosa + Klebsiella + Escherichia coli + Proteus bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>
11	Бактериофаг бактерий стафилококка + стрептококка + протей + синегнойной палочки + клебсиеллы пневмонии + кишечной палочки поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения Multicomponent anti-Staphylococcus + Streptococcus + Proteus + Pseudomonas aeruginosa + Klebsiella pneumoniae + Escherichia coli bacteriophage, solution for oral and topical use	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>
12	Бактериофаг бактерий шигелл + сальмонелл + кишечной палочки + протей + энтерококка + стафилококка + синегнойной палочки поликомпонентный, раствор для приема внутрь и ректального введения Multicomponent anti-Shigella + Salmonella + Escherichia coli +Proteus + Enterococcus + Staphylococcus + Pseudomonas aeruginosa bacteriophage, solution for oral and rectal use	<i>Shigella flexneri</i> serotypes 1, 2, 3, 4, 6, <i>S. sonnei</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Таблица 2. Показатели качества препаратов бактериофагов и методы их контроля
Table 2. Bacteriophage quality parameters and test methods

№ п/п	Наименование показателя качества Quality parameter	Лекарственная форма Dosage form	Метод контроля ^а Test method ^a
1	Описание Appearance	Таблетки Раствор Tablets Solution	Визуальный Visual inspection
2	Подлинность Identification	Таблетки Раствор Tablets Solution	Подтверждается специфической активностью согласно разделу «Специфическая активность» Confirmed by determination of specific activity according to the requirements of the «Specific activity» section
3	pH pH	Раствор Solution	ОФС Ионметрия General chapter Ionometry
4	Средняя масса таблетки и отклонения от средней массы Average tablet mass and mass variation	Таблетки Tablets	ОФС Однородность массы дозированных лекарственных форм General chapter Uniformity of mass of single-dose preparations
5	Время распадаемости Disintegration time	Таблетки Tablets	ОФС Распадаемость таблеток и капсул General chapter Disintegration of tablets and capsules
6	Потеря в массе при высушивании Loss on drying	Таблетки Tablets	ОФС Потеря в массе при высушивании General chapter Loss on drying
7	Извлекаемый объем Extractable volume	Раствор Solution	ОФС Извлекаемый объем General chapter Extractable volume
8	Стерильность Sterility	Раствор Solution	ОФС Стерильность, метод прямого посева или мембранной фильтрации General chapter Sterility test. Direct inoculation or membrane filtration method
9	Микробиологическая чистота Microbial quality	Таблетки Tablets	ОФС Микробиологическая чистота General chapter Microbial quality
10	Аномальная токсичность Abnormal toxicity	Таблетки Раствор Tablets Solution	ОФС Аномальная токсичность General chapter Abnormal toxicity
11	Специфическая активность Specific activity	Таблетки Раствор Tablets Solution	ОФС Бактериофаги (раздел «Специфическая активность») General monograph Bacteriophages («Specific activity» section)
12	Упаковка и маркировка Packaging and labelling	Таблетки Раствор Tablets Solution	ОФС Лекарственные формы, ОФС Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств General chapter Dosage forms, General chapter Packaging, labelling, and transportation of medicinal products
13	Транспортирование и хранение Storage and transportation	Таблетки Раствор Tablets Solution	ОФС Лекарственные формы, ОФС Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств General chapter Dosage forms, General chapter Packaging, labelling, and transportation of medicinal products

^а Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд.

^a According to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed.

Заключение

В Государственную фармакопею Российской Федерации XIV изд. включена ОФС Бактериофаги, являющаяся базовой для препаратов этой группы. Разработаны 12 фармакопейных статей на лечебно-профилактические бактериофаги всех группировочных наименований, которые зарегистрированы в Российской Федерации и впервые включены в действующую Государственную фармакопею Российской Федерации.

Фармакопейные статьи на лечебно-профилактические бактериофаги, включенные в действующую Государственную

фармакопею Российской Федерации, будут способствовать унификации требований, предъявляемых к данной группе биологических лекарственных препаратов, и повышению их качества.

Дальнейшие исследования бактериофагов и их применение в клинической практике как в монотерапии, так и в комплексе с другими лекарственными препаратами позволят расширить границы их применения в медицинской практике и в последующем разработать комплексные лекарственные препараты стандартов качества, в состав которых могут быть включены бактериофаги.

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).

Конфликт 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

- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318–22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:114–22. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Chambless JD, Hunt SM, Stewart PS. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):2005–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2005-2013.2006>
- Tetz VV. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. *Med Microbiol Lett*. 1996;(5):426–36.
- Tetz VV, Korobov VP, Artemenko NK, Lemkina LM, Panjkova NV, Tetz GV. Extracellular phospholipids of isolated bacterial communities. *Biofilms*. 2004;1(3):149–55. <http://dx.doi.org/10.1017/S147905050400136X>
- Sponza DT. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme Microb Technol*. 2003;32(3–4):375–85. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00309-5)
- Акимкин ВГ, Дарбеева ОС, Колков ВФ. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы. *Клиническая практика*. 2010;(4):48–54. [Akimkin VG, Darbeeva OS, Kolkov VF. Historical and modern aspects of bacteriophages application: experience and prospects. *Klinicheskaya praktika = Journal of Clinical Practice*. 2010;(4):48–54 (In Russ.)]
- Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. *Arch Immunol Ther Exp*. 1987;35(5):569–83.
- Цулукидзе АП. К методике применения бактериофага в хирургической практике. *Вестник хирургии*. 1941;(6):679–85. [Tsulukidze AP. The technique application of bacteriophage in surgical practice. *Vestnik khirurgii = Bulletin of Surgery*. 1941;(6):679–85 (In Russ.)]
- Кокин ГА. Применение фагов в хирургии. *Советская медицина*. 1941;(9):15–8. [Kokin GA. The use of phages in surgery. *Sovetskaya meditsina = Soviet Medicine*. 1941;(9):15–8 (In Russ.)]
- Журавлев ПМ, Кокин ГА, Покровская МП. Фаготерапия и фагопрофилактика газовой гангрены. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1944;(9):44. [Zhuravlev PM, Kokin GA, Pokrovskaya MP. Phagotherapy and phagoprophylaxis of gas gangrene. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of microbiology epidemiology and immunobiology*. 1944;(9):44 (In Russ.)]
- Авксентьева ВА, Алтыртсева ИЕ, Бурукина АВ, Зобнина КС, Гельшан ЛС, Кузнецова ГС, Минкевич ЕИ. К вопросу повышения лечебной эффективности дизентерийного бактериофага. *Бактериофагия. Сборник трудов межинститутской конференции*. Тбилиси. 1957;115–21. [Avksentyeva VA, Altyrtseva IE, Burukina AV, Zobnina KS, Gelshan LS, Kuznetsova GS, Minkevich EI. To the question of increasing the therapeutic effectiveness of dysentery bacteriophage. *Bacteriophagy. Proceedings of the inter-institute conference*. Tbilisi. 1957;115–21 (In Russ.)]
- Раппе ФИ, Зобнина КС, Кузнецова ВК, Давыдова КП, Дунаева НН. Разработка методов получения высокоактивного дизентерийного бактериофага с учетом микробного пейзажа в очаге. *Бактериофагия. Сборник трудов межинститутской конференции*. Тбилиси. 1957;159–61. [Rappe FI, Zobnina KS, Kuznetsova VK, Davydova KP, Dunaeva NN. Development of methods for obtaining highly active dysenteric bacteriophage taking into account the microbial landscape in the focus of infection. *Bacteriophagy. Proceedings of the inter-institute conference*. Tbilisi. 1957;159–61 (In Russ.)]
- Кисляк НС, Самсыгина ГА, Бони ЕГ. Стафилококковый бактериофаг в лечении гнойно-воспалительных заболеваний новорожденных. В кн.: *Материалы Всесоюзного симпозиума, посвященного 60-летию Тбилисского НИИВС*. Тбилиси; 1984. С. 212–4. [Kislyak NS, Samsyigina GA, Boni EG. Staphylococcal bacteriophage in the treatment of purulent-inflammatory diseases of newborns. In: *Materials of the All-Union symposium on the 60th anniversary of the Tbilisi NIIVS*. Tbilisi; 1984. P. 212–4 (In Russ.)]
- Бессмертная НГ, Чижова ГВ, Владимирова НЮ, Когут ЕП. Эффективность применения пиобактериофага у беременных с пиелонефритами. В кн.: *Пленум Российской ассоциации акушеров-гинекологов «Инфекции в акушерстве, гинекологии и перинатологии»*. Сборник научных трудов. Саратов; 1999. С. 35–6. [Bessmertnaya NG, Chizhova GV, Vladimirova NYu, Kogut EP. Effectiveness of the use of pyobacteriophage in pregnant women with pyelonephritis. In: *Plenum of the Russian Association of Obstetricians and Gynecologists «Infections in obstetrics, gynecology and perinatology»*. Collection of scientific papers. Saratov; 1999. P. 35–6 (In Russ.)]
- Лакно ВМ, Хомякова ЕЮ, Кузнецов ЮВ. Применение фаготерапии для лечения инфекционных осложнений после аппендэктомии. *Вести медицины*. 1996;(5–6):5. [Lakhno VM, Khomyakova EYu, Kuznetsov YuV. The use of phage therapy for the treatment of infectious complications after appendectomy. *Vesti meditsiny = Medicine News*. 1996;(5–6):5 (In Russ.)]
- Сережин ИН, Даутова ЗА, Никова ГА, Фаттахов ВТ. Первые результаты применения пиобактериофага поливалентного в профилактике раневой инфекции глаза. В кн.: *Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы офтальмологии»*. Уфа; 1996. С. 24. [Seryezhin IN, Dautova ZA, Nikova GA, Fattakhov VT. The first results of the use of piobacteriophage polyvalent in the prevention of wound infection of the eye. In: *Materials of the scientific-practical conference «Vital problems of ophthalmology»*. Ufa; 1996. P. 24 (In Russ.)]
- Меладзе ГД, Мебуке МГ, Чхетия ШН, Кикнадзе НЯ. Эффективность стафилококкового бактериофага при лечении гнойных заболеваний легких и плевры. *Грудная хирургия*. 1982;(1):53–6. [Meladze GD, Mebuke MG, Chkheta NSH, Kiknadze NYa. Efficacy of staphylococcal bacteriophage in the treatment of purulent diseases of lungs and pleura. *Grudnaya khirurgiya*. 1982;(1):53–6 (In Russ.)]
- Лазарева ЕБ, Спиридонова ТГ, Биткова ЕЕ, Лашенкова НН, Кудрявцева НИ, Меньшиков ДД. Эффективность перорального применения бактериофагов для лечения больных с ожогами. В кн.: *Возможности и перспективы*

- совершенствования диагностики и лечения в клинической практике: тезисы докладов научно-практической конференции, 13 ноября 1997 г. М.; 1997. С. 41–2. [Lazareva EB, Spiridonova TG, Bitkova EE, Lashenkova NN, Kudryavtseva NI, Men'shikov DD. The effectiveness of oral use of bacteriophages for the treatment of patients with burns. In: *Opportunities and prospects for improving diagnosis and treatment in clinical practice: Abstracts of the scientific-practical conference, November 13, 1997*. Moscow; 1997. P. 41–2 (In Russ.)]
20. Кочеткова ВА, Мамонтов АС, Московцева РЛ, Ерастова ЕИ, Трофимов ЕИ, Попов МИ, Джубалиева СК. Фаготерапия послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных. *Советская медицина*. 1989;(6):23–6. [Kochetkova VA, Mamontov AS, Moskovtseva RL, Erastova EI, Trofimov EI, Popov MI, Dzhubalievskaya SK. Phage therapy of postoperative purulent-inflammatory complications in cancer patients. *Sovetskaya meditsina = Soviet Medicine*. 1989;(6):23–6 (In Russ.)]
 21. Перепанова ТС, Малова ЮА, Толордава ЭР, Круглов АН. Профилактика и терапия препаратами бактериофагов инфекций мочевых путей. В кн.: *Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы 4-ой научно-практической конференции с международным участием: к 70-летию профессора В.А. Алёшкина, Нижний Новгород, 24–26 сентября*. М.: Медицинское Маркетинговое Агентство; 2018. С. 56. [Perepanova TS, Malova YuA, Tolordava ER, Kruglov AN. Prevention and treatment with drugs of bacteriophage urinary tract infections. In: *Bacteriophages: theoretical and practical aspects of their application in medicine, veterinary and food: book of abstracts of the fourth international scientific conference: to the 70th anniversary of professor V.A. Aleshkin, Nizhni Novgorod, September 24–26*. Moscow: Meditsinskoye Marketingovoye Agentstvo; 2018. P. 56 (In Russ.)]
 22. Акимкин ВГ. Ликвидация хронической эпидемии нозокомиального сальмонеллеза в крупном многопрофильном лечебном учреждении с использованием адаптированного сальмонеллезного бактериофага. В кн.: *Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней: сборник научных трудов*. М.; 1997. С. 206–9. [Akimkin VG. Elimination of the chronic epidemic of nosocomial salmonellosis in a large multidisciplinary treatment facility using adapted salmonella bacteriophage. In: *Actual issues of the epidemiology of infectious diseases: a collection of scientific papers*. Moscow; 1997. P. 206–9 (In Russ.)]
 23. Гуттман Б, Райя Р, Каттер Э. Общая биология бактериофагов. В кн.: Каттер Э, Сулаквелидзе А, ред. *Бактериофаги: биология и практическое применение*. М.: Научный мир; 2012. С. 58–110. [Guttman B, Raya R, Katter E. General biology of bacteriophages. In: Katter E, Sulakvelidze A, eds. *Bacteriophages: biology and practical application*. Moscow: Nauchnyy mir; 2012. P. 58–110 (In Russ.)]
 24. Красильников ИВ, Лыско КА, Отрашевская ЕВ, Лобастова АК. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития. *Сибирский медицинский журнал*. 2011;26(2):33–7. [Krasilnikov IV, Lyisko KA, Otrashkevskaya EV, Lobastova AK. Bacteriophage based preparations: a brief survey of current state and future development. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*. 2011;26(2):33–7 (In Russ.)]
 25. Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. Mc Grath S, van Sinderen D, eds. Norfolk. UK: Caister Academic Press; 2007.
 26. Каргина ТМ, Осипова ИГ, Саканян ЕИ, Мовсесянц АА. История разработки фармакопейных стандартов качества на биологические лекарственные препараты и методы их испытаний в России. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(3):131–8. [Kargina TM, Osipova IG, Sakanyan EI, Movsesyants AA. The history of development of Pharmacopoeia standards quality biological drugs and methods of tests in Russia. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(3):131–8 (In Russ.)]
 27. Орлова ЕВ, Ефимова МГ, Функнер ЕВ, Николаева АМ, Ковязина НА, Шитова ОИ, Шилова ЕГ. Технологические аспекты разработки препаратов бактериофагов и эффективность их применения. В кн.: *Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы 4-ой научно-практической конференции с международным участием: к 70-летию профессора В.А. Алёшкина, Нижний Новгород, 24–26 сентября*. М.: Медицинское Маркетинговое Агентство; 2018. С. 55. [Orlova EV, Efimova MG, Funkner EV, Nikolaeva AM, Kovyazina NA, Shitova OI, Shilova EG. Technological aspects of the development of bacteriophage preparations and the effectiveness of their use. In: *Bacteriophages: theoretical and practical aspects of their application in medicine, veterinary and food: book of abstracts of the fourth international scientific conference: to the 70th anniversary of professor V.A. Aleshkin, Nizhni Novgorod, September 24–26*. Moscow: Meditsinskoye Marketingovoye Agentstvo; 2018. P. 55 (In Russ.)]
 28. Саканян ЕИ, Шемерянкина ТБ, Осипова ИГ, Каргина ТМ, Шишова ЛИ, Бармин АВ и др. Создание фармакопейных стандартов качества для Государственной фармакопеи Российской Федерации. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(2):40–5. [Sakanyan EI, Shemeryankina TB, Osipova IG, Kargina TM, Shishova LI, Barmin AB, et al. Creation of pharmacopoeia quality standards for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(2):40–5 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-2-40-45>
 29. Миронов АН, Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Озеретковский НА, Шимчук ЛФ. Актуальные вопросы по разработке стандартов качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2013;(2):57–9. [Mironov AN, Movsesyants AA, Bondarev VP, Ozeretskovsky NA, Shimchuk LF. Highlights of elaborating pharmacopoeia monographs for immunobiological preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(2):57–9 (In Russ.)]
 30. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):38–41 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Каргина Татьяна Михайловна, канд. биол. наук. *Tatyana M. Kargina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6652-7559>

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, проф. *Elena I. Sakanyan*, Dr. Sci. (Pharm.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8536-4804>

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук. *Dmitry S. Davydov*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>

Парфенюк Римма Леонтьевна, канд. биол. наук. *Rimma L. Parfenyuk*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8190-9299>

Поступила 26.06.2019

После доработки 05.11.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 26 June 2019

