

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

# БИО

# ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Том / Volume

№ / No.

22

1

**BIOLOGICAL PRODUCTS.**  
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

2022

[www.biopreparations.ru](http://www.biopreparations.ru)



# БИО **ПРЕПАРАТЫ**

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

**ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ**

[www.biopreparations.ru](http://www.biopreparations.ru)

---

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

---

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

**ТОМ 22, № 1,  
ЯНВАРЬ – МАРТ 2022**

**VOLUME 22, NO. 1,  
JANUARY–MARCH 2022**

**Научно-практический журнал**  
**Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год)**  
**Основан в 2001 году**

**Research and practice journal**  
**Published quarterly (four issues per year)**  
**Founded in 2001**

**Учредитель:**

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

**Founder:**

Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation (Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products)

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук по следующим группам специальностей: биологические науки, профилактическая медицина, медико-биологические науки

The journal is included in the official List of peer-reviewed scientific journals which guarantee acknowledgement of the published research in the following fields: biological sciences, preventive medicine, life sciences by the State Commission that grants Candidate of Science and Doctor of Science degrees

Журнал индексируется в базах данных: Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI) на платформе Web of Science, Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM каталог, DOAJ, Ulrichsweb и др.

The journal is indexed in the following databases: Russian Science Citation Index (RSCI) including RSCI database on the Web of Science platform, Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM Catalog, DOAJ, Ulrichsweb, etc.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript. The content is licensed under Creative Commons Attribution International 4.0 CC-BY

---

На обложке: «HIV-инфицированные Т-клетки» (лицензированное изображение фотобанка Depositphotos <https://ru.depositphotos.com/439198562/>)

Cover image: “HIV-infected T-cells” (a licensed image from Depositphotos.com stock photo platform <https://ru.depositphotos.com/439198562/>)

### Главный редактор

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, проф., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, Россия)

### Заместители главного редактора

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

**Хайтов Муса Рахимович**, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

### Ответственный секретарь

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

В журнале публикуются обзорные, оригинальные, дискуссионные статьи по вопросам разработки регуляторных процедур, стандартизации, контроля качества, производства и применения терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов – иммунобиологических, биотехнологических, генотерапевтических и лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека и животных; а также различных групп иммуномодулирующих лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

### 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)

**Аракелов Сергей Александрович**, канд. биол. наук, ФГУП СПбНИИВС ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

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

**Борисевич Игорь Владимирович**, д-р мед. наук, проф., ФМБА России (Москва, Россия)

**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, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, Россия)

**Валента Рудольф**, проф., Венский медицинский университет (Вена, Австрия)

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

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

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

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

**Игнатьев Георгий Михайлович**, д-р мед. наук, проф., СПбНИИВС ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

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

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

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

**Мионов Александр Николаевич**, д-р мед. наук, проф., ООО «Национальное агентство лекарственных средств» (Москва, Россия)

**Мовсесянц 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)

**Токаревич Николай Константинович**, д-р мед. наук, проф., ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург, Россия)

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

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

**Чумаков Константин Михайлович**, д-р биол. наук, проф., Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

## Учредитель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

## Шеф-редактор

**Федотова О.Ф.**

+7(495)121-06-00 (доб. 63-05)

[Fedotovaof@expmed.ru](mailto:Fedotovaof@expmed.ru)

## Научные редакторы

**Гукасова Н.В.**, канд. биол. наук

**Лебединская Е.В.**, канд. биол. наук

## Редактор перевода

**Губарева О.Н.**, канд. филол. наук

## Адрес учредителя и редакции

127051, Москва,

Петровский б-р, д. 8, стр. 2

тел.: +7(499)190-18-18

(доб. 63-42, 63-02, 63-35)

[biopreparaty@expmed.ru](mailto:biopreparaty@expmed.ru)

## Издатель

ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва,

ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

## Типография

ООО «Издательство «Триада»: 170034,

Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514

## Тираж

100 экз. Цена свободная

## Подписано в печать

31.03.2022

## Дата выхода в свет

09.04.2022

## Подписной индекс

в каталоге «Пресса России» – Е57941,

в каталоге агентства «Урал-Пресс» –

57941

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82918 от 14 марта 2022 г.

© Составление. Оформление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзоры

А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева, Д.В. Горенков, Л.М. Хантимирова, С.Г. Гусева, В.А. Меркулов

**Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов ..... 6**

### Оригинальные статьи

Е.О. Голощапова, О.Б. Рунова, А.С. Минеро, О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова, М.Б. Дегтерев, С.А. Таран, Р.Р. Шукуров, О.Б. Устинникова

**Разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры очищенного рекомбинантного интерферона бета-1b методом пептидного картирования ..... 23**

Е.Г. Абрамова, Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, О.А. Лобовикова, И.В. Шульгина, А.В. Комиссаров, А.К. Никифоров

**Разработка стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero ..... 38**

О.Г. Корнилова, М.А. Кривых, А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова

**Стандартизация метода определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека ..... 49**

Ю.Н. Лебедева, Н.А. Литвинова, Т.Н. Лобанова, Р.Р. Шукуров, Р.А. Хамитов, Л.А. Гайдерова

**Валидация методики определения специфической активности интерферона бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус ..... 60**

С.С. Тимонова, К.А. Смолова, Д.Т. Зарипова, М.С. Пантюшенко, М.А. Королева, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ

**Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин-генерирующего фермента ..... 80**

А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, Д.С. Давыдов, А.А. Мовсисянц

**Использование малых объемов аналитических проб при определении невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом ..... 94**

### Хроника

**Равиль Авгатович Хамитов (к 65-летию со дня рождения) ..... 105**

## BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

### Editor-in-Chief

**Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

### Deputy Editors-in-Chief

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

**Musa R. Khaitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, National Research Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

### Executive Editor

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

The journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* publishes reviews, original articles, and discussion articles on such issues as development of regulatory procedures, standardisation, quality control, production and use of biological products for disease prevention, diagnosis, and treatment immunobiological, biotechnological, gene therapy, human and animal blood plasma products, as well as various groups of immunomodulatory and biomedical cell products.

### 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)

**Sergey A. Arakelov**, Cand. Sci. (Biol.), Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

**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., Federal Medical Biological Agency of Russia (Moscow, Russia)

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

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

**Rudolf Valenta**, MD, Prof., Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

**Aleksandr L. Gintsburg**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology (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)

**Ivan A. Dyatlov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (Obolensk, Moscow Region, Russia)

**Vitaly V. Zverev**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, 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., Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

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

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

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

**Dmitry K. Lvov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

**Nikolay V. Medunitsyn**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Aleksandr N. Mironov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Agency of Medicines (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)

**Yuriy I. Pashchenko**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

**Nikolay K. Tokarevich**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint-Petersburg Pasteur Institute (Saint Petersburg, Russia)

**Rakhim M. Khaitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, National Research Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

**Ravil A. Khamitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Generium JSC (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

**Konstantin M. Chumakov**, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Food and Drug Administration (Silver Spring, Maryland, USA)

## Founder

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

## Managing Editor

**Olga F. Fedotova**

+7(495)121-06-00 (63-05)

[Fedotovaof@expmed.ru](mailto:Fedotovaof@expmed.ru)

## Science Editor

**Nadezhda V. Gukasova**, Cand. Sci. (Biol.)

**Elena V. Lebedinskaya**, Cand. Sci. (Biol.)

## Translation Editor

**Olga N. Gubareva**, Cand. Sci. (Philol.)

## Postal address of the founder and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051

Tel.: +7(499)190-18-18

(63-42, 63-02, 63-35)

[biopreparaty@expmed.ru](mailto:biopreparaty@expmed.ru)

## Publisher

NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St.,  
Moscow 115114

## Printing office

“Triada” publishing house: 9 Tchaikovsky  
Ave, office 514, Tver 170034

## Print run

100 copies. Free price

## Passed for printing

31 March 2022

## Date of publication

09 April 2022

## Subscription codes

are provided in the catalogues of  
Pressa Rossii—E57941 and Ural-Press  
agency—57941

The journal is registered as mass media  
by the Federal Service for Supervision  
of Communications, Information  
Technologies and Mass Communications.  
Certificate PI No. FS77-82918 dated  
14 March 2022

© Compilation, design. Scientific Centre  
for Expert Evaluation of Medicinal  
Products, 2022

# CONTENTS

## Reviews

A.A. Soldatov, Zh.I. Avdeeva, D.V. Gorenkov, L.M. Khantimirova,  
S.G. Guseva, V.A. Merkulov

**Challenges in development and authorisation  
of gene therapy products** ..... 6

## Original Articles

E.O. Goloshchapova, O.B. Rounova, A.S. Minero, O.V. Fadeikina,  
R.A. Volkova, M.B. Degterev, S.A. Taran, R.R. Shukurov,  
O.B. Ustinnikova