Revised 5 November 2019

Accepted 22 November 2019

Разработка ортотопической модели глиобластомы мыши с использованием клеточной линии GLi-261

А. А. Овсепян*, А. А. Борзов, Е. И. Каторкина, Е. О. Анисимова, М. В. Лыков

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

Глиобластома — наиболее часто встречающийся и наиболее агрессивный тип опухолей головного мозга с почти 100 % смертностью пациентов в течение 5 лет. Для поиска новых эффективных подходов к лечению этого заболевания требуется разработка адекватных экспериментальных моделей. **Цель работы:** отработка и внедрение в практику ортотопической модели глиобластомы мышей. **Материалы и методы:** клетки глиомы мыши GLi-261 ортотопически, с использованием стереотаксического оборудования, инокулировали в область *Putamen* головного мозга мышей линии C57Bl/6. Динамика развития опухоли была исследована с помощью высокопольного магнитно-резонансного томографа Preclinical MRI System 7.0T/17cm (Flexiscan). В качестве «положительного» контроля при лечении экспериментальной глиобластомы использовали Темцитал® (темозолomid). Оценку неврологического статуса животных при протекании опухолевого процесса оценивали по результатам тестов. **Результаты:** отработана ортотопическая модель глиобластомы мыши, разработанная на основе клеточной линии GLi-261, с использованием стереотаксического оборудования для точной инокуляции опухолевых клеток, магнитно-резонансной томографии для неинвазивного определения объема и динамики развития опухоли, специальных тестов для определения неврологического статуса биологических тест-систем. С использованием данной модели показана эффективность темозоломида («золотой стандарт» лечения глиобластомы). **Выводы:** данная модель внедрена в практику ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» и может быть использована в качестве *in vivo* тест-системы для доклинической оценки эффективности разрабатываемых новых противоопухолевых препаратов, а также схем лечения онкологических заболеваний головного мозга при комплексной терапии. **Ключевые слова:** глиобластома; стереотаксис; магнитно-резонансная томография; темозоломид; ортотопическая модель

Для цитирования: Овсепян АА, Борзов АА, Каторкина ЕИ, Анисимова ЕО, Лыков МВ. Разработка ортотопической модели глиобластомы мыши с использованием клеточной линии GLi-261. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):242–250. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-242-250>
Контактное лицо: Овсепян Армен Александрович; ovsepyan@ibcgenerium.ru

Development of a Mouse Glioblastoma Orthotopic Model Using the GLi-261 Cell Line

A. A. Ovsepyan*, A. A. Borzov, E. I. Katorkina, E. O. Anisimova, M. V. Lykov

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

Glioblastoma is the most common and most aggressive type of brain tumor, with an almost 100 % mortality rate over 5 years. The search for new effective approaches to the treatment of this disease requires the development of adequate experimental models. **Objective:** to develop and put into practice an orthotopic model of mouse glioblastoma. **Materials and methods:** GLi-261 mouse glioma cells were orthotopically inoculated into the putamen of C57Bl/6 mice brain. Tumor dynamics was investigated by Preclinical MRI System 7.0T/17cm (Flexiscan) high-field magnetic resonance imager (MR Solutions, UK). Temcitall® (temozolomide) was used as a positive control in the treatment of experimental glioblastoma. The neurological status of animals in the course of tumour development was assessed by specific tests. **Results:** a GLi-261 cell-based mouse glioblastoma orthotopic model was developed using stereotactic equipment for accurate inoculation of tumour cells, magnetic resonance imaging for non-invasive determination of tumour volume and dynamics, and special tests for determination of the neurological status of the biological test systems. This model was used to demonstrate the effectiveness of temozolomide (the «gold standard» for glioblastoma treatment). **Conclusions:** this model has been introduced into practice at the IBC Generium, LLC, and can be used as an *in vivo* test system for preclinical evaluation of efficacy of new antitumour drugs being developed, as well as brain cancer treatment regimens using combination therapy.

Key words: glioblastoma; stereotaxy; magnetic resonance imaging; temozolomide; orthotopic model

For citation: Ovsepyan AA, Borzov AA, Katorkina EI, Anisimova EO, Lykov MV. Development of a mouse glioblastoma orthotopic model using the GLi-261 cell line. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):242–250 <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-242-250>

***Corresponding author:** Armen A. Ovsepyan; ovsepyan@ibcgenerium.ru

По данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer) при участии Всемирной организации здравоохранения¹, заболеваемость первичными опухолями головного мозга (включая менингиомы) составляет 6–19 случаев на 100 тысяч мужского и 4–18 случаев на 100 тысяч женского населения.

Согласно официальным данным², заболеваемость первичными опухолями центральной нервной системы в Российской Федерации составляет в среднем 4,8 случая на 100 тысяч населения. В 2017 г. общая заболеваемость в России по данной нозологии составила 8844 случая, в том числе 668 — в возрасте до 19 лет. Нейроэпителиальные опухоли составляют до 50 % всех новообразований головного мозга. Глиомы составляют более 3/4 (77 %) всех нейроэпителиальных опухолей.

Прогноз излечения и выживаемости при первичных опухолях головного мозга (в онкологии принято оценивать пятилетнюю выживаемость) напрямую зависит от возраста пациента, его общего состояния, типа раковых клеток, а также ряда других факторов. Статистика выживаемости в течение пяти лет варьирует от 66 % для молодых (от новорожденности до 19 лет) и до 5 % для пожилых людей (75 лет и старше)³. Прогноз менее благоприятный при мультиформной глиобластоме: в течение пяти лет выживает 13 % пациентов в возрасте 20–44 лет и 1 % пациентов в возрасте 55–64 лет.

Большинство существующих в настоящее время экспериментальных моделей ориентированы на использование клеток глиобластомы человека и иммунодефицитных мышей. Данный подход не позволяет с точностью воспроизвести патологические процессы из-за отсутствия воздействия иммунной системы макроорганизма на клеточное микроокружение опухоли [1].

Таким образом, поиск эффективных средств лечения глиом и глиобластом человека является актуальной проблемой как в России, так и во всем мире. Одной из задач, которая стоит перед исследователями для решения данной проблемы, является разработка релевантных экспериментальных моделей для их использования в ходе доклинических исследований.

Одним из этапов разработки лекарственных средств является доказательство их эффективности на экспериментальных моделях. Одним из направлений деятельности ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» является разработка противоопухолевых лекарственных препаратов, включая доклиническую оценку их эффективности и безопасности.

Цель работы — отработка и внедрение в практику ортотопической модели глиобластомы мышей.

Задачи исследования:

1. Разработать ортотопическую модель глиобластомы мышей, включая отработку:
 - хирургического подхода для инокуляции опухолевых клеток с использованием стереотаксического оборудования;
 - методов оценки клинического состояния биологических тест-систем (БТС);
 - метода прижизненной оценки динамики роста опухоли с использованием метода магнитно-резонансной томографии (МРТ).
2. Исследовать динамику роста опухоли после инокуляции клеток GLi-261 (Murine glioma 261) в различных дозах.
3. Оценить эффективность «положительного» контроля (терапия темозоломидом) для последующего изучения эффективности новых противоопухолевых препаратов.

4. Разработать и апробировать метод комплексной оценки глубины и тяжести протекания опухолевого процесса (МРТ-исследование, клинический осмотр, медиана выживаемости).

Материалы и методы

Культура клеток

Для моделирования глиобластомы была использована культура клеток Murine glioma 261 (Gli-261), полученная из National Institutes of Health (NIH), США. В исследованиях указанные клетки использовали в концентрациях $1,67 \cdot 10^6$, $8,33 \cdot 10^6$ и $5,0 \cdot 10^7$ клеток/мл (соответственно $5,0 \cdot 10^2$, $1,5 \cdot 10^3$ и $5,0 \cdot 10^3$ клеток/БТС). Объем инокулируемой клеточной суспензии — 3 мкл.

Животные

В качестве БТС в эксперименте использовали мышей линии C57Bl/6 SPF-категории (specified pathogen free), самки в возрасте 10–12 недель (получены из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала ИБХ РАН, г. Пушкино). Содержание и уход за БТС проводили в соответствии с нормами и правилами, указанными в «Политике работы с животными ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» и Руководстве по содержанию и использованию лабораторных животных⁴. В каждой группе было использовано по 10 БТС. Исследование одобрено на заседании Комиссии по биоэтике ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» (протокол № 41 от 20.10.2017).

Терапия

В качестве «положительного» контроля при лечении экспериментальной глиобластомы у мышей использовали Темцитал® (темозоломид) (Monte Verde S.A., Аргентина), вводя его в дозе 60 мг/кг перорально со вторых суток после ортотопической трансплантации клеток глиобластомы по схеме 5+2+2 введения с трехсуточными интервалами (2–6; 10–11; 15–16 сут) [2].

Ортотопическая трансплантация клеток глиобластомы

При подготовке БТС к работе для общей анестезии использовали инъекционный золетил-ксилазиновый наркоз (7–9 мкл/г живой массы БТС), что соответствует 50–60 мг/кг по золетилу (ВИРБАК, Франция) и 20–25 мг/кг по ксилазину (Bioveta a.s. Ivanovice na Hame, Czech Republic). Пред- и послеоперационную анальгезию проводили с помощью кетопрофена путем подкожной инъекции в дозе 2–5 мг/кг.

После наступления хирургического наркоза, используя ушные фиксаторы и фиксатор челюсти, закрепляли голову мыши в адаптере для мышей (Stoelting Co., США) в горизонтальном положении таким образом, чтобы исключить возможные смещения при операции и подготовке операционного поля (рис. 1).

Производили кожный разрез стерильным скальпелем от уровня глаз вдоль сагиттального шва черепа в сторону затылка длиной 15 мм таким образом, чтобы иметь свободный доступ к брегме.

С помощью скальпеля удаляли надкостницу с предполагаемого места трепанации. Стерильными ушными палочками высушивали операционную рану и обрабатывали черепную кость раствором перекиси водорода (3 %) для обеззараживания места трепанации и визуализации брегмы.

¹ Информационный портал об опухолях мозга. http://oncobrain.ru/brain_tumors/statistics_disease_brain_tumors.html

² Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ, ред. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018.

³ Информационный портал об опухолях мозга. http://oncobrain.ru/brain_tumors/statistics_disease_brain_tumors.html

⁴ Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington D.C.: The National Academies Press; 2011.

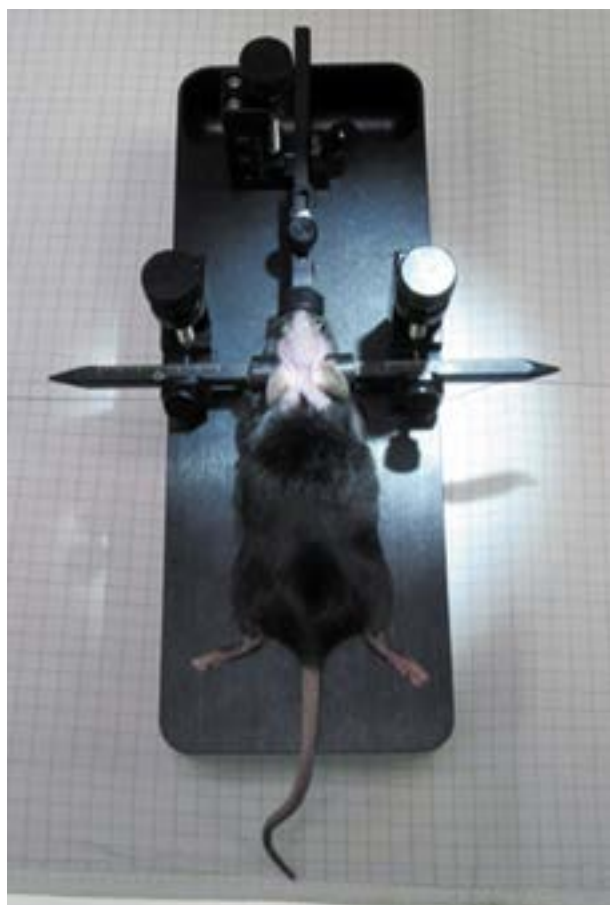


Рис. 1. Биологическая тест-система с подготовленным операционным полем, зафиксированная в адаптере.

Fig. 1. A biological test system with a prepared surgical field, fixed in the adapter.



Рис. 2. Визуализация брегмы.

Fig. 2. Bregma visualisation.

С помощью стереотаксиса (Stoelting Co., США) выставляли кончик иглы шприца (Hamilton, Швейцария) на брегму (точка «0») (рис. 2), передвигали вправо. В этой точке ($X = 0$, $Y = 2,3$) другой иглой проделывали трепанационное отверстие, применяя легкое надавливание, совмещенное с круговыми движениями.

После осуществления трепанации с помощью стереотаксиса вводили инъекционную иглу шприца на требуемую глубину (рис. 3).

Место инъекции подбирали из соображений наличия минимального количества жизненно важных центров и исключения возможности попадания в один из желудочков мозга. Инокуляцию проводили в область *Putamen* (лат.).

После введения клеток иглу оставляли в месте инъекции на 2 мин для сбалансирования внутричерепного давления и уменьшения дальнейшего вытекания клеток вместе с черепно-мозговой жидкостью. Далее иглу медленно вынимали из головного мозга. Высушивали рабочую поверхность стерильной фильтровальной бумагой. Трепанационное отверстие «пломбировали» костным воском Bone Wax (Ethicon, США). Кожную рану заклеивали тканевым клеем Dermabond (Ethicon, США).

После завершения операции БТС переносили в блок подогрева TAILHEATB (BioracSystems Inc., США) с принудительной подачей кислорода (при помощи медицинского кислородного концентратора NewLife (AirSep, США)) до выхода животного из наркоза (рис. 4).

Оценка состояния БТС

В течение эксперимента состояние БТС оценивали с помощью специальных тестов, представленных в таблице 1 [3–7]. В начале развития опухолевого процесса клинический осмотр проводили 2 раза в неделю, затем ежедневно.

1. Парапарез (Tail suspension test) — мышь подвешивали за хвост и наблюдали за синхронностью движения задних конечностей [4].

2. Гемипарез (Neurological deficits) — мышь поднимали с помощью пинцета за хвост и следили за поворотами мыши



Рис. 3. Инокуляция опухолевых клеток.

Fig. 3. Inoculation of tumour cells.



Рис. 4. Оборудование для послеоперационных мероприятий (пояснения в тексте).
Fig. 4. Equipment for postoperative procedures (explanations are provided in the text).

в разные стороны, а также за ее движением по кругу во время теста «Походка» [5].

3. Ходжение по краю (Ledge test) — мышь ставили на край клетки и следили за ее движением по краю и спуском в клетку [6].

4. Походка (Gait test) — мышь устанавливали на горизонтальную поверхность и следили за ее передвижениями [7].

5. Висячий тест на 4 лапах (Four limb hanging test) — мышь прицепляли 4 конечностями за решетку клетки и переворачивали вниз головой, следили за временем удержания мыши на решетке [7].

Комплексную оценку неврологического статуса (КОНС) проводили по балльной системе с учетом вышеописанных параметров. Каждый параметр оценивали по 3-балльной шкале, где 0 — отклонения параметра отсутствуют, 3 — нарушения по данному параметру ярко выражены. Суммирование баллов по каждому оцениваемому параметру давало обобщенную клиническую картину в числовом эквиваленте, где минимальное значение (0) сопоставимо с клинически здоровым животным, а максимальное значение (15) означало ярко выраженную неврологическую симптоматику (предагональное состояние). Данное состояние БТС являлось критерием вывода его из эксперимента, БТС подвергали эвтаназии гуманным способом.

Оценка объема опухоли

Динамика развития опухоли была исследована с помощью высокопольного магнитно-резонансного томографа Preclinical MRI System 7.0T/17cm (Flexiscan) (MR Solutions, Великобритания). Все исследования проводили на наркотизированных золетил-ксилазином (7–9 мкл/г живой массы БТС, что соответствует 50–60 мг/кг по золетилу (ВИРБАК, Франция) и 20–25 мг/кг по ксилазину (Bioveta. a.s. Ivanovice na Hame, Czech Republic)) животных.

Перед МРТ-исследованием в ретроорбитальный синус мыши вводили 2 мкл контрастного вещества (Омнискан, ДжиИ Хэлскеа Ирланд Корк, Ирландия), разведенного в 150 мкл 0,9 % раствора NaCl для лучшей визуализации опухоли.

МРТ-исследование проводили с помощью импульсной последовательности: FSE T1 axial (Fast Spin Echo T1, аксиальная проекция) со следующими параметрами: время повторения (TR) — 720 мс, время появления эхо-сигнала (TE) — 11 мс, количество срезов — 12, толщина среза (Thk) — 1 мм, расстояние между срезами — 0,1 мм, поле зрения (FOV) — 20×20, размер матрицы (Image Size) — 256×256, количество повторе-

ний (NEX) — 3, угол поворота (FA) — 90°. Время сканирования — 2 мин 25 с.