**Development and certification of a pharmacopoeial reference  
standard for primary structure identification of purified  
recombinant interferon beta-1b by peptide mapping** ..... 23

E.G. Abramova, Yu.K. Gavrilova, S.V. Generalov, O.A. Lobovikova,  
I.V. Shulgina, A.V. Komissarov, A.K. Nikiforov

**Development of an in-house reference standard  
for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used  
in the virus neutralisation test in a Vero cell culture** ..... 38

O.G. Kornilova, M.A. Krivykh, A.A. Voropaev, O.V. Fadeikina,  
R.A. Volkova

**Standardisation of the method for prekallikrein  
activator determination in human immunoglobulin  
and albumin products** ..... 49

Yu.N. Lebedeva, N.A. Litvinova, T.N. Lobanova, R.R. Shukurov,  
R.A. Khamitov, L.A. Gaiderova

**Validation of a test procedure for determination  
of specific activity of human recombinant interferon beta  
(Infibeta®) using various cell/virus combinations** ..... 60

S.S. Timonova, K.A. Smolova, D.T. Zaripova, M.S. Pantyushenko,  
M.A. Koroleva, R.L. Anisimov, R.A. Khamitov, A.A. Piskunov,  
V.N. Bade

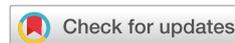
**Increasing productivity of arylsulfatase B-producing cell line  
by coexpression of formylglycine-generating enzyme** ..... 80

A.A. Voropaev, O.V. Fadeikina, D.S. Davydov, A.A. Movsesyants

**The use of small volumes of test samples in subvisible  
particle testing by the light obscuration method** ..... 94

## Chronicle

**Ravil Avgatovich Khamitov  
(on the 65th Anniversary)** ..... 105



## Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов

А.А. Солдатов , Ж.И. Авдеева, Д.В. Горенков, Л.М. Хантимирова, С.Г. Гусева, В.А. Меркулов

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

✉ Солдатов Александр Алексеевич; [Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

### Резюме

В настоящее время известно большое количество заболеваний, патогенез которых обусловлен генетическими нарушениями. Достижения в области генетики и биотехнологии привели к созданию методов, которые позволяют получить практически любой ген, что в конечном счете привело к появлению нового класса лекарственных средств – генотерапевтических препаратов (ГТП). Цель работы – критический анализ международного опыта создания и регистрации генотерапевтических лекарственных препаратов. В обзоре освещены проблемы разработки ГТП, связанные с поиском оптимального подхода для доставки терапевтического гена в клетки-мишени. Обосновано, что перспективными средствами доставки генов являются вирусные векторы, среди которых наибольшей эффективностью и безопасностью обладают препараты на основе аденовируса (AV) и аденоассоциированного вируса (AAV). Рассмотрены современные подходы для генного редактирования, позволяющие модифицировать AV и AAV для повышения эффективности и безопасности ГТП. Данные модификации необходимы для включения в вирусный вектор терапевтического гена большого размера, снижения уровня экспрессии вирусных белков и снижения иммуногенности вирусного вектора. Представлен опыт регистрации ГТП в регуляторных органах США и Европейского союза, в том числе сведения о подкомитетах в структурах FDA и EMA, выполняющих рекомендательные функции. Отмечено, что в Российской Федерации зарегистрирован один ГТП отечественного производства и активно ведутся разработки других препаратов данной группы. Сделано заключение о необходимости формирования отечественной нормативной базы для разработки и регистрации ГТП, а также нормативных рекомендаций в рамках государств – членов Евразийского экономического союза.

**Ключевые слова:** генотерапевтические препараты; аденовирусный вектор; аденоассоциированный вектор; безопасность генотерапевтических препаратов

**Для цитирования:** Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Горенков Д.В., Хантимирова Л.М., Гусева С.Г., Меркулов В.А. Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(1):6–22. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-6-22>

## Challenges in development and authorisation of gene therapy products

A.A. Soldatov ✉, Zh.I. Avdeeva, D.V. Gorenkov, L.M. Khantimirova, S.G. Guseva, V.A. Merkulov