Площадь опухоли на срезе определяли полуавтоматическим путем с помощью программного обеспечения MultiVox Dicom.

Результаты и обсуждение

Ортотопическая имплантация клеток Gli-261 в головной мозг БТС привела к формированию объемных новообразований. На МРТ-сканах определялась объемная опухоль, имеющая гетероинтенсивный сигнал на T1, с участками некроза, проявляющегося снижением интенсивности сигнала опухолевой ткани, и кровоизлияний, проявляющихся увеличением интенсивности сигнала, явлениями отека и сдавления прилежащих тканей, дислокацией срединных структур головного мозга (рис. 5).

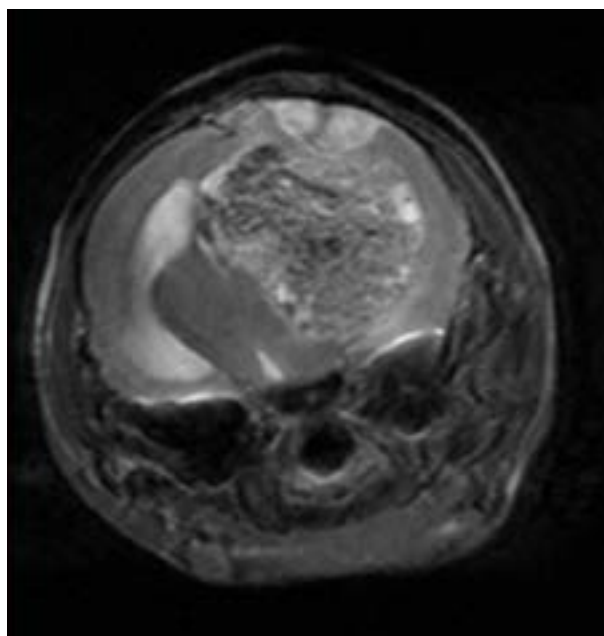


Рис. 5. МРТ-изображение головы мыши с глиобластомой.
Fig. 5. MRI image of the head of a mouse with glioblastoma.

Таблица 1. Комплексная оценка неврологического статуса биологической тест-системы
Table 1. Comprehensive assessment of BTS neurological status

Оцениваемый параметр Parameter	Оценка параметра в баллах Score			
	0	1	2	3
Походка Gait test	Быстрые, плавные, направленные движения Quick, smooth, directional movements	Тремор или хромота при ходьбе, поникший хвост, время от времени наблюдается «сгорбленная» поза Tremor or lameness when walking, a drooping tail, and occasionally a hunched posture	Сильный тремор, пониженный таз и «утиная походка», периодически наблюдается «сгорбленная» поза Severe tremor, low-lying pelvis, waddling gait, and occasionally a hunched posture	Задние лапы не двигаются, передвигаются с помощью передних лап, постоянно наблюдается «сгорбленная» поза, постоянный тремор Immobility of hind paws, only forepaws are used for movement, a permanent hunched posture, permanent tremor
Парапарез (тест с поднятием за хвост) Paraparesis (Tail suspension test)	Задние конечности растопырены наружу, подальше от живота Hind limbs are spread outwards, away from the abdomen	Задние конечности подтягиваются к животу менее чем 50 % времени подвешивания Hind limbs are retracted inwards towards the abdomen for less than 50 % of the suspension period	Задние конечности подтягиваются к животу более чем 50 % времени подвешивания Hind limbs are retracted inwards towards the abdomen for more than 50 % of the suspension period	Задние конечности касаются живота Hind limbs touch the abdomen
Гемипарез Hemiparesis (Neurological deficits)	При поднятии за хвост равное количество попыток поворота в обе стороны When lifted by the tail the BTS makes an equal number of attempts to turn in both directions	Слабые, периодические циркулярные движения. При поднятии за хвост немного больше попыток поворота на противоположную от повреждения сторону Weak, periodic circular movements. When lifted by the tail the BTS makes a little more attempts to turn to the side opposite to the one which is damaged	Слабые, но постоянные циркулярные движения (движение по большому радиусу). При поднятии за хвост больше попыток поворотов на противоположную от повреждения сторону Weak, but persistent circular movements (movement over a large radius). When lifted by the tail the BTS makes more attempts to turn to the side opposite to the one which is damaged	Движение по кругу (по малому радиусу). Потеря рефлекса выпрямления и опоры Circular movements (over a small radius). Loss of the righting and support reflexes
Координация (ходьба по краю клетки) Coordination (Ledge test)	БТС ходит по краю, не теряя равновесие, и плавно опускается в клетку The BTS walks along the edge without losing balance and slowly descends into the cage	БТС теряет почву под ногами во время прогулки вдоль выступа (по верхнему краю клетки), но в остальном выглядит скоординированно The BTS loses balance while walking along the ledge (along the upper edge of the cage), but otherwise seems well-coordinated	БТС неэффективно использует лапы, при спуске приземляется не на лапы, а на голову The BTS inefficiently uses its paws, when descending it lands not on its paws, but on its head	БТС падает с уступа или отказывается двигаться даже при действии сильного внешнего раздражителя The BTS falls off the ledge or refuses to move, even when exposed to a strong external stimulus
Выносливость (висячий тест на 4 лапах) Endurance (Four limb hanging test)	>5 мин с передвижением по поверхности сетки >5 min and moving on the grid surface	>5 мин (на одном месте) >5 min (in the same place)	>5 мин за две попытки >5 min in two attempts	<5 мин за две попытки <5 min in two attempts

Примечание. БТС — биологическая тест-система.
Note. BTS — biological test system.

Результаты еженедельного МРТ-исследования головного мозга у мышей после ортотопической инокуляции клеток GLI-261 показали, что первые признаки новообразования появляются через 2 недели после интрацеребральной инъекции. Дальнейший рост опухоли сопровождался экспоненциальным увеличением ее объема (рис. 6).

При оценке зависимости продолжительности жизни от количества вводимых клеток (рис. 7) было обнаружено, что уменьшение количества клеток в 10 раз увеличивает медиану выживаемости на 33 % (9 суток), а также уменьшает средний

объем опухоли в 8 раз к 21 суткам по данным МРТ с $77,4 \pm 19,2$ до $9,5 \pm 1,77$ мм³ (рис. 8).

В ходе оценки неврологической симптоматики при помощи поведенческих тестов было показано, что объем опухоли (по данным МРТ) коррелирует с выраженностью клинических симптомов: чем больше опухоль, тем более выражены нарушения (рис. 9).

По итогам проведенных экспериментов для дальнейших исследований наиболее перспективной была признана концентрация $8,33 \cdot 10^6$ клеток GLI-261 в 1 мл.

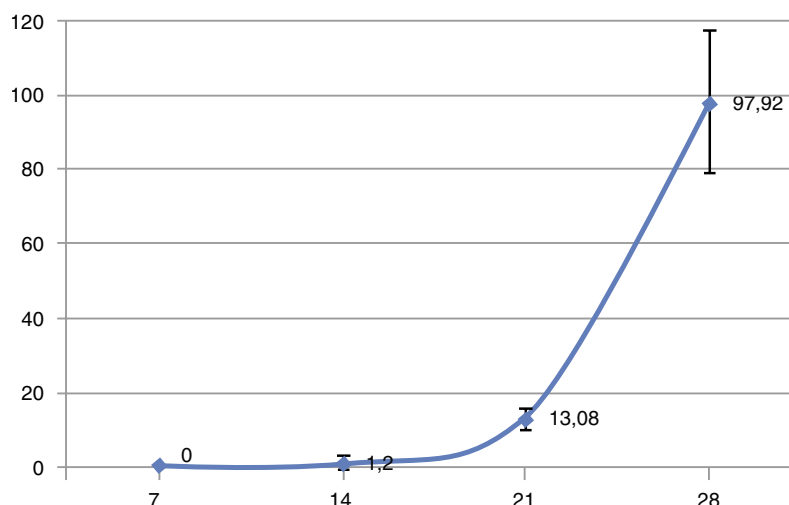


Рис. 6. Динамика изменения объема опухоли. Ось абсцисс — время после инокуляции, сут; ось ординат — объем опухоли, мм³.
Fig. 6. Dynamics of tumour volume. X axis — time after inoculation, days; Y axis — tumour volume, mm³.

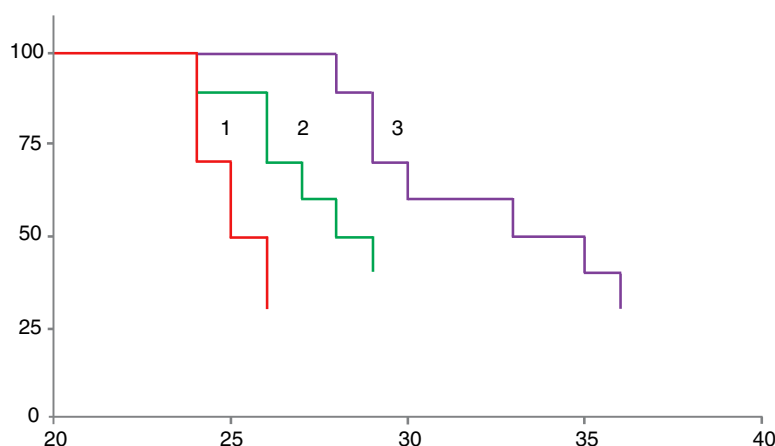


Рис. 7. Кривые выживаемости биологической тест-системы. Дозозависимый эффект. Ось абсцисс — время после инокуляции, сут; ось ординат — выживаемость, %. 1 — $5.0 \cdot 10^3$, 2 — $1.5 \cdot 10^3$, 3 — $5.0 \cdot 10^2$ клеток/БТС.
Fig. 7. BTS survival curves. Dose dependent effect. X axis — time after inoculation, days; Y axis — survival, %. 1 — $5.0 \cdot 10^3$, 2 — $1.5 \cdot 10^3$, 3 — $5.0 \cdot 10^2$ cells/BTS.

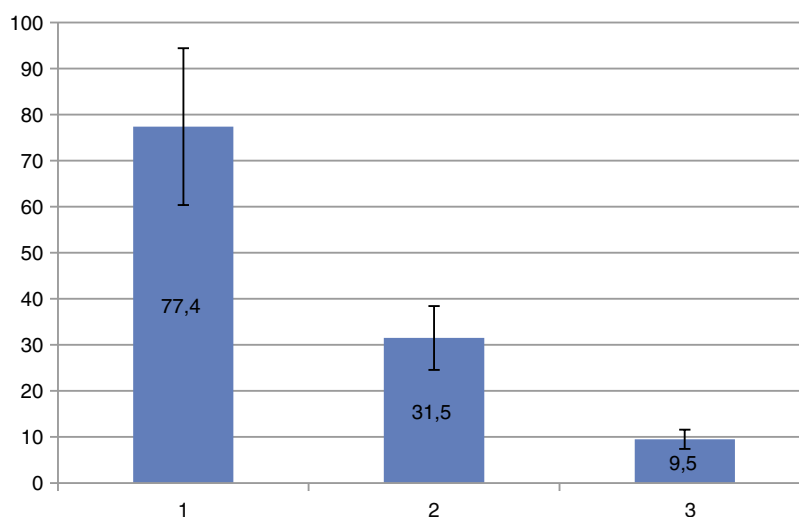


Рис. 8. Объем опухоли на 21 сутки после инокуляции опухолевых клеток. Ось абсцисс — доза инокулированных опухолевых клеток; ось ординат — объем опухоли, мм³. 1 — $5.0 \cdot 10^3$, 2 — $1.5 \cdot 10^3$, 3 — $5.0 \cdot 10^2$ клеток/БТС.
Fig. 8. Tumour volume on day 21 after tumour cell inoculation. X axis — the dose of inoculated tumour cells; Y axis — tumour volume, mm³. 1 — $5.0 \cdot 10^3$, 2 — $1.5 \cdot 10^3$, 3 — $5.0 \cdot 10^2$ cells/BTS.

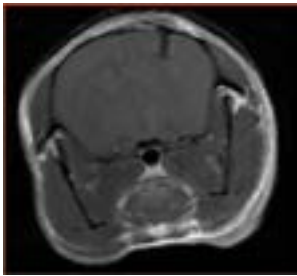
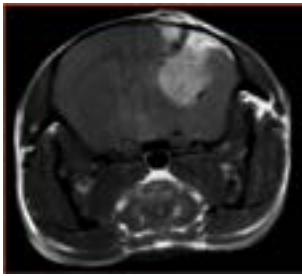
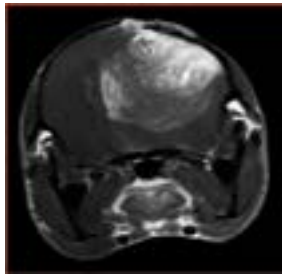
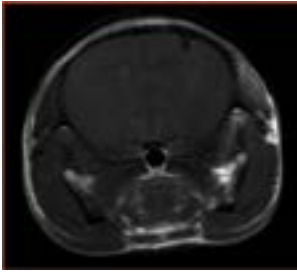
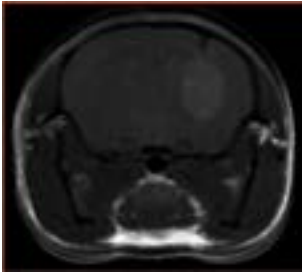
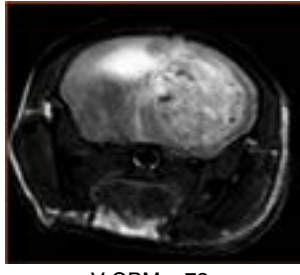
17 сутки Day 17	31 сутки Day 31	38 сутки Day 38
		
V GBM = 0, КОНС = 0	V GBM = 12, КОНС = 2	V GBM = 109, КОНС = 13
		
V GBM = 1, КОНС = 0	V GBM = 9, КОНС = 1	V GBM = 73, КОНС = 10

Рис. 9. Сравнение размера (МРТ-визуализация) опухоли и клинической картины у биологической тест-системы. V GBM — объем глиобластомы мыши по данным МРТ, мм³; КОНС — комплексная оценка неврологического статуса, балл.

Fig. 9. Comparison of the tumour volume (MRI-visualisation) and clinical presentation. V GBM — tumour volume, mm³; КОНС — comprehensive assessment of the neurological status, score.

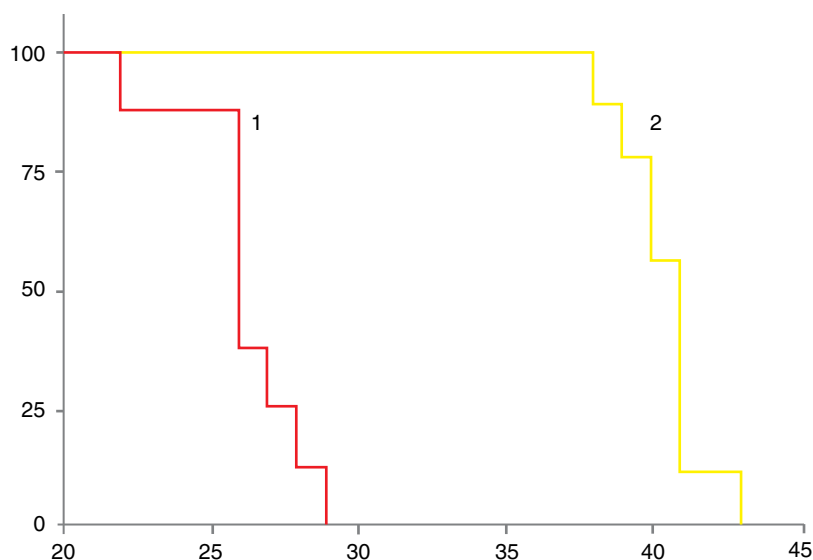


Рис. 10. Выживаемость биологической тест-системы на фоне применения темозоломида. Ось абсцисс — время после инокуляции опухолевых клеток, сут; ось ординат — выживаемость, %. 1 — введение фосфатно-буферного раствора в объеме, равном объему введенного темозоломида, и по той же схеме; 2 — введение темозоломида.

Fig. 10. BTS survival with Temozolomide. X axis — time after tumour cell inoculation, days; Y axis — survival, %. 1 — administration of the phosphate-buffered saline in a volume equal to the volume of the administered temozolomide and following the same regimen; 2 — administration of temozolomide.

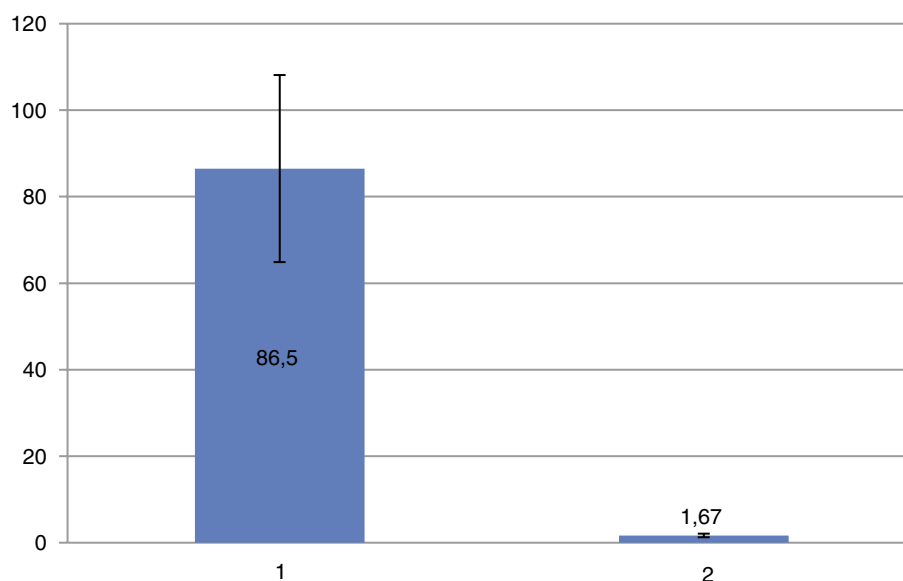


Рис. 11. Средний объем опухоли на 24 сутки после инокуляции опухолевых клеток. Ось абсцисс — группы БТС; ось ординат — объем опухоли, мм³. 1 — введение фосфатно-буферного раствора в объеме, равном объему введенного темозоломида, и по той же схеме; 2 — введение темозоломида.

Fig. 11. Comparison of the tumour volume and clinical presentation. X axis — BTS groups; Y axis — tumour volume, mm³. 1 — administration of the phosphate-buffered saline in a volume equal to the volume of the administered temozolomide and following the same regimen; 2 — administration of temozolomide.

На следующем этапе была проведена серия экспериментов с лечением опухоли темозоломидом («золотой стандарт» при лечении глиобластом).

Применение темозоломида привело к увеличению продолжительности и качества жизни БТС. Медиана выживаемости в группе с темозоломидом (рис. 10) была в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе (41,5 суток против 26 суток соответственно и объем опухоли на 24 сутки после операции, оцениваемый при помощи МРТ, был значительно меньше: $1,67 \pm 1,5$ против $86,5 \pm 41,4$ мм³ (рис. 11). Клиническая картина также кардинально отличалась: в группе контроля все БТС пали или были в агональном состоянии (15 баллов по данным клинического осмотра), в то время как в группе с лечением темозоломидом все БТС были клинически здоровы (0–3 балла по КОНС), что подтверждает результаты исследования других авторов [8].

Заключение

Полученные в результате исследования данные свидетельствуют о дозозависимом развитии опухолевого процесса при экспериментальном моделировании глиобластомы мышей на основе линии клеток GLi-261. Важно, что дозозависимый эффект наблюдается практически по всем наиболее значимым параметрам оценки опухолевого процесса, а именно по:

- медиане выживаемости;
- динамике развития опухоли;
- клиническому состоянию биологической тест-системы.

В процессе исследования отработана комплексная оценка тяжести протекания опухолевого процесса, включающая в себя:

- МРТ-исследование (для неинвазивного прижизненного определения наличия и динамики развития опухоли, а также процессов, протекающих в развивающейся опухоли (некроз, кровоизлияние));

- клинический осмотр (адаптирован и внедрен в практику перечень неврологических проявлений глиобластомы, определена корреляция с размером опухоли);

- оценку медианы выживаемости.

Показано, что темозоломид, примененный в отношении разработанной модели экспериментальной глиобластомы, эффективно замедляет динамику развития опухоли, увеличивает медиану выживаемости животных, а также снижает выраженность клинических симптомов.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о разработанной впервые в России хирургической экспериментальной модели ортотопической глиобластомы мышей на основе линии клеток GLi-261, с использованием стереотаксического и МРТ-оборудования, оценкой клинического состояния экспериментальных животных. Данная экспериментальная модель может быть использована в качестве *in vivo* тест-системы для доклинической оценки эффективности новых противоопухолевых препаратов, а также отработки схем лечения онкологических заболеваний головного мозга при комплексной терапии.

Благодарности. Коллектив авторов выражает благодарность компании ООО «Селлтера Фарм» и лично ее генеральному директору С.В. Ручко за любезно предоставленную возможность использования материалов МРТ-исследования.

Acknowledgments. The authors express gratitude to «Selltera Farm», ООО and to Sergey Ruchko, General Director, in particular, for their kind permission to use MRI materials.

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

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

Литература/References

1. Yi L, Zhou C, Wang B, Chen T, Xu M, Xu L, Feng H. Implantation of GL261 neurospheres into C57/BL6 mice: a more reliable syngeneic graft model for research on glioma-initiating cells. *Int J Oncol*. 2013;43(2):477–84. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1962>
2. Arias-Ramos N, Ferrer-Font L, Lope-Piedrafita S, Mocioiu V, Julià-Sapé M, Pumarola M, et al. Metabolomics of therapy response in preclinical glioblastoma: a multi-slice MRSI-based volumetric analysis for noninvasive assessment of temozolomide treatment. *Metabolites*. 2017;7(2). <https://doi.org/10.3390/metabo7020020>
3. Завьялов ЕЛ, Разумов ИА, Герлинская ЛА, Ромашенко АВ. *In vivo* МРТ-визуализация динамики развития глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(4):460–5. [Zavjalov EL, Razumov IA, Gerlinskaya LA, Romashchenko AV. *In vivo* MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotransplantation U87 glioblastoma mouse SCID model. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(4):460–5 (In Russ.)]
4. Hatzipetros T, Kidd JD, Moreno AJ, Thompson K, Gill A, Vieira FG. A quick phenotypic neurological scoring system for evaluating disease progression in the SOD1-G93A mouse model of ALS. *J Vis Exp*. 2015;(104):e53257. <https://doi.org/10.3791/53257>
5. Shen W, Hu JA, Zheng JS. Mechanism of temozolomide-induced antitumor effects on glioma cells. *J Int Med Res*. 2014;42(1):164–72. <https://doi.org/10.1177/0300060513501753>
6. Guyenet SJ, Furrer SA, Damian VM, Baughan TD, La Spada AR, Garden GA. A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *J Vis Exp*. 2010;(39):e1787. <https://doi.org/10.3791/1787>
7. Aartsma-Rus A, van Putten M. Assessing functional performance in the Mdx mouse model. *J Vis Exp*. 2014;(85):e51303. <https://doi.org/10.3791/51303>
8. Брюховецкий ИС. Эффективность применения препарата стволовых клеток в эксперименте *in vivo* после курса химиотерапии на модели глиобластомы у крыс. *Российский биотерапевтический журнал*. 2014;13(4):51–7. [Bryukhovetskiy IS. Efficiency of stem cell preparation in the experiment *in vivo* after a course of chemotherapy on the experimental model of glioblastoma in rats. *Rossiiskij bioterapevticheskij Zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy*. 2014;13(4):51–7 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Овсепян Армен Алексанович. Armen A. Ovsepyan. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0628-5513>

Борзов Антон Александрович. Anton A. Borzov. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9199-8464>

Каторкина Елена Ивановна. Elena I. Katorkina. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3329-0182>

Анисимова Екатерина Олеговна, канд. вет. наук. *Ekaterina O. Anisimova, Cand. Sci. (Vet.).* **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5457-3072>

Лыков Максим Валерьевич, канд. мед. наук. *Maksim V. Lykov, Cand. Sci. (Med.).* **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5740-6664>

Поступила 20.09.2019

После доработки 25.10.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 20 September 2019

Revised 25 October 2019

Accepted 22 November 2019

Применение метода коротких tandemных повторов для аутентификации клеточных линий

М. Д. Хорольский*, И. С. Семенова, Е. В. Мельникова, 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

На сегодняшний день метод коротких tandemных повторов (STR-анализ) является признанным международным стандартом для установления подлинности и генетической стабильности клеточных линий, поэтому развитие и внедрение метода в рутинную практику банков/коллекций является актуальной задачей. Кроме того, развитие сферы биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), в которых клеточные линии являются основным компонентом, диктует необходимость внедрения метода STR-анализа и для оценки их подлинности в ходе экспертизы качества. В настоящее время Государственная фармакопея Российской Федерации не предусматривает обязательного применения метода STR-анализа для идентификации клеточных линий, в то время как в зарубежной практике для контроля качества клеточных линий он используется около десяти лет. Использование в медицинской практике идентифицированных клеточных линий обеспечит эффективность и безопасность применения БМКП. **Цель работы:** оценка возможности применения метода STR-анализа для аутентификации и определения генетической стабильности клеточных линий человека на примере U937, WISH, WIL2-S, NK-92, Jurkat Clone E6-1. **Материалы и методы:** клеточные линии человека — U937 (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Европейский союз), WISH, WIL2-S, NK-92, Jurkat Clone E6-1 (American Type Culture Collection, США). Определение аллельного профиля клеточных линий осуществляли методом STR-анализа с использованием набора COrDIS Plus (Gordiz, Россия). Электрофоретическое разделение проводили на приборе Genetic Analyzer 3500 Series. Сравнение профилей клеточных линий проводили с использованием данных, представленных на сайтах коллекций European Collection of Authenticated Cell Cultures, American Type Culture Collection. **Результаты:** на основе сравнительных данных о наборах AuthenticFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и GenePrint® 10 System (Promega Corporation, США), предназначенных для определения подлинности клеточных линий методом STR-анализа, с характеристиками набора COrDIS plus установлено, что набор COrDIS plus содержит в себе все локусы суммарно из зарубежных наборов, а также включает локусы, рекомендованные Международным комитетом по идентификации клеточных линий человека. Установлено полное генетическое соответствие линий U-937, WIL2S, WISH, NK-92 стандартным профилям, представленным на сайтах международных коллекций. Выявлена генетическая нестабильность клеточной линии Jurkat Clone E6-1, проявляющаяся потерей гена амелогенина. **Выводы:** подтверждена возможность применения метода STR-анализа для аутентификации и определения генетической стабильности с использованием набора COrDIS plus на примере клеточных линий U937, WISH, WIL2-S, NK-92, Jurkat Clone E6-1. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения набора COrDIS plus для анализа клеточных линий, входящих в состав БМКП, в биомедицинских исследованиях, а также в ходе проведения экспертизы качества БМКП.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт; идентичность (подлинность); аллельный профиль клеточных линий; STR-анализ; клеточная линия

Для цитирования: Хорольский МД, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение метода коротких tandemных повторов для аутентификации клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):251–260. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-251-260>

Контактное лицо: Хорольский Михаил Дмитриевич; khorolsky@expmed.ru

The Use of Short Tandem Repeat Analysis for Cell Line Authentication

M. D. Khorolsky*, I. S. Semenova, E. V. Melnikova, Yu. V. Olefir

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

Short tandem repeat analysis (STR) is a well-established international method of authentication and genetic stability testing of cell lines (CLs). Therefore, the development and introduction of this method into routine practice of cell banks and cell culture collections is a pressing concern. In addition, the expansion of the field of cell-line based biomedical cell products (BCPs) necessitates the implementation of STR as a tool of identification testing during quality control. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation does not require mandatory use of STR for cell line identification, while other countries have been using this method for cell line quality control for about a decade. The use of identified CLs in medical practice will ensure the efficacy and safety of BCPs. **The aim of the study** was to assess the possibility of using STR analysis for authentication and genetic stability testing of CLs using U937, WISH, WIL2-S, NK-92, and Jurkat Clone E6-1 CLs as examples. **Materials and me-**

thods: the following human CLs were used in the study: U937 (ECACC), WISH (ATCC), WIL2S (ATCC), NK-92 (ATCC), and Jurkat Clone E6-1 (ATCC). The CL allelic profiles were determined by STR using the COrDIS Plus kit (Gordiz, Russia). The electrophoretic separation was performed using a Genetic Analyzer 3500 Series instrument. The data provided on the websites of the European Collection of Authenticated Cell Cultures and American Type Culture Collection were used to compare the CL profiles. **Results:** the AuthenticFiler PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and the GenePrint 10 System (Promega Corporation, USA) intended for CL authentication by STR were compared with the characteristics of the COrDIS plus kit (Gordiz, Russia). The results of the comparison demonstrated that the COrDIS plus kit includes all the loci found in the foreign kits, as well as the loci recommended by the International Cell Line Authentication Committee. The U-937, WIL2S, and NK-92 CLs demonstrated genetic identity with the reference profiles available on the websites of the international collections. The Jurkat Clone E6-1 CL was found to be genetically instable due to the loss of the amelogenin gene. **Conclusions:** it was demonstrated by the examples of U937, WISH, WIL2-S, NK-92, and Jurkat Clone E6-1 CLs that STR and the COrDIS plus kit could be used for authentication and genetic stability testing. The obtained results suggest the feasibility of using the COrDIS plus kit for the analysis of CLs used in BCPs, for BCP quality control, and biomedical research.

Key words: biomedical cell product; authenticity (identification); cell line allelic profile; STR; cell line

For citation: Khorolsky MD, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. The use of short tandem repeat analysis for cell line authentication. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):251–260. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-251-260>

*Corresponding author: Mikhail D. Khorolsky; khorolsky@expmed.ru

Одно из наиболее значимых достижений современной науки и медицины — это разработка препаратов для медицинского применения (иммунобиологических, биотехнологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов) с использованием / на основе клеточных линий (КЛ). Активное использование КЛ диктует необходимость развития методов контроля их качества и стандартизации, учитывая в первую очередь такие специфические параметры, как подлинность (генетическое соответствие организму — источнику получения, наличие определенных поверхностных маркеров и секретомов) и безопасность (отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, генетическим материалом других КЛ). Аутентификация КЛ подразумевает доказательство ее соответствия исходному материалу на уровне ДНК и отсутствия контаминации другими КЛ (в том числе клеточными линиями других видов).

По данным ученых С. Korch с соавт. [1] и Т.Л. Rizner с соавт. [2], неверная идентификация КЛ и/или контаминация генетическим материалом других КЛ обнаруживается почти в 40 % банкированных КЛ и зачастую приводит к получению недостоверных результатов при научных исследованиях. Ошибки идентификации и дальнейшее медицинское применение контаминированных КЛ недопустимы и могут нанести существенный вред при их применении пациентам.

Отдельным классом препаратов, которые применяются в терапии заболеваний, являются биомедицинские клеточные продукты (БМКП), содержащие в себе одну или несколько КЛ и вспомогательные вещества, а также зарегистрированные лекарственные препараты / фармацевтические субстанции и/или медицинские изделия¹. Контроль качества БМКП отличается от контроля качества лекарственных препаратов (ЛП) в первую очередь обязательным определением соответствия качества КЛ, входящей в состав БМКП, что обусловлено особенностью их производства — наличием необходимого этапа культивирования КЛ.

Первые упоминания о межвидовой перекрестной (кросс-) контаминации КЛ человека и животных появились в конце

60-х годов XX века [3]. В работах А. Rojas с соавт. [4], Л.С. Lin с соавт. [3] описываются случаи перекрестного загрязнения опухолевыми линиями клеток HeLa перевиваемых клеточных культур, использование которых в экспериментах искажало результаты биомедицинских исследований.

Для своевременного выявления контаминации в 2010 г. Международный комитет по идентификации КЛ (International Cell Line Authentication Committee) опубликовал рекомендации о необходимости периодического проведения видовой идентификации и аутентификации клеточных культур².

Методы определения подлинности КЛ постоянно совершенствуются. На протяжении многих лет для аутентификации клеток применялись такие методы, как изоферментный анализ, кариотипирование, HLA-типирование и иммунофенотипирование [5, 6]. Однако в последнее десятилетие наиболее широкое распространение получили молекулярно-биологические методы определения подлинности КЛ. Самыми известными и эффективными являются методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7]. Данная группа методов является чрезвычайно чувствительной и селективной.

Анализ профиля ДНК наравне с цитогенетическими методами, в соответствии с рекомендациями ВОЗ³ и документами ICH⁴, должен использоваться при характеристике главных и рабочих клеточных банков для подтверждения подлинности и генетической стабильности КЛ. Это требование становится особенно актуальным и в сфере развития банкирования КЛ человека для целей производства БМКП. Кроме того, отсутствие генетических изменений в результате проводимых манипуляций с клетками в процессе производства БМКП особенно важно в случае использования стволовых клеток из-за возможного риска онкогенной трансформации как *in vitro*, так и *in vivo* [7].

При выборе правильных генов-мишеней существует возможность определения подлинности большого количества клеточных культур различного происхождения. Разнообразие аналитических систем, позволяющих идентифицировать

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

² Guide to Human cell line authentication. 19 November 2012. International Cell Line Authentication Committee. https://standards.atcc.org/kwspub/home/the_international_cell_line_authentication_committee-iclac/Authentication_SOP.pdf

³ Annex 3. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO Technical Report Series 978; 2013. http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf

⁴ ICH Topic Q5D Quality of biotechnological products: derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/294/95). EMEA; 1998.