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

✉ Aleksandr A. Soldatov; [Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

### Abstracts

There are a lot of diseases known today, which are caused by genetic abnormalities. Advances in genetics and biotechnology brought about gene editing technologies that can produce almost any gene, which ultimately led to the emergence of a new class of medicines – gene therapy products (GTPs). The aim of the study was to analyse international experience in development and authorisation of GTPs. The review highlights the challenges in GTP development, related to the search for an optimal approach to therapeutic gene delivery to the target cells. Viral vectors were shown to be a promising gene delivery system, with adenovirus- (AV) and adeno-associated virus- (AAV) based products demonstrating the highest efficacy and safety. The paper reviews current approaches to gene editing that allow modification of AVs and AAVs to improve GTP efficacy and safety. These modifications are carried out with the aim of, e.g., including a large therapeutic gene into a viral vector, decreasing viral protein expression levels, and decreasing viral vector immunogenicity. The review summarises GTP authorisation procedures in the USA and the European Union, including data on FDA and EMA subcommittees and departments entrusted with advisory functions. The paper mentions that there is one Russian-produced GTP authorised in the Russian Federation, and some other GTPs are in the pipeline. Therefore, the Russian regulatory framework and the Eurasian regulations and recommendations should be updated in order to accommodate for GTP development and authorisation.

**Key words:** gene therapy products; adenoviral vector; adeno-associated vector; safety of gene therapy products

**For citation:** Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Gorenkov D.V., Khantimirova L.M., Guseva S.G., Merkulov V.A. Challenges in development and authorisation of gene therapy products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):6–22. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-6-22>

### Введение

Синтез белков, которые отвечают за процессы регуляции и участвуют в процессах роста тканей организма, происходит в клетках под контролем генов, количество которых составляет более 25 000. Несмотря на высокую стабильность передачи генетической информации следующим поколением, встречается достаточно большое количество заболеваний, патогенез которых связан с генетическими нарушениями, что проявляется недостаточностью или полным отсутствием продукции соответствующего белка. Лечение генетических заболеваний базируется на заместительной терапии биотерапевтическими препаратами (ферменты, факторы свертывания крови и др.). Однако данный вид терапии имеет ряд недостатков, в первую очередь связанных с необходимостью

их постоянного введения. Кроме того, препараты на основе белка имеют низкую растворимость и биодоступность, короткий период полувыведения и обладают иммуногенностью [1]. При этом производство биотерапевтических препаратов представляет собой сложный биотехнологический процесс с высокими материальными затратами.

Успехи в области современной генетики, биотехнологии и биохимии привели к созданию методов модификации генетических программ клеток, что позволило разработать подходы для лечения генетических нарушений. В конечном итоге появились препараты нового поколения, которые получили название генотерапевтические лекарственные средства.

Генотерапия является инновационным методом лечения, основанным на введении

в организм функциональных генов, которые заменяют дефектные или отсутствующие гены в клетке. Таким образом, однократное введение генотерапевтического препарата (ГТП) позволяет восполнить синтез белка, дефицит которого обусловлен отсутствием или недостаточностью соответствующего гена. Кроме того, ГТП при необходимости могут блокировать гены, отвечающие за избыточный синтез белка, играющего ключевую роль в патогенезе заболевания. Поэтому появление первых ГТП инициировало поиск и генотерапевтических подходов для лечения заболеваний, которые не относятся к генетическим (опухолевые, дистрофические, аутоиммунные и др.).

Так как ГТП являются лекарственными средствами последнего поколения, которые содержат генетические структуры и для которых требуются особые условия доставки к клеткам-мишеням и встраивания терапевтического гена, то, несмотря на значительные успехи данного направления, при разработке и проведении доклинических и клинических исследований ГТП производители данной группы препаратов сталкиваются с различного рода проблемами. Об этом свидетельствует тот факт, что в настоящее время зарегистрированы единичные препараты для генной терапии, а у приблизительно половины ГТП, на которые была выдана временная лицензия, позднее она была отозвана. Кроме того, в Российской Федерации утверждены нормативные требования для ГТП, применяемых *ex vivo*<sup>1</sup>, а отечественные документы, регламентирующие вопросы разработки, контроля и регистрации ГТП для применения *in vivo* и *in situ*, отсутствуют.

В работе представлен анализ международного и отечественного опыта разработки и регистрации ГТП. Основное внимание в обзоре уделено проблемным аспектам разработки и регистрации препаратов данной группы, которые необходимо учитывать при подготовке отечественных нормативных требований для оценки качества, безопасности и эффективности ГТП для *in vivo* и *in situ* применения.

Цель работы – критический анализ международного опыта создания и регистрации генотерапевтических препаратов.