видовую принадлежность клеточных культур, привело к образованию концепции ДНК-фингерпринтинга — качественному и точному методу оценки генома, практически лишенному недостатков, к которому относится и метод коротких tandemных повторов (Short tandem repeat analysis, STR-анализ), который позволяет оценить распределение аллелей [8].

Методы, основанные на фрагментном анализе нуклеиновых кислот, для аутентификации КЛ в настоящее время рекомендуются и в нормативном документе США⁵, регламентирующем выбор методов для контроля качества КЛ. В Российской Федерации Государственная фармакопея⁶ на сегодняшний день не содержит конкретных рекомендаций по использованию молекулярно-генетических методов фрагментного анализа для определения подлинности КЛ.

Изначально метод STR-анализа применялся в судебной экспертизе при установлении личности подозреваемых, а также для определения степени родства [9–12]. Позже метод STR-анализа профилирования стал применяться в аутентификации КЛ при биомедицинских исследованиях различного характера [13]. Ввиду того что генетический профиль чистой КЛ должен оставаться неизменным на протяжении всего процесса культивирования, процедура идентификации методом коротких tandemных повторов становится обязательной. Ограничение применения данного метода может касаться только опухолевых КЛ, так как они часто дефектны по гетерозиготности или содержат множественные копии аллеля [14].

Немаловажную роль в актуальности и востребованности данного метода играет его применимость при генетическом профилировании клеток животных, которые активно используются в научных экспериментах, а также в качестве субстратов получения биотехнологических и иммунобиологических ЛП.

Клеточные линии мышей являются самым популярным выбором при исследовании человеческих генов и заболеваний. Они используются в биотехнологии рекомбинантных белков и являются фидерными клетками для эмбриональных стволовых клеток. Существуют данные о профилировании КЛ мышей при помощи набора STR-локусов с установлением зависимости длины фрагмента от количества повторов секвенированием по Сэнгеру. Проведенные исследования показали успешную идентификацию мышиных КЛ, а также возможность обнаруживать изменения в геноме [15].

Исследования по аутентификации КЛ животных проводились не только на клетках белых мышей, но и на обезьянах. Такой выбор обусловлен частотой использования и схожестью КЛ обезьян с клетками человека. Поскольку генотип обезьян схож с генотипом человека, для испытаний использовались самые распространенные наборы STR-локусов, предназначенные для идентификации КЛ человека. Восемь STR-маркеров были отобраны согласно следующим правилам: локус должен иметь как минимум 4 уникальных аллеля, локус должен отображаться в каждом повторе эксперимента, локус должен содержать тетраплексионный повтор. По итогам проведенных исследований установлено, что наборы STR-локусов для идентификации человеческих КЛ можно использовать для идентификации клеток обезьян. Для установления стабильности данных локусов испытания проводились в течение 6 месяцев. По истечении этого времени было установлено, что эти участки остаются неизменными даже при высоком числе пассажей [16].

В настоящее время метод фрагментного анализа является одним из передовых способов аутентификации клеточных культур. Мировые коллекции КЛ, такие как American Type Culture Collection (ATCC), Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB), Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), используют метод STR-анализа для установления подлинности клеточных культур. В России в 1978 г. была создана Всесоюзная (Российская) коллекция клеточных культур, объединяющая биобанки различных НИИ, в том числе коллекция культур клеток позвоночных ФГБУН Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Коллекция оказывает услуги по характеристике, стандартизации и хранению КЛ. В паспортах КЛ указана информация по аутентификации ДНК профиля КЛ человека методом STR-анализа по 9 локусам [17], которые соответствуют рекомендованным Международным комитетом по идентификации КЛ человека⁷. С 2017 г. STR-профилирование стало использоваться и в Покровском банке стволовых клеток (PSCB).

Американский национальный институт стандартов (American National Standards Institute, ANSI) вместе с ATCC разработали международный документ ASN-0002, стандартизирующий методологию и подходы к ДНК-профилированию. Общей целью этого документа является стандартизация методов выделения ДНК, метода проведения фрагментного анализа, метода обработки и интерпретации данных.

Принцип использования метода STR-анализа для подтверждения подлинности (аутентификации) КЛ заключается в нахождении соответствий между полученным генетическим профилем и референсным профилем, предоставленным биобанком/коллекцией. В случае получения аутологичного БМКП референсным выступает генетический профиль донора. Генетические профили состоят из комбинаций локусов (месторасположение определенного гена на хромосоме). Каждый локус представлен tandemно повторяющимися мономерами и достигает длиной до 9 пар оснований. Генетический профиль получается в результате амплификации определенных аллелей образца ДНК при помощи готовых STR-наборов. Такие наборы могут быть предназначены для идентификации до 20 локусов одновременно. В настоящее время в мире принято несколько локусных стандартов или групп локусов с определенными, конкретными локусами, которые используются для идентификации личности в судебной медицине, криминалистике и аутентификации КЛ в биомедицинских исследованиях. Самыми популярными из них являются следующие стандарты: CODIS (США), ESSS (ЕС), UK Core Loci (Великобритания), German Core Loci (Германия), Interpol Standard Set of Loci (международная база, не применяется в аутентификации КЛ).

В настоящее время только два набора импортного производства имеют непосредственное назначение «для установления подлинности клеточной линии» методом коротких tandemных повторов: AuthenticFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и GenePrint® 10 System (Promega Corporation, США) (табл. 1). Эти наборы кардинально отличаются перечнем определяемых STR-локусов (общий только один определяемый локус — TH01). Причем только набор GenePrint® 10 System предназначен для определения STR-локусов, рекомендованных Международным комитетом по идентификации КЛ⁸.

⁵ <1046> Cellular and Tissue-Based Products. USP 41–NF 36.

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

⁷ Guide to Human cell line authentication. 19 November 2012. International Cell Line Authentication Committee. https://standards.atcc.org/kwspub/home/the_international_cell_line_authentication_committee-iclac/Authentication_SOP.pdf

⁸ Там же.

В Российской Федерации на данный момент не существует наборов STR-анализа отечественного производства, которые были бы предназначены конкретно для определения подлинности КЛ человека. Ранее нами была показана возможность применения набора отечественного производителя COrDIS plus (ООО «Гордиз», Россия) для фрагментного анализа, содержащего одновременно 20 локусов из разных баз данных [18].

Набор COrDIS plus (табл. 1) содержит в себе суммарно практически все локусы из наборов GenePrint и Authentifiler, а также включает локусы, рекомендованные мировым научным сообществом для идентификации⁹. Кроме того, при выборе набора COrDIS plus необходимо учитывать и экономическую составляющую при оценке стоимости анализов по аутентификации КЛ: набор отечественного производства значительно дешевле наборов, разработанных за рубежом.

Таким образом, для проведения нашего исследования был выбран набор COrDIS plus (ООО «Гордиз»), в который входят наиболее распространенные локусы (в соответствии с CODIS) и включающий все рекомендованные локусы для аутентификации КЛ. В ходе эксперимента нами была оценена возможность применения набора COrDIS plus для определения подлинности и генетической стабильности КЛ человека.

Цель работы — оценка возможности применения метода STR-анализа для аутентификации и определения генетической стабильности клеточных линий человека U937, WIL2-S, WISH, Jurkat Clone E6-1, NK-92.

Материалы и методы

Материалы

В таблице 2 представлен перечень КЛ, использованных для определения аллельного профиля методом STR-анализа с применением набора COrDIS Plus (арт. CP-192S, ООО «Гордиз», Россия). Характеристики набора COrDIS Plus представлены в таблице 1.

Методы

Выделение ДНК КЛ проводили при помощи набора PureLink gDNA (Invitrogen, кат. № K182002) в двух повторностях. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) при длине волны 260 нм.

Для постановки ПЦР при помощи набора COrDIS Plus в пробирку вносили 5 мкл активатора (содержащего буферный раствор и ионы Mg^{2+}) и добавляли до 20 мкл исследуемой геномной ДНК для получения концентрации 1 нг. Оптимальное количество ДНК — 1 нг (в соответствии с рекомендациями к набору COrDIS Plus). Объем полученного раствора доводили до 25 мкл деионизированной водой. Реакционную смесь перемешивали до гомогенного состояния 5–8-кратным пипетированием и затем интенсивно перемешивали. Раствор на дне пробирки собирали коротким центрифугированием при 2000 об./мин в течение 15 с.

Помимо исследуемых ДНК, с каждой серией был амплифицирован один положительный и один отрицательный конт-

Таблица 1. Сравнительная характеристика наборов для STR-анализа
Table 1. Comparison of STR reagent kits

Показатель Parameter	Характеристика набора Kit description			
	AuthentiFiler™ PCR Amplification Kit	GenePrint® 10 System	COrDIS Plus	
Количество локусов Number of loci	9+амелогенин 9+amelogenin	9+амелогенин 9+amelogenin	19+амелогенин 19+amelogenin	
Локусы Loci	D10S1248 D1S1656 Amelogenin D2S1338 D22S1045 D19S433 TH01 D2S441 D6S1043 D12S391	TH01 D21S11 D5S818 D13S317 D7S820 D16S539 CSF1PO Amelogenin vWA TPOX	Amelogenin D3S1358 TH01 D12S391 D1S1656 D10S1248 D22S1045 D2S441 D7S820 D13S317	FGA TPOX D18S51 D16S539 D8S1179 CSF1PO D5S818 VWA D21S11 SE33
Назначение набора Kit's intended use	Для аутентификации клеточных линий, исключая судебные, диагностические и терапевтические исследования Cell line authentication, including forensic, diagnostic and therapeutic research	Для аутентификации клеточных линий человека Human cell line authentication	Идентификация личности Identification of personality	
Чувствительность Sensitivity	0,125–2 нг 0.125–2 ng	10 нг 10 ng	0,2–2 нг 0.2–2 ng	
Дискриминирующий потенциал набора Power of discrimination	Менее 1 на 10^{11} Less than 1 in 10^{11}	Менее 1 на 10^{17} Less than 1 in 10^{17}	Менее 1 на 10^{21} Less than 1 in 10^{21}	
Количество реакций Number of reactions	50	50	192	
Время анализа, ч Analysis time, h	4	4–5	6–7	
Тип ПЦР PCR type	Классическая Conventional	Классическая Conventional	Градиентная Gradient	

⁹ Там же.

Таблица 2. Перечень клеточных линий, использованных в эксперименте по определению аллельного профиля методом STR-анализа

Table 2. Cell lines used in STR analysis of the allelic profile

№ п/п No.	Наименование Name	Пассаж Passage	Коллекция Collection	Происхождение Origin
1	Jurkat Clone E6-1	3	ATCC® TIB-152™	Человек, острая лейкемия, Т-лимфоциты, периферическая кровь Human, acute leukemia, T lymphocytes, peripheral blood
2	NK-92	8	ATCC® CRL-2407™	Человек, натуральные киллеры Human, natural killer cells
3	U-937	4	ECACC® General Collection Cat. No. 85011440	Человек, гистиоцитарная лимфома Human, histiocytic lymphoma
4	WIL2-S	2	ATCC® CCL-8885™	Человек, В-лимфобластные клетки, экспрессирующие на поверхности антиген CD20 Human, B lymphoblasts expressing the CD20 antigen on the cell surface
5	WISH	2	ATCC® CCL-25™	Человек, клетки амниона Human, amnion cells

Примечание. ATCC — American Type Culture Collection, США; ECACC — European Collection of Authenticated Cell Cultures, Европейский союз.

Note. ATCC: American Type Culture Collection, USA; ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures, European Union.

роль. Для приготовления положительного контроля вместо исследуемой ДНК в пробирку добавляли 1 мкл контрольной ДНК (входит в состав набора), для приготовления отрицательного контроля в пробирку вместо исследуемой ДНК добавляли деионизированную воду. Параметры температурного градиента для проведения ПЦР указаны в таблице 3.

Для получения полного STR-профиля соответствующей КЛ проводили фрагментный анализ — электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора COrDIS Plus. Электрофоретическое разделение проводили на приборе Genetic Analyzer 3500 Series (Applied Biosystems). Перед загрузкой образцов готовили смеси деионизированного формамида и размерного стандарта S550 (входит в состав набора), разведенного в соотношении 10:1. Полученную смесь тщательно перемешивали и добавляли по 10 мкл смеси в каждую лунку стрипа. Во все лунки (за исключением лунки, предназначенной для «аллельного стандарта»), вносили по 1 мкл ПЦР-продукта. В отдельную лунку вносили 1 мкл раствора «аллельного стандарта». Готовый стрип тщательно встряхивали и центрифугировали.

Электрофоретическое разделение проводили на капиллярах длиной 50 см с использованием полимера POP6 и набором красителей Apy5Dye.

Экспериментально полученные генетические профили сравнивали с представленными на сайтах¹⁰.

Результаты и обсуждение

Для оценки возможности применения метода STR-анализа нами были установлены генетические профили следующих КЛ из коллекций ATCC и ECACC: U-937, WIL2S, WISH, Jurkat Clone E6-1, NK-92.

В ходе эксперимента было установлено полное генетическое соответствие линий U-937, WIL2S, WISH, NK-92 с представленными на сайте коллекций стандартными профилями. Генетические профили вышеуказанных линий представлены в таблице 4.

Экспериментально полученные профили представлены на рисунках 1, 2.

Генетический профиль КЛ Jurkat Clone E6-1 отличался от представленного на сайте ATCC стандарта по отсутствию од-

Таблица 3. Параметры температурного градиента для проведения ПЦР

Table 3. Temperature gradient parameters for PCR

Температура, °C Temperature, °C	Время Time	Количество циклов Number of cycles
94 98 59 72	3 мин (min) 30 с (s) 120 с (s) 90 с (s)	4
94 59 72	30 с (s) 120 с (s) 90 с (s)	6
90 59 72	30 с (s) 120 с (s) 75 с (s)	18
68 15	10 мин (min) ∞	1

ного аллеля гена амелогенина. Локусный состав полученного генетического профиля и стандарта ATCC представлены в таблице 5 и на рисунке 3.

Таким образом, в результате проведенного эксперимента по построению генетического профиля КЛ у четырех из пяти КЛ аллельные профили соответствовали представленным данным коллекций. Для КЛ Jurkat Clone E6-1 была зафиксирована потеря гена амелогенина Y. В соответствии с данными Y. Huang с соавт. [19], геном клеток Jurkat Clone E6-1 является изменчивым и нестабильным, потеря одного из локусов при исследовании методом STR-анализа может происходить вследствие мутаций в геноме КЛ или изменения последовательности генов.

Выводы

В настоящее время метод коротких tandemных повторов является признанным международным стандартом для установления подлинности и генетической стабильности КЛ, поэтому развитие и внедрение его в рутинную практику банков/коллекций является актуальной задачей. Кроме того, развитие сферы БМКП, в которых КЛ являются основным компонентом, диктует необходимость внедрения метода STR-анализа и для

¹⁰ American Type Culture Collection. https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=ru

European Collection of Authenticated Cell Cultures. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx>

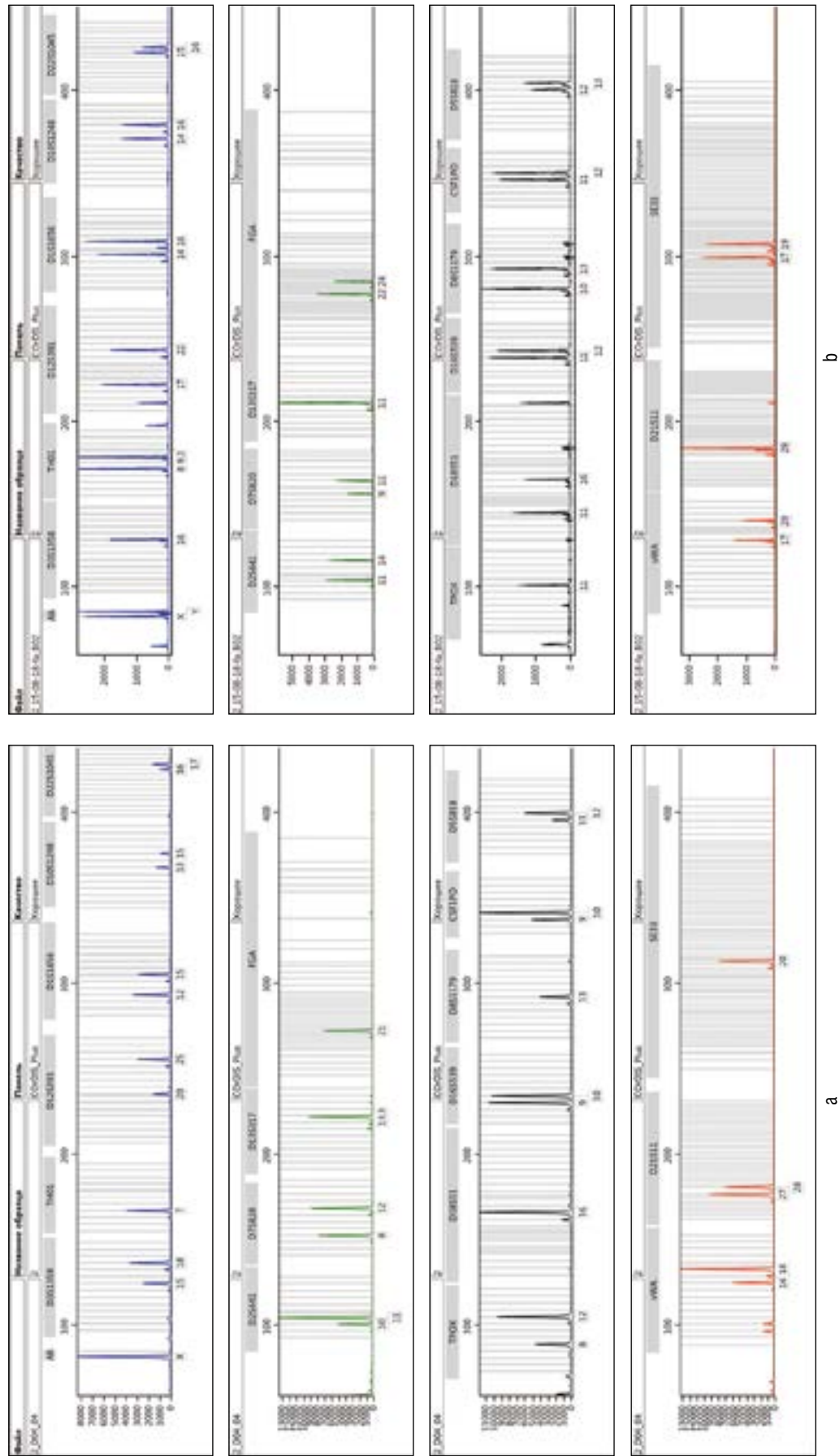


Рис. 1. Экспериментально полученные STR-профили клеточных линий: а — WIL2-S; б — WIL2-S.
Fig. 1. Obtained STR-profiles: а — WIL2-S; б — WIL2-S.

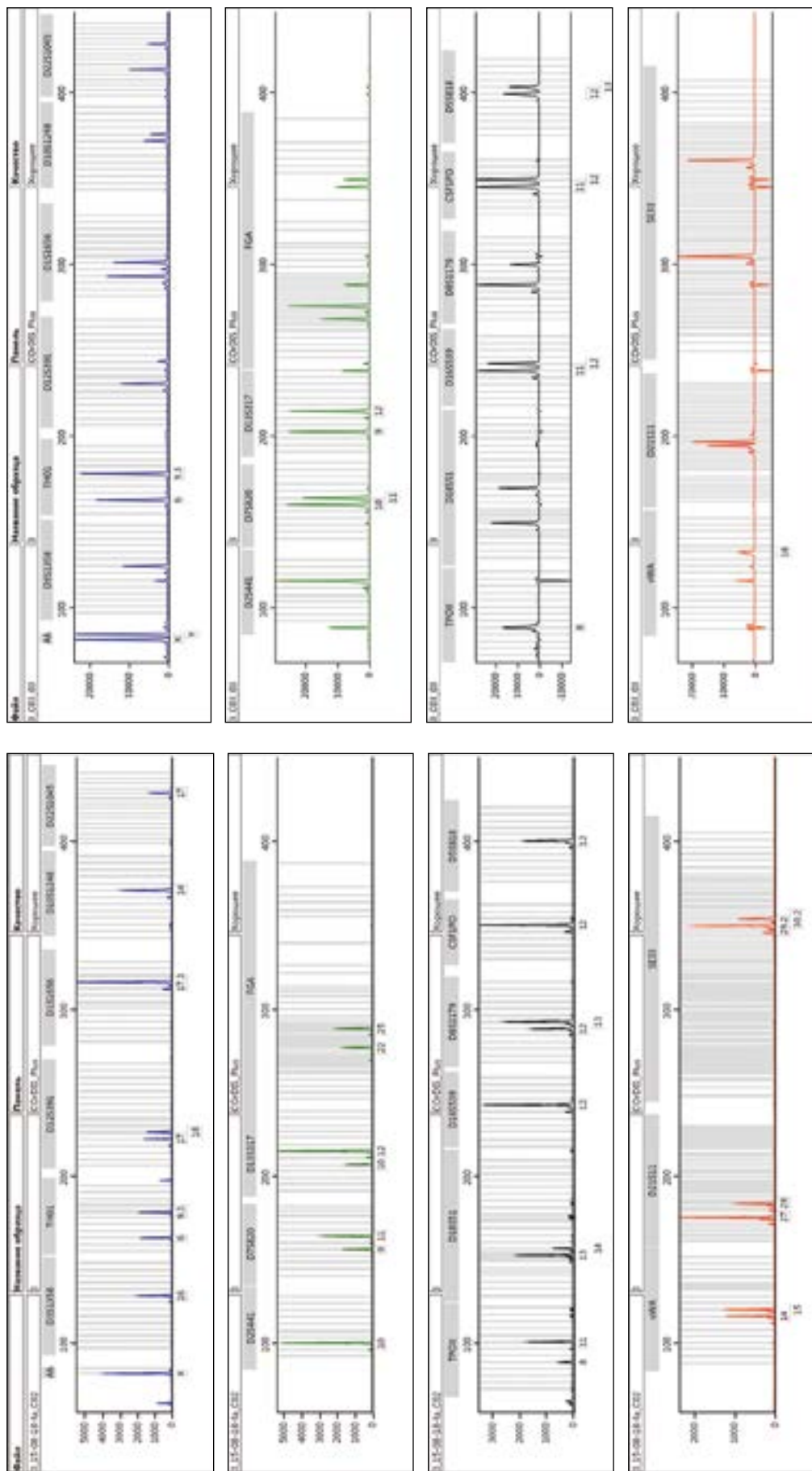


Рис. 2. Экспериментально полученные STR-профили клеточных линий: а — U937; б — NK-92.

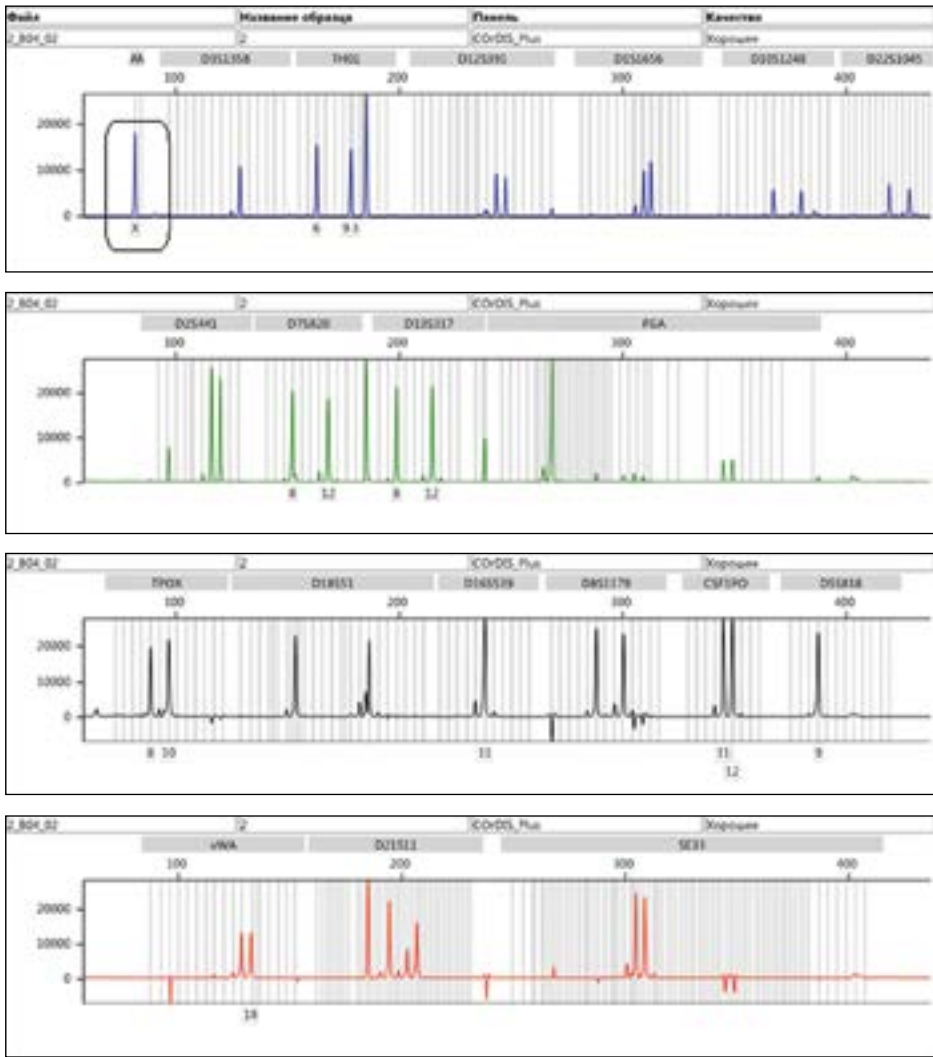


Рис. 3. Экспериментально полученный STR-профиль клеточной линии Jurkat Clone E6-1.
Fig. 3. Obtained STR profile of the Jurkat Clone E6-1 cell line.

Таблица 4. Экспериментально полученные генетические профили клеточных линий U-937, WIL2S, WISH, NK-92
Table 4. Genetic profiles of U-937, WIL2S, WISH, and NK-92 cell lines

U-937	WIL2S	WISH	NK-92
Amelogenin: X	Amelogenin: X,Y	Amelogenin: X	Amelogenin: X,Y
CSF1PO: 12	CSF1PO: 11, 12	CSF1PO: 9, 10	CSF1PO: 11, 12
D13S317: 10, 12	D13S317: 11	D13S317: 13,3	D13S317: 9, 12
D16S539: 12	D16S539: 11, 12	D16S539: 9, 10	D16S539: 11, 12
D5S818: 12	D5S818: 12, 13	D5S818: 11, 12	D5S818: 12, 13
D7S820: 9, 11	D7S820: 9, 11	D7S820: 8, 12	D7S820: 10, 11
TH01: 6, 9,3	F13B: 10	THO1: 7	THO1: 6, 9,3
TPOX: 8, 11	FESFPS: 11, 12	TPOX: 8, 12	TPOX: 8
vWA: 14, 15	LPL: 9, 10	vWA: 16, 18	vWA: 18
	THO1: 8, 9,3		
	TPOX: 8, 11		
	vWA: 17, 20		

оценки их подлинности в ходе экспертизы качества. Использование в медицинской практике идентифицированных КЛ обеспечит эффективность и безопасность применения БМКП. Для оценки возможностей метода STR-анализа в аутентификации и определении генетической стабильности КЛ нами были установлены STR-профили следующих линий: WIL2S, WISH, NK-92, Jurkat Clone E6-1, U937 с использованием набора CorDIS plus. Сравнение профилей клеточных линий WIL2S, WISH, NK-92,

U937 показало их полное совпадение с профилями, представленными на официальных сайтах коллекций. При аутентификации клеточной линии Jurkat Clone E6-1 была установлена потеря гена амелогенина. Данный фактор является примером детектирования генетической нестабильности КЛ методом фрагментного анализа.

Анализ и интерпретация полученных STR-профилей позволяют судить о целесообразности применения набора CorDIS plus для

Таблица 5. Генетический профиль клеточной линии Jurkat Clone E6-1, определенный экспериментально, в сравнении с профилем, представленным в American Type Culture Collection **Table 5.** Comparison of the obtained Jurkat Clone E6-1 genetic profile and the reference profile provided by the ATCC

Генетический профиль клеточной линии Jurkat Clone E6-1 Genetic profile of the Jurkat Clone E6-1 cell line	
Стандарт American Type Culture Collection Reference provided by the ATCC	Экспериментально полученный Obtained genetic profile
Amelogenin: X, Y CSF1PO: 11, 12 D13S317: 8, 12 D16S539: 11 D5S818: 9 D7S820: 8, 12 THO1: 6, 9.3 TPOX: 8, 10 vWA: 18	Amelogenin: X, ? CSF1PO: 11, 12 D13S317: 8, 12 D16S539: 11 D5S818: 9 D7S820: 8, 12 THO1: 6, 9.3 TPOX: 8, 10 vWA: 18

анализа КЛ, входящих в состав БМКП, в биомедицинских исследованиях, а также в ходе проведения экспертизы качества БМКП.

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).

Конфликт 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

- Korch C, Hall EM, Dirks WG, Ewing M, Faries M, Varella-Garcia M, et al. Authentication of M14 melanoma cell line proves misidentification of MDA-MB-435 breast cancer cell line. *Int J Cancer*. 2018;142(3):561–72. <https://doi.org/10.1002/ijc.31067>
- Rižner TL, Adamski J. It is high time to discontinue use of misidentified and contaminated cells: guidelines for description and authentication of cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;182:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.12.017>
- Lin LC, Elkashty O, Ramamoorthi M, Trinh N, Liu Y, Sunavala-Dossabhoj, et al. Cross-contamination of the human salivary gland HSG cell line with HeLa cells: a STR analysis study. *Oral Dis*. 2018;24(8):1477–83. <https://doi.org/10.1111/odi.12920>
- Rojas A, Gonzalez I. Cell line cross-contamination: a detrimental issue in current biomedical research. *Cell Biol Int*. 2018;42(3):272. <https://doi.org/10.1002/cbin.10904>
- Mrózek K, Tanner SM, Heinonen K, Bloomfield CD. Molecular cytogenetic characterization of the KG-1 and KG-1a acute myeloid leukemia cell lines by use of spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Genes, Chromosomes Cancer*. 2003;38(3):249–52. <https://doi.org/10.1002/gcc.10274>
- Maiga S, Brosseau C, Descamps G, Dousset C, Gomez-Bougie P, Chiron D, et al. A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytometry A*. 2015;87A(4):285–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22643>
- Corral-Vázquez C, Aguilar-Quesada R, Catalina P, Lucena-Aguilar G, Ligerio G, Miranda B, Carrillo-Ávila JA. Cell lines authentication and mycoplasma detection as minimum quality control of

- cell lines in biobanking. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(2):271–80. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9617-6>
- Roseti L, Serra M, Canella F, Munno C, Tosi A, Zuntini M, et al. In vitro gene and chromosome characterization of expanded bone marrow mesenchymal stem cells for musculo-skeletal applications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(23):3702–11.
- McLaren RS, Reid Y, Storts DR. Human cell line authentication: the critical first step in any project using human cell lines. In: Heizmann CW, eds. *Calcium-binding proteins and RAGE: from structural basics to clinical applications. Methods in Molecular Biology*, vol 963. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. P. 341–53. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-230-8_21
- Alonso A, Barrio PA, Müller P, Köcher S, Berger B, Martin P, et al. Current state-of-art of STR sequencing in forensic genetics. *Electrophoresis*. 2018;39(21):2655–68. <https://doi.org/10.1002/elps.201800030>
- Geng T, Novak R, Mathies RA. Single-cell forensic short tandem repeat typing within microfluidic droplets. *Anal Chem*. 2014;86(1):703–12. <https://doi.org/10.1021/ac403137h>
- Silva BSD, Sawitzki FR, Scheible MKR, Bailey SF, Alho CS, Faith SA. Paternity testing using massively parallel sequencing and the PowerSeq™ AUTO/Y system for short tandem repeat sequencing. *Electrophoresis*. 2018;39(21):2669–73. <https://doi.org/10.1002/elps.201800072>
- An Q, Fillmore HL, Vouri M, Pilkington GJ. Brain tumor cell line authentication, an efficient alternative to capillary electrophoresis by using a microfluidics-based system. *Neuro Oncol*. 2014;16(2):265–73. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not202>
- Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА, Олещир ЮВ, Ручко СВ, Бокванов 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. *Biopharmatsevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(6):3–10 (In Russ.)]
- Almeida JL, Hill CR, Cole KD. Mouse cell line authentication. *Cytotechnology*. 2014;66(1):133–47. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9545-7>
- Benabid AL, Delong M, Hariz M. Monkey-based research on human disease: the implications of genetic differences. *Altern Lab Anim*. 2015;43(3):205–6. <https://doi.org/10.1177/026119291504300309>
- Пинаев ГП, Полянская ГГ. Создание и развитие Российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений. В кн.: *Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 26*. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та; 2010. С. 3–61. [Pinaev GP, Polyanskaya GG. Establishment and development of the Russian collection of human, animals and plants cell cultures. In: *Cell Cultures. Information Bulletin. Issue 26*. St. Petersburg: Izd-vo Politekh. unta; 2010. P. 3–61 (In Russ.)]
- 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. [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*. 2019;19(1):28–38 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38>
- Huang Y, Liu Y, Zheng C, Shen C. Investigation of cross-contamination and misidentification of 278 widely used tumor cell lines. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170384>

Об авторах / Authors

Хорольский Михаил Дмитриевич, *Mikhail D. Khorolsky*. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8222-0805>

Семенова Ирина Семеновна, канд. биол. наук. *Irina S. Semenova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. *Ekaterina V. Melnikova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir*, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Поступила 26.09.2019

После доработки 28.10.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 26 September 2019

Revised 28 October 2019

Accepted 22 November 2019

Апробация методики эксклюзионной хроматографии для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей

Е. Ю. Мишалова*, Е. В. Гордеев, В. Н. Лебедев, С. А. Мельников, С. А. Нимирская, С. В. Борисевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации,
ул. Октябрьская, д. 11, Сергиев Посад-6, Московская область,
141306, Российская Федерация

Геморрагическая лихорадка, вызываемая вирусом Эбола, является особо опасным вирусным инфекционным заболеванием, характеризующимся летальным исходом в 50–90 % случаев. Важными компонентами рассматриваемого ВОЗ спектра медицинских средств экстренной профилактики и лечения заболевания являются гетерологичные иммуноглобулины с высоким титром вируснейтрализующих антител. Специфическая активность указанных препаратов во многом определяется их фракционным составом, в том числе молекулярно-массовым распределением. Для оценки молекулярно-массового распределения целевого белка в препаратах на основе иммуноглобулина человека традиционно применяется методика эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Использование данной методики для оценки молекулярных параметров гетерологичного иммуноглобулина требует подтверждения специфичности, правильности и прецизионности, а также определения критериев пригодности хроматографической системы применительно к новому объекту. **Цель работы:** апробация методики эксклюзионной ВЭЖХ для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. **Материалы и методы:** в работе использовали три серии очищенного иммуноглобулина против лихорадки Эбола, выделенного из сыворотки крови лошадей. В качестве стандартных образцов использовали нормальные лошадиный и человеческий иммуноглобулины изотипа IgG. Определение содержания мономеров и других фракций иммуноглобулина с помощью ВЭЖХ проводили с использованием методик, представленных в Европейской фармакопее 9.6 и Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. Для хроматографической оценки качества изучаемых препаратов использовали хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent, США) с диодно-матричным детектором и хроматографическую колонку Agilent Bio SEC-3. **Результаты:** установлено, что используемая система эксклюзионной ВЭЖХ по показателям фактора разрешения между хроматографическими пиками мономера и димера IgG (1,69 и 2,10) и эффективности хроматографической колонки (>2000) может быть использована для оценки молекулярных параметров гетерологичного иммуноглобулина. Подтверждена воспроизводимость результатов методики. **Выводы:** апробирована методика эксклюзионной ВЭЖХ для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. Установлено соответствие качества очищенного иммуноглобулина отечественным и международным требованиям по показателю «Молекулярные параметры».