## Характеристика генотерапевтических препаратов

Согласно определению, приведенному в документе Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA), к ГТП относятся препараты, которые «опосредуют свое действие путем транскрипции и/или трансляции переданного генетического материала и/или путем интеграции в геном хозяина в виде нуклеиновых кислот, вирусов или генно-инженерных методов»<sup>2</sup> [2]. В определении ГТП Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) более подробно охарактеризованы основные свойства лекарственного продукта для генотерапии: «биологический лекарственный продукт, который содержит активное вещество в виде рекомбинантной нуклеиновой кислоты или состоит из нее, который используется или вводится людям для регулирования, восстановления, замены, добавления или удаления генетической последовательности, и его терапевтический, профилактический или диагностический эффект напрямую связан с рекомбинантной последовательностью нуклеиновой кислоты, которую он содержит, или с продуктом, экспрессирующим эту генетическую последовательность»<sup>3</sup> [2]. В Российской Федерации в Федеральном законе «Об обращении лекарственных средств»<sup>4</sup> дано определение ГТП близкое к определению EMA: «Генотерапевтические лекарственные препараты – лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности»<sup>5</sup> (введено Федеральным законом от 22.12.2014 № 429-ФЗ).

Таким образом, генная терапия включает в себя определение дефектного или отсутствующего гена, его синтез и доставку гена в клетку. Функциональной единицей (действующим веществом) ГТП обычно является ДНК, мРНК, малые интерферирующие РНК (siRNA) и малые некодирующие молекулы РНК (miRNA), а также

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

<sup>2</sup> Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). Guidance for Industry. FDA; 2020. <https://www.fda.gov/media/113760/download>

<sup>3</sup> Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMA/CAT/80183/2014). EMA; 2018. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf)

<sup>4</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

<sup>5</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».

синтетические молекулы (например, антисмысловые олигонуклеотиды).

ГТП могут встраивать свой «терапевтический ген» в клетки зародышевой линии и соматические клетки. Воздействие ГТП на клетки зародышевой линии (сперматозоиды и яйцеклетки) позволяет передавать наследственные изменения потомству. Потенциал генотерапии при введении ГТП, влияющих на клетки зародышевой линии, был продемонстрирован в исследованиях на животных (мыши, крысы, кролики, овцы, свиньи, козы и крупный рогатый скот) [3]. Исследования, посвященные разработке ГТП, влияющих на клетки зародышевой линии человека, по этическим соображениям не проводились, но активно дискутируются в научной литературе [4].

Использование ГТП с внесением генетической информации в соматические клетки не вызывает передачи генетических изменений потомству.

Терапевтический ген должен быть доставлен в соответствующую клетку-мишень, что реализуется с помощью *ex vivo*, *in situ* или *in vivo* методов. Метод генной терапии *ex vivo* основан на извлечении из организма клеток, модификации их генетической информации и обратное возвращение клеток в организм. Например, зарегистрированный FDA препарат Kymriah позволяет в условиях *ex vivo* встроить в Т-лимфоциты ген, кодирующий химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR) к CD19, который распознает и вызывает гибель опухолевых В-лимфоцитов при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе [5]. Для этого у пациента берут Т-лимфоциты, внедряют в них генетическую конструкцию, полученные генетически модифицированные клетки размножают и готовый препарат вводят обратно в организм пациента. Генетически модифицированные Т-лимфоциты (CAR Т-лимфоциты) экспрессируют новый белок – химерный антигенный рецептор (CAR), который позволяет им находить и прицельно уничтожать опухолевые В-лимфоциты, экспрессирующие CD19.

Генная терапия *ex vivo* – это генетическая модификация клеток *in vitro*, которые затем доставляются пациенту. Поскольку генная терапия *ex vivo*, включающая этапы извлечения клеток, их модификации с целью изменения генетических программ и введения пациенту, требует особых условий (например, соблюдение стерильности), эти продукты должны соответ-

ствовать нормативным требованиям как в отношении лекарственных продуктов на клеточной основе, так и в отношении продуктов генотерапии [6]. Соответственно, к ГТП, применяемым *ex vivo*, предъявляются особые требования, касающиеся качества, производства, доклинических и клинических исследований и особых условий введения лекарственного средства.

При применении препаратов *ex vivo* если возможно формирование комплекса, состоящего из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными препаратами для медицинского применения, то такой комплекс получил название биомедицинского клеточного продукта (БМКП)<sup>6</sup>. При этом, чтобы препарат был отнесен к БМКП, клетки, которые извлекаются из организма, должны быть подвергнуты модификации или культивированию<sup>7</sup>.