Ключевые слова: гетерологичный иммуноглобулин; вирус Эбола; молекулярные параметры иммуноглобулина; высокоэффективная жидкостная хроматография; оценка качества; критерии пригодности хроматографической системы

Для цитирования: Мишалова ЕЮ, Гордеев ЕВ, Лебедев ВН, Мельников СА, Нимирская СА, Борисевич СВ. Апробация методики эксклюзионной хроматографии для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):261–267. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-261-267>

Контактное лицо: Мишалова Екатерина Юрьевна; 48cnii@mail.ru

Experimental Testing of a Size-Exclusion Chromatography Method Used for Evaluation of Molecular Parameters of Equine Anti-Ebola Immunoglobulin

E. Yu. Mishalova*, E. V. Gordeev, V. N. Lebedev, S. A. Melnikov, S. A. Nimirskaya, S. V. Borisevich

48 Central Scientific Research Institute,
11 Oktyabr'skaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region
141306, Russian Federation

Haemorrhagic fever caused by the Ebola virus is a highly hazardous infectious disease with a mortality rate of 50–90 %. Heterologous immunoglobulins with a high virus-neutralizing titer are an important element of the WHO-endorsed set of measures for emergency prevention and treatment of the disease. Specific activity of these products is largely determined by their fractional composition, and, in particular, by molecular mass distribution (MMD). The size-exclusion-high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC) has traditionally been used for determina-

tion of the MMD of the target protein in human immunoglobulin-based products. The use of this method for evaluation of molecular parameters of heterologous immunoglobulin requires confirmation of its specificity, accuracy and precision, and establishment of the chromatographic system suitability criteria in the context of a new test object. **The aim of the study** was to test the applicability of the SEC-HPLC method to the assessment of molecular parameters of anti-Ebola immunoglobulin derived from horse serum. **Materials and methods:** three batches of purified equine anti-Ebola immunoglobulin were used in the study. Normal equine and human immunoglobulins of the IgG isotype were used as reference standards. The HPLC test procedures described in the European Pharmacopoeia 9.6 and State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed., were used for determination of monomers and other immunoglobulin fractions. An Agilent 1260 Infinity (Agilent, USA) HPLC system with a diode array detector and an Agilent Bio SEC-3 HPLC column were used for quality evaluation of the tested products. **Results:** the resolution factor between IgG monomer and dimer peaks (1.69 and 2.10), and the chromatographic column efficiency (>2000) make it possible to use the SEC-HPLC system for evaluation of molecular parameters of heterologous immunoglobulin. The study demonstrated reproducibility of the test procedure. **Conclusions:** the study confirmed the applicability of the SEC-HPLC procedure for evaluation of molecular parameters of anti-Ebola immunoglobulin derived from horse serum. It demonstrated the compliance of the purified immunoglobulin to the national and international quality requirements in terms of «Molecular parameters».

Key words: heterologous immunoglobulin; Ebola virus; immunoglobulin molecular parameters; high performance liquid chromatography; quality control; chromatographic system suitability criteria

For citation: Mishalova EYu, Gordeev EV, Lebedev VN, Melnikov SA, Nimirskaya SA, Borisevich SV. Experimental testing of a size-exclusion chromatography method used for evaluation of molecular parameters of equine anti-Ebola immunoglobulin. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):261–267. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-261-267>

Corresponding author: Ekaterina Yu. Mishalova; 48cnii@mail.ru

Геморрагическая лихорадка, вызываемая вирусом Эбола (семейство *Filoviridae*, род *Ebolavirus*), является особо опасным вирусным заболеванием, характеризующимся летальным исходом в 50–90 % случаев. Эпидемия лихорадки Эбола 2013–2016 гг. была отмечена самым большим числом случаев заболевания (свыше 28 тыс.) за всю историю наблюдений начиная с 1976 г. До недавнего времени лицензированные средства профилактики и лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола (ЗВЭЗ), отсутствовали. В настоящее время специалистами ВОЗ¹ в качестве одного из средств экстренной профилактики и лечения ЗВЭЗ рассматриваются гетерологичные иммуноглобулины с высоким титром вируснейтрализующих антител (ВНА) [1–3].

Опыт применения гетерологичных иммуноглобулинов против различных нозологических форм инфекций свидетельствует о возможности возникновения перекрестных иммунных реакций при повторном введении препаратов, которые могут привести к развитию сывороточной болезни — состояния, развивающегося при лечении иммунными сыворотками животного происхождения, являющегося частным случаем гиперчувствительности III типа [3, 4].

Так, разработанный в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России гетерологичный иммуноглобулин, получаемый из гипериммунной сыворотки крови лошадей методом фракционирования с использованием охлажденного этанола, обладал не только высокими протективными свойствами, но и умеренной реактогенностью. Опыт клинического применения препарата выявил развитие общих и местных реакций у 21 и 33 % пациентов соответственно [5, 6].

Поскольку очистка гетерологичной иммунной сыворотки, используемой для получения иммуноглобулинов, позволяет значительно сократить содержание высокомолекулярных примесных компонентов, отрицательно влияющих на безопасность применения препарата, в 2016 г. в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России был разработан метод получения высо-

коочищенного гетерологичного иммуноглобулина [7]. Метод заключается в спиртовом осаждении иммуноглобулинов, последующей очистке и концентрировании с применением ионообменной, эксклюзионной хроматографии и стерилизующей фильтрации [8].

Для оценки степени очистки полученных препаратов ранее использовали метод гель-электрофореза. Однако указанный метод не позволяет провести количественную оценку молекулярно-массового распределения, а именно охарактеризовать целевой продукт по содержанию мономеров, димеров и полимеров.

Необходимость оценки молекулярных параметров иммуноглобулинов определена отечественными (ОФС 1.8.2.0006.15² Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд.) и международными (монография³ Европейской фармакопеи 9.6) требованиями. При этом методика, изложенная в Европейской фармакопее, помимо оценки гомологичных иммуноглобулинов (выделенных из плазмы крови человека) также предполагает оценку гетерологичных иммуноглобулинов (выделенных из плазмы крови животных). Количественной характеристикой эффективности и безопасности препаратов иммуноглобулинов в данном случае служит требование к процентному содержанию основного компонента — мономеров и димеров не менее 95 %, а также примесных компонентов полимеров, агрегатов и фрагментов — суммарно не более 5 %⁴. Данная методика была взята за основу оценки гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола.

Цель работы — апробация методики эксклюзионной ВЭЖХ для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- оценить разделяющую способность хроматографической системы и ее специфичность применительно к гетерологичному иммуноглобулину против лихорадки Эбола;

¹ Болезнь, вызванная вирусом Эбола. ВОЗ. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease>

² Общая фармакопейная статья 1.8.2.0006.15 Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ Anti-T lymphocyte immunoglobulin for human use, animal. European Pharmacopoeia 9.6.

⁴ Там же.

- подтвердить параметры пригодности хроматографической системы;
- провести оценку молекулярных параметров гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола.

Материалы и методы

1. Испытуемые образцы 1–3: иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, очищенный (серии № 2–4, иммуноглобулин Эбола), раствор, содержащий 20 ммоль натрия дигидрофосфата моногидрата и 0,2 % глицина.

2. Стандартный образец 1 — нормальный лошадиный иммуноглобулин изотипа IgG, лиофилизат 50 мг/амп (Rockland, США), кат. № 008–0102.

3. Стандартный образец 2 — раствор человеческого нормального иммуноглобулина (фармакопейный стандарт), кат. № Y0000488 (human immunoglobulin (molecular size) BRP Batch 1), рекомендованный в монографии Европейской фармакопеи 9.6⁵.

4. Смесь белков (маркеры молекулярных масс) AdvanceBio SEC Protein Standard, кат. № 5190–9417 (Agilent, США).

Растворы маркеров молекулярных масс и стандартных образцов готовили согласно инструкциям по применению.

5. Реактивы для приготовления буферных растворов: натрий дигидрофосфат моногидрат (Merck, Германия), натрий гидрофосфат дигидрат (Merck, Германия), натрия хлорид (Acros, Бельгия), натрия азид (Serva, Германия).

6. Хроматографическая колонка Agilent Bio SEC-3, размер 300×7,8 мм, диаметр частиц 3 мкм (Agilent, США) позволяет раз-

делять белки в диапазоне молекулярных масс от 10 до 600 кДа. Исследование проводили на хроматографической системе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором.

7. Определение молекулярных параметров испытуемых образцов проводили в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи 9.6 и Государственной фармакопеи Российской Федерации⁶. Испытуемые образцы доводили до концентрации 5 мг/мл раствором, содержащим 20 ммоль натрия дигидрофосфата моногидрата и 0,2 % глицина. Данный раствор использовали в качестве плацебо. Объем пробы — 20 мкл, содержание белка — около 100 мкг. Скорость потока — 0,5 мл/мин. Длина волны детектирования — 280 нм. Последовательность ввода проб: П-С₁-С₂-О₁-О₂-О₃-С₁-С₂, где П — плацебо, С₁ и С₂ — растворы стандартных образцов лошадиного и человеческого иммуноглобулинов соответственно, О₁, О₂, О₃ — испытуемые образцы иммуноглобулинов (серии № 2–4). Инъекции испытуемых образцов повторяли трижды для каждой серии.

Результаты и обсуждение

Разделяющая способность хроматографической системы была подтверждена с помощью смеси маркеров молекулярных масс (рис. 1, табл. 1).

Белки исследуемой смеси разделены по времени удерживания в порядке уменьшения их молекулярных масс (рис. 1, табл. 1). Время удерживания гамма-глобулина составило 15,68 мин и соответствует молекулярной массе 150 кДа (рис. 1, пик 2).

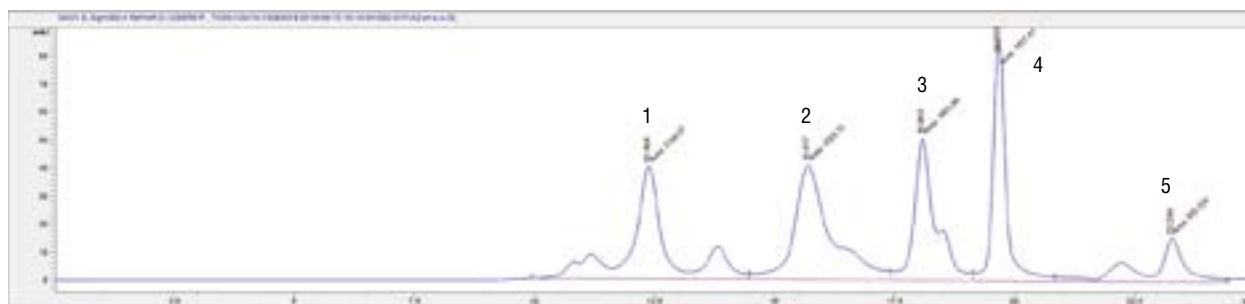


Рис. 1. Хроматограмма ВЭЖХ-анализа маркеров молекулярных масс Agilent AdvanceBio SEC Protein Standard. Ось абсцисс — время удерживания, мин; ось ординат — величина абсорбции, мАУ. 1–5 — хроматографические пики, соответствующие маркерам молекулярных масс.

Fig. 1. HPLC chromatogram of molecular weight markers of Agilent AdvanceBio SEC Protein Standard. X-axis — retention time, min; Y-axis — absorbance, mAU. 1–5 — chromatographic peaks corresponding to the molecular weight markers.

Таблица 1. Результаты оценки хроматографических показателей разделения маркеров молекулярных масс

Table 1. The results of evaluation of chromatographic parameters of resolution of molecular weight markers

Хроматографический пик ^а Chromatographic peak ^a	Маркер-белок Marker protein	Молекулярная масса, Да Molecular weight, Da	Фактор разрешения Resolution factor	Время удерживания, мин Retention time, min
1	Тироглобулин (бычий) Thyroglobulin (bovine)	670 000	2,15	12,364
2	Гамма-глобулин (бычий) γ-globulin (bovine)	150 000	3,07	15,677
3	Овальбумин (яичный) Ovalbumin (egg white)	45 000	3,19	18,063
4	Миоглобин (лошадиное сердце) Myoglobin (equine heart)	17 000	3,16	19,651
5	Ангиотензин (человеческий) Angiotensin (human)	1000	7,55	23,259

^а Нумерация хроматографических пиков соответствует нумерации пиков на рисунке 1.

^а Peak numbers correspond to those in Figure 1.

⁵ Там же.

⁶ Общая фармакопейная статья 1.8.2.0006.15 Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Для подтверждения специфичности и параметров пригодности хроматографической системы проводили сравнительный анализ результатов хроматографического разделения стандартных образцов 1 и 2. Выбор в качестве стандартного образца 1 — нормального лошадиного иммуноглобулина обусловлен его видовой идентичностью по отношению к испытуемому образцу, а также схожим подходом к способу получения. Результаты представлены на рисунке 2 и в таблице 2.

Сравнительный хроматографический анализ различных по видовому происхождению иммуноглобулинов по содержанию мономерных, димерных и полимерных фракций,

определенному по времени удерживания пиков мономеров и димеров (рис. 2, табл. 2), показал их идентичность вне зависимости от видового происхождения сыворотки крови, что свидетельствует об удовлетворительной специфичности методики эксклюзионной ВЭЖХ применительно к гетерологичному (лошадиному) иммуноглобулину. Кроме того, относительные времена удерживания пиков димеров и отношение времен удерживания пиков мономера свидетельствуют о возможности использования как стандартного образца 1, так и стандартного образца 2 в качестве стандартного образца сравнения при определении молекулярно-массового распределения испытуемых образцов. Подтверждением пригод-

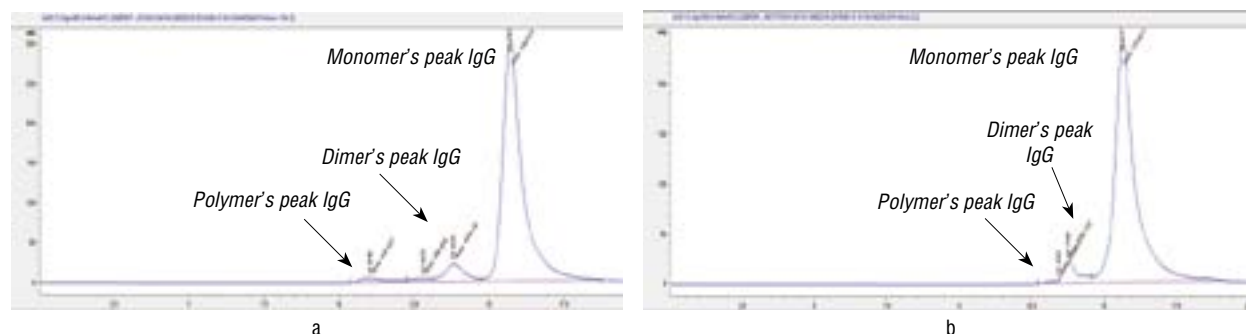


Рис. 2. Хроматограммы разделения стандартных образцов иммуноглобулинов методом эксклюзионной ВЭЖХ: а — нормальный иммуноглобулин из сыворотки крови лошадей, б — нормальный человеческий иммуноглобулин (фармакопейный стандарт). Ось абсцисс — время удерживания, мин; ось ординат — величина абсорбции, mAU.