В Российской Федерации вопросы, связанные с разработкой, доклиническими исследованиями, экспертизой, государственной регистрацией, клиническими исследованиями, производством, реализацией и хранением БМКП, регламентируются Федеральным законом «О биомедицинских клеточных продуктах»<sup>8</sup>.

Метод генной терапии *in situ* (доставка «к месту») основан на введении ГТП непосредственно в клетки или ткани-мишени организма. Например, отечественный препарат для ревазуляризации при ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза Неоваскулген на основе плазмидного вектора, который содержит ген фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), вводится непосредственно в ишемическую ткань для стимуляции роста кровеносных сосудов [7]. В настоящее время проводятся исследования для использования метода генной терапии *in situ* для лечения муковисцидоза, мышечной дистрофии и др. При этом наиболее активно проводятся исследования по разработке ГТП, применяемых *in situ* для лечения опухолевых заболеваний.

### История развития генотерапевтических препаратов

Первым применил генную терапию M. Cline с соавт. в 1980 г. при лечении β-талассемии у двух пациентов [8]. Авторы разработали ГТП на основе ретровируса, содержащего ген β-глобина, препарат вводили в гемопоэтические стволовые

<sup>6</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

<sup>7</sup> Там же.

<sup>8</sup> Там же.

клетки. Препарат не продемонстрировал эффективности. Следует отметить, что FDA не утвердило протокол клинического исследования [8]. И только в 1988 г. было выдано первое официальное разрешение на проведение клинического исследования без оценки эффективности [9]. Исследование было запланировано с целью оценки возможности введения гена в клетку в условиях *ex vivo* без оценки эффективности. Авторам исследования удалось продемонстрировать встраивание гена в Т-лимфоциты. Именно это исследование продемонстрировало, что генная терапия возможна [9].

Первое исследование эффективности ГТП было начато в 1990 г. F. Anderson и M. Blaese (цитирование по [10]) для лечения синдрома дефицита аденозиндезаминазы (ADA), сопровождающегося тяжелым комбинированным иммунодефицитом (ADA-SCID). ГТП вводили *ex vivo*, и у 4 из 6 добровольцев терапевтический эффект сохранялся в течение 43 месяцев [10].

Первые успехи значительно повысили интерес к генотерапии и стимулировали разработку препаратов для лечения рака, в первую очередь на основе генов, отвечающих за экспрессию ингибиторов роста опухоли (например, ген, ответственный за синтез белка p53). В то же время проведенные исследования выявили и определенные сложности. Следует отметить, что введение препарата непосредственно в опухоль более эффективно, чем системное введение. Однако введение непосредственно в опухоль не позволяет воздействовать на метастатические клетки. При этом системное введение противоопухолевых ГТП вызывает слабую долгосрочную экспрессию гена и широкое биораспределение ГТП [11]. Первые исследования не оправдали надежды на эффективность системного (*in vivo*) введения ГТП. Основными причинами (кроме указанных) были иммунный клиренс вектора, слабый тропизм вектора к клеткам/тканям-мишеням, недостаточное количество вирусных векторов в препарате и др.

Наиболее подходящими заболеваниями для лечения ГТП являются моногенные заболевания. Первые клинические исследования применения ГТП (*in vivo*) для лечения моногенных заболеваний (муковисцидоз и мышечная дистрофия Дюшенна) были неудачными из-за проблем с доставкой терапевтического гена в клетки-мишени. При лечении дистрофии Дюшенна проблемы доставки были связаны с тем, что поверхность мышечной ткани, включая легкие и сердце, очень обширна [12].

В конце 1990-х гг. произошли трагические события, которые на десятилетие подорвали интерес к генотерапии. Данные события про-

изошли в процессе клинического исследования в США ГТП, разработанного для лечения дефекта в результате мутации гена орнитинтранскарбамилазы (ОТ) — фермента, который отвечает за расщепление аммиака в организме. Препарат был разработан на основе аденовирусного вектора, содержащего ген ОТ, который вводили в печеночную артерию. При этом предполагалось, что произойдет трансдукция аденовируса в клетки печени с последующей экспрессией ОТ, что приведет к восстановлению процесса расщепления аммиака. Введение пациенту  $6 \times 10^{10}$  вирусных частиц/кг привело к развитию воспалительной реакции, которая началась с дисфункции печени и завершилась полиорганной недостаточностью и смертью пациента [13].

Клиническое исследование ГТП для лечения ADA-SCID на основе ретровирусного вектора, проведенное на пациентах, у которых брали Т-лимфоциты и обрабатывали их препаратом с целью восстановления дефектного гена, показало, что Т-лимфоциты, обработанные препаратом, после введения их обратно в организм начинали активно пролиферировать и развивалась клиническая картина, напоминающая Т-лимфобластный лейкоз [14]. Это привело к гибели одного пациента, а остальным трем пациентам вынужденно был проведен курс химиотерапии. Анализ причин данного осложнения показал, что терапевтический ген встраивался в геном Т-лимфоцитов непосредственно перед геном LMO2, который является хорошо охарактеризованным онкогеном [15].

Последствием данных событий стала более жесткая позиция при выдаче разрешений на проведение клинических исследований и снижение интереса к данной проблеме среди разработчиков препаратов и инвесторов.

Таким образом, в истории развития генотерапии были периоды подъема и снижения интереса к данному направлению. Внимание к данной проблеме значительно возросло с началом пандемии COVID-19, так как основные вакцины против COVID-19 фактически являются ГТП.

### Системы доставки генотерапевтических препаратов

Одной из основных проблем для всех ГТП является доставка терапевтического гена в клетки/ткани-мишени. Проводились и продолжают исследования использования для доставки генетического материала в клетки/ткани-мишени физических, химических и биологических методов: электропорация, магнитофекция, доставка с использованием неорганических частиц (наночастицы золота, фосфат кальция, диоксид

кремния), липосомы, векторы на основе вирусов и др. На сегодня наиболее распространенными системами для передачи терапевтического гена в клетки-мишени являются вирусные векторы и векторы на основе плазмидной ДНК. Плазмидные ДНК-векторы можно вводить либо в простом солевом растворе (так называемая «голая» ДНК), либо в комплексе с носителем (например, липосома).

Среди изученных методов доставки гена наиболее эффективными оказались ГТП на основе вирусных векторов. Вирусы как средство доставки ГТП подбирают в зависимости от особенностей препаратов. В частности, для лечения онкологических заболеваний используют вирусы, обладающие онколитическими свойствами. Для разработки противоопухолевых препаратов проводятся исследования с использованием таких вирусов, как аденовирус, вирус простого герпеса, реовирус, вирус Коксаки, парвовирус, вирус Ньюкасла, вирус везикулярного стоматита, вирус кори и др. [16]. Данные вирусы используются для доставки в опухолевые клетки генов, инициирующих гибель клетки (суицидальные гены), генов, подавляющих ангиогенез, и/или генов, стимулирующих иммунный ответ против опухоли.

При разработке системы доставки гена на основе вирусного вектора в клетку необходимо учитывать следующие моменты. Терапевтическая ДНК большого размера неспособна самостоятельно проникать внутрь клетки через клеточную мембрану из-за своего размера и отрицательного заряда. Поэтому вирусный вектор должен иметь достаточную возможность включить в свой состав молекулу ДНК необходимого размера, так как если молекула гена имеет больший размер, это может привести к проблемам с ее включением в вирус. Кроме того, вирус должен обладать способностью инфицировать митотические и постмитотические клетки. При этом вирусы – кандидаты в ГТП не должны вызывать развития иммунного или воспалительного ответа, а также не должны быть патогенными. Вирусные векторы могут быть дефектными по репликации, компетентными по репликации или условно репликативными, причем каждый тип требует особого рассмотрения в отношении конструкции и безопасности. Важным аспектом является также возможность производства вирусного вектора в промышленных масштабах [17].

Основные потенциальные риски для безопасности при использовании вирусных векторов связаны с иммуногенностью вектора, нецелевыми эффектами, развитием воспаления и инсерционным мутагенезом. Появление антител к вирусному вектору может привести к сниже-

нию эффективности препарата, особенно в тех случаях, когда требуется повторное введение того же самого вирусного вектора (бустерная вакцинация, ревакцинация). Кроме того, развитие иммунного ответа может вызвать не только выработку антител к вирусу, но и инициировать развитие воспалительной реакции при введении очень высокой дозы аденовируса [18].

Риск инсерционного мутагенеза – встраивания гена в район гена-супрессора опухолевого роста или активации онкогена актуален для векторов, которые интегрируются в нежелательные участки генома, например векторы на основе ретровирусов. Для преодоления данного недостатка можно использовать векторы, которые не интегрируются в геном клетки-хозяина, или самоинактивирующиеся векторы, которые не содержат собственного промотора, а используют промотор самой клетки [19].