Fig. 2. SEC-HPLC chromatograms of immunoglobulin reference standards: a — normal immunoglobulin from horse blood serum, b — human normal immunoglobulin (pharmacopoeial reference standard). X-axis — retention time, min; Y-axis — absorbance, mAU.

Таблица 2. Результаты оценки хроматографических показателей пригодности системы (n=3)

Table 2. The results of evaluation of the chromatographic system suitability parameters (n=3)

Показатель Parameter	Стандартный образец иммуноглобулина Immunoglobulin reference standard		Требования Европейской фармакопеи 9.6 European Pharmacopoeia 9.6 requirements	Соответствие требованиям Европейской фармакопеи 9.6 Compliance with the European Pharmacopoeia 9.6 requirements
	1	2		
Время удерживания мономера, мин Monomer retention time, min	15,70±0,04	15,64±0,05	-	-
Время удерживания димера, мин Dimer retention time, min	13,83±0,01	13,78±0,02	-	-
Содержание компонентов IgG в растворе, % Content of IgG components in the solution, %				
- полимеров - polymers	4,01±0,020	3,87±0,014	-	-
- димеров - dimers	6,86±0,069	6,91±0,029		
- мономеров - monomers	89,13±0,090	89,22±0,089		
Относительное время удерживания пика димера Relative retention time of the dimer peak	0,88±0,02	0,88±0,02	0,85±0,05	Соответствует Complies
Отношение времен удерживания мономеров Ratio of monomer retention times	1,00±0,01		1,00±0,01	Соответствует Complies
Фактор разрешения между пиками (Rs) Resolution between the peaks (Rs)	1,69	2,1	1,5–2,5	Соответствует Complies
Число теоретических тарелок, вычисленное для пика мономера Number of theoretical plates calculated for the monomer peak	3710	3604	>2000	Соответствует Complies

Примечание. Представлены средние значения и их квадратичные отклонения, полученные из трех независимых исследований.

Note. The table gives mean values and their square deviations based on three independent experiments.

ности хроматографической системы могут служить значения фактора разрешения между пиками и числа теоретических тарелок, соответствующие требованиям Европейской фармакопеи 9.6.

После подтверждения специфичности хроматографической системы и параметров ее пригодности был проведен ВЭЖХ-анализ трех серий иммуноглобулина Эбола (рис. 3, табл. 3).

Как следует из данных, представленных на рисунке 3 и в таблицах 2, 3, на хроматограммах испытуемых образцов 1–3 можно идентифицировать пики мономеров и димеров, соответствующие временам удерживания пиков мономеров и димеров стандартных образцов 1 и 2. В то же время количественное содержание данных примесных компонентов, измеренное по площади пиков, существенно ниже, чем в стандартных образцах. Это обусловлено проведением

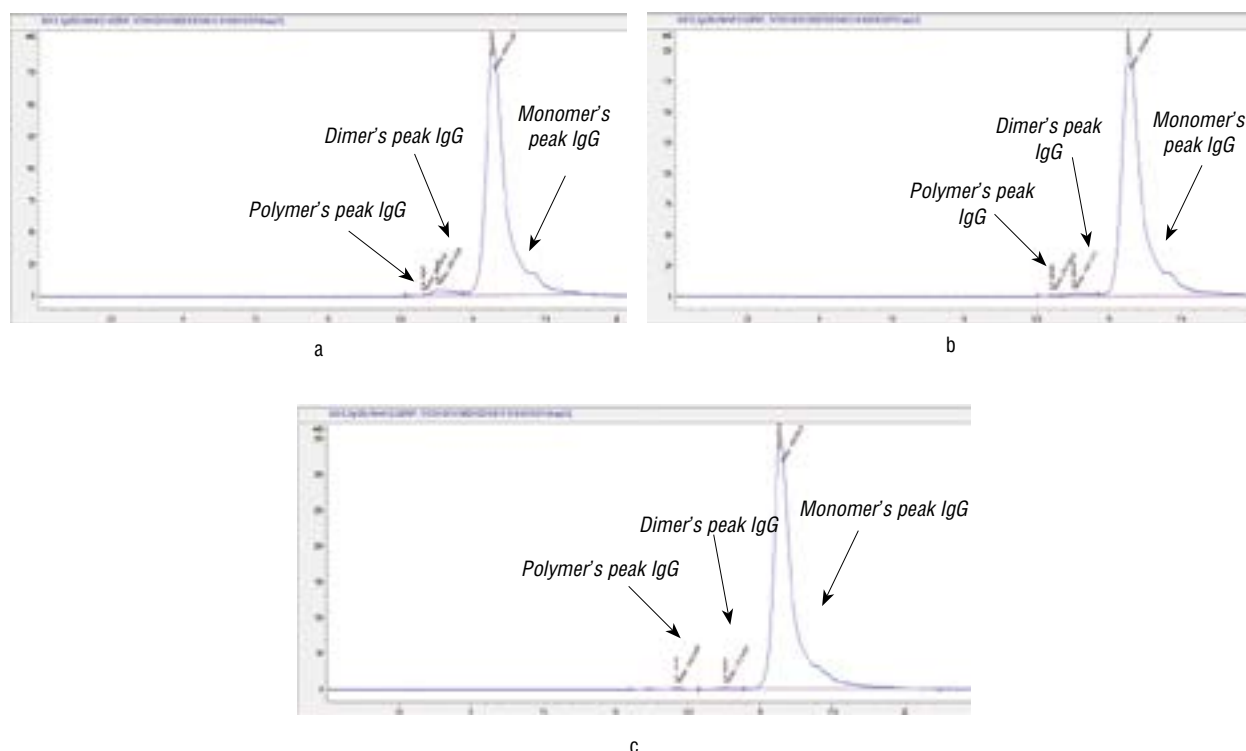


Рис. 3. Хроматограммы ВЭЖХ-анализа серий № 2 (а), 3 (б), 4 (с) иммуноглобулина Эбола. Ось абсцисс — время удерживания, мин; ось ординат — величина абсорбции, mAU.

Fig. 3. HPLC chromatograms of batches No. 2 (a), 3 (b), and 4 (c) of anti-Ebola immunoglobulin. X-axis — retention time, min; Y-axis — absorbance, mAU.

Таблица 3. Результаты оценки молекулярно-массового распределения иммуноглобулина Эбола по данным эксклюзионной ВЭЖХ (n=3)

Table 3. The results of SEC-HPLC evaluation of molecular mass distribution of anti-Ebola immunoglobulin (n=3)

Хроматографический показатель Chromatographic parameter	Оценка показателей качества иммуноглобулина Immunoglobulin quality parameters		
	Серия № 2 IgG IgG batch 2	Серия № 3 IgG IgG batch 3	Серия № 4 IgG IgG batch 4
Время удерживания, мин Retention time, min			
- полимеров - polymers	13,3±0,023	13,1±0,008	12,1±0,002
- димеров - dimers	13,8±0,002	13,8±0,006	13,8±0,004
- мономеров - monomers	15,7±0,002	15,7±0,001	15,7±0,057
Содержание компонентов IgG в растворе, % Content of IgG components in the solution, %			
- полимеров - polymers	0,2±0,020	0,22±0,014	0,6±0,019
- димеров - dimers	2,7±0,069	1,40±0,029	0,4±0,045
- мономеров - monomers	97,1±0,090	98,37±0,028	98,9±0,053

дополнительных стадий хроматографической очистки испытуемых иммуноглобулинов, в то время как стандартные образцы получены только при помощи методов осаждения.

Времена удерживания пиков мономера и димера находятся в пределах ($1,0 \pm 0,01$) по отношению к соответствующим пикам на хроматограммах стандартных образцов. Доля мономеров и димеров в изученных сериях препарата иммуноглобулина против лихорадки Эбола, очищенного, в среднем составила $99,43 \pm 0,35\%$, количество примесных полимеров не превышало $0,22\%$. Полученные значения соответствуют требованиям, предъявляемым к гетерологичным иммуноглобулинам Европейской фармакопеи 9.6, а также указывают на высокую степень очистки от высокомолекулярных компонентов иммуноглобулинов в испытуемых образцах, что может положительно повлиять на безопасность его применения.

Заключение

Апробирована методика эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. Подтверждена разделяющая способность хроматографической системы и ее специфичность применительно к гетерологичному иммуноглобулину против лихорадки Эбола. Показана возможность использования нормального лошадиного иммуноглобулина изотипа IgG в качестве стандартного образца сравнения. Установлено, что значения параметров пригодности хроматографической системы соответствуют международным требованиям. Проведена оценка молекулярно-массового распределения по содержанию мономеров, димеров и примесных высокомолекулярных компонентов для трех серий иммуноглобулина против лихорадки Эбола. Полученные данные свидетельствуют о соответствии качества очищенного иммуноглобулина отечественным и международным требованиям по показателю «Молекулярные параметры».

В целом полученные в ходе апробации результаты могут служить основанием для внесения показателя «Молекулярные параметры» в спецификацию на иммуноглобулин против лихорадки Эбола, выделенный из сыворотки крови лошадей, с последующим включением в соответствующую фармакопейную статью Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgments. The study was performed without external funding.

Конфликт 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. Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*. 2011;377(9768):849–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60667-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60667-8)
2. Dowall SD, Callan J, Zeltina A, Al-Abdulla I, Strecker T, Fehling SK, et al. Development of a cost-effective ovine polyclonal antibody-based product, EBOTab, to treat Ebola virus infection. *J Infect Dis*. 2016;213(7):1124–33. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv565>
3. Борисевич ИВ, Краснянский ВП, Михайлов ВВ, Потрываева НВ, Градобоев ВН, Тиманькова ГД, Карелов ЮМ. Разработка и получение иммуноглобулина против лихорадки Эбола. В кн: *Изучение и профилактика особо опасных вирусных инфекций*. Кольцово; 1993. С. 44. [Borisevich IV, Krasnyanskiy VP, Mikhaylov VV, Potryvaeva NV, Gradoboev VN, Timan'kova GD, Karelov YuM. Development and production of immunoglobulin against Ebola. In: *The study and prevention of especially dangerous viral infections*. Koltsovo; 1993. P. 44 (In Russ.)]
4. Maruyama T, Rodriguez LL, Jahrling PB, Sanchez A, Khan AS, Nichol ST, et al. Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J Virol*. 1999;73(7):6024–30.
5. Михайлов ВВ, Борисевич ИВ, Тиманькова ГД, Краснянский ВП, Потрываева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК. Препарат, содержащий иммуноглобулин против лихорадки Эбола, из сыворотки крови лошадей, жидкий (иммуноглобулин Эбола). Патент Российской Федерации № 2130318; 1999. [Mikhaylov VV, Borisevich IV, Timan'kova GD, Krasnyanskiy VP, Potryvaeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK. Preparation containing immunoglobulin against Ebola fever from horse blood serum and liquid (Ebola immunoglobulin). Patent of the Russian Federation No. 2130318; 1999 (In Russ.)]
6. Борисевич ИВ, Черникова НК, Марков ВИ, Краснянский ВП, Борисевич СВ, Рождественский ЕВ. Опыт клинического применения специфического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики лихорадки Эбола. *Вопросы вирусологии*. 2017;62(1):25–9. [Borisevich IV, Chernikova NK, Markov VI, Krasnyanskiy VP, Borisevich SV, Rozhdestvenskiy EV. An experience in the clinical use of specific immunoglobulin from horse blood serum for prophylaxis of Ebola haemorrhagic fever. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2017;62(1):25–9 (In Russ.)]
7. Fernandes A, Kaundinya JO, Daftary G, Saxena L, Banerjee S, Pattnaik P. Chromatographic purification of equine immunoglobulin G F(ab)₂ from plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;876(1):109–15. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.030>
8. Попова АЮ, Демина ЮВ, Смоленский ВЮ, Гордеев ЕВ, Рождественский ЕВ, Краснянский ВП и др. Способ получения иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, жидкого. Патент Российской Федерации № 2673546; 2018. [Popova AYU, Demina YuV, Smolenskiy VYu, Gordeev EV, Rozhdestvenskiy EV, Krasnyanskiy VP, et al. Method for producing liquid immunoglobulin against Ebola fever from horse blood serum. Patent of the Russian Federation No. 2673546; 2018 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Мишалова Екатерина Юрьевна. *Ekaterina Yu. Mishalova*

Гордеев Евгений Васильевич. *Evgeniy V. Gordeev*

Лебедев Виталий Николаевич, д-р биол. наук, проф. *Vitaly N. Lebedev, Dr. Sci. (Biol.), Professor*

Мельников Сергей Алексеевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. *Sergey A. Melnikov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate*

Нимирская Светлана Александровна, канд. мед. наук. *Svetlana A. Nimirskaya, Cand. Sci. (Med.)*

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН. *Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corr. Member of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>*

Поступила 12.12.2018

После доработки 05.11.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 12 December 2018

Revised 5 November 2019

Accepted 22 November 2019



Диана Тимофеевна Леви (к 80-летию со дня рождения)

Diana Timofeevna Levi (on the 80th Anniversary)

4 декабря 2019 года исполнилось 80 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Дианы Тимофеевны Леви.

Д. Т. Леви родилась в 1939 г. в г. Беломорске Амурской области в семье военнослужащего. После окончания Харьковского медицинского института в 1962 г. 3 года работала на производстве МИБП в отделе биологического контроля Харьковского НИИ микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова.

С июня 1965 г. Диана Тимофеевна работала в лаборатории микобактериальных препаратов ГИСК им. Л. А. Тарасевича в должностях младшего научного сотрудника, старшего научного сотрудника и заведующего лабораторией. На основе результатов научных исследований, проведенных в ГИСК им. Л. А. Тарасевича, защитила диссертации на соискание ученой степени кандидата, а затем доктора медицинских наук.

После присоединения ГИСК им. Л. А. Тарасевича к ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России с 2011 года и по настоящее время Д. Т. Леви работает главным экспертом в Управлении экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП и продолжает исследования по разработке и применению препаратов для профилактики и диагностики туберкулеза, тесно сотрудничая со специалистами в области фтизиопедиатрии Российской Федерации.

Диана Тимофеевна внесла большой научный вклад в развитие и совершенствование специфической профилактики и раннего выявления туберкулеза. Применение на производстве результатов ее научных разработок в области стандартизации методов контроля МИБП обеспечило выпуск в обращение эффективных и безопасных лекарственных препаратов для диагностики туберкулеза *in vivo*. В составе специалистов ВОЗ она участвовала в разработке международных требований к вакцине БЦЖ, а также в сравнительных испытаниях специфической активности вакцин туберкулезных различных производителей под эгидой этой организации. Полученные результаты позволили выбрать четыре субштамма БЦЖ более

чем из 20 препаратов в качестве международных стандартных образцов.

Д. Т. Леви имеет 5 авторских свидетельств на изобретения, лично и в соавторстве опубликовала более 200 научных работ в отечественных и зарубежных научных изданиях, является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», соавтором нескольких учебных пособий для врачей по вопросам профилактики и диагностики туберкулезной инфекции, национального руководства «Вакцины и вакцинация», руководства по экспертизе лекарственных средств, руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунологические лекарственные препараты) и др. Под руководством Дианы Тимофеевны защищены 4 кандидатские и 2 докторские диссертации.

Д. Т. Леви награждена медалью «За освоение целинных земель» (1970), медалью «В память 850-летия Москвы» (1997), нагрудным знаком «Отличнику здравоохранения» (1974).

За научное обоснование, разработку и внедрение в клиническую практику биотехнологического инновационного продукта для идентификации туберкулезной инфекции у взрослых и детей — препарата «Диаскинтест» — Д. Т. Леви в составе коллектива исследователей была присуждена премия Правительства Российской Федерации 2011 года в области науки и техники и присвоено звание «Лауреат премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники».

Диана Тимофеевна занимает активную жизненную позицию, заслужила непререкаемый авторитет среди коллег, обладает неиссякаемым оптимизмом и широкой душой, всегда готова поделиться своим опытом и знаниями с молодыми сотрудниками.

Сердечно поздравляем Диану Тимофеевну с юбилеем! Желаем крепкого здоровья, творческих успехов и реализации намеченных планов!



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) — Т57941



ISSN 2221-996X



9 772221 996004