При производстве ГТП на основе вирусных векторов используют клетки почки эмбриона человека (HEK293) или клетки ретинобластомы человека (PER.C6), которые содержат участки раннего генома вируса, управляющие репликацией и упаковкой гена [20]. Для получения реплицирующих онколитических вирусов используют клеточные линии HeLa и A549.

Для разработки ГТП с целью *ex vivo* применения наиболее подходящими являются векторы на основе ретровирусов. Исследования различных вирусных векторов для получения препаратов для применения *in vivo* показали, что наиболее эффективными и безопасными являются ГТП на основе аденовирусных и аденоассоциированных вирусных векторов.

#### **Аденовирусный вектор**

Первым разработанным и одобренным для клинических исследований является ГТП на основе аденовирусного вектора. Возникновение названия аденовируса (AV) связано с тем, что впервые данный вирус был выделен из культуры клеток аденоидов человека в 1953 г. Существует семь видов аденовирусов человека (от А до G) и 57 серотипов. Подразделение на серотипы связано с различными способами заражения. Геном AV содержит ранние (*E1*, *E2a*, *E2b*, *E3* и *E4*), поздние (*L1*, *L2*, *L3*, *L4* и *L5*) и промежуточные гены (*IVA2* и *IX*). Кроме того, его геном несет некодирующие последовательности инвертированных концевых повторов (ITR), последовательности упаковки и вирусные РНК [21]. Процессы репликации кодируют ранние гены *E1* и *E4*. Препараты первого поколения на основе AV векторов были с частичной делецией *E1* и *E4* генов. Они не реплицируются

и не обладают онкогенностью, но могут содержать терапевтический ген размером не более 8000 п.н., слабо экспрессируют вирусные белки и вызывают активный иммунный ответ при введении. Для устранения данных недостатков в препаратах следующего поколения на основе AV векторов дополнительно удаляли *E2a*, *E2b*, *E4* и *E3* гены, что не устраняло до конца слабую экспрессию вирусных белков и быструю потерю экспрессии терапевтического гена и, кроме того, значительно усложнило производство препарата [22]. Это привело к временной потере интереса к использованию AV векторов для разработки ГТП. В препаратах третьего поколения на основе AV вектора использовались так называемые «выпотрошенные» векторы, в которых отсутствуют все гены вируса кроме ITR. Это в первую очередь позволило вмещать терапевтические гены размером до 37000 п.н. и значительно повысило экспрессию трансгена. При этом препараты на основе данной модификации обладают значительно меньшей иммуногенностью, чем векторы первого и второго поколений [23].

Аденовирусы обладают сильным тропизмом к эпителиальным клеткам за счет связывания с Коксаки-аденовирусным рецептором (Coxsackie adenovirus receptor, CAR). При этом AV вектор не встраивается в геном клетки-хозяина, что снимает опасения по поводу активации онкогенов клетки. С другой стороны, при делении клеток это не позволяет передавать следующим поколениям клеток информацию, заложенную в терапевтическом гене. Еще одна важная особенность аденовируса связана с тем, что среди всех вирусных векторов он способен включать терапевтические гены большого размера [24]. Данные особенности AV сделали их одними из самых предпочтительных вариантов для доставки терапевтических генов в клетки.

Основным недостатком AV векторов является высокая иммуногенность AV. В обычных условиях при попадании в организм человека AV дикого типа белки капсида активируют иммунокомпетентные клетки, которые, в свою очередь, начинают секретировать цитокины и факторы хемотаксиса, привлекающие в очаг нейтрофилы, макрофаги и NK. При этом запускается иммунная реакция с выработкой через несколько суток специфических антител к AV. В том случае если AV вектор в клетке-хозяине экспрессирует белки AV, то это инициирует иммунные клеточные ответы, приводящие к гибели клеток, в которые проник векторный вирус.

Высокая иммуногенность аденовируса выявлена в отношении различных серотипов AV. Так, по разным данным 50–80% населения имеют

антитела к 5 серотипу AV, причем преобладают нейтрализующие антитела, снижающие эффективность лечения [25, 26]. Изучение частоты встречаемости антител к 36 серотипу AV показало, что их уровень коррелирует с избыточным ожирением [27].

Для снижения иммуногенности AV векторов используются различные подходы. В частности, были предприняты попытки химической модификации AV для снижения иммунного и воспалительного ответа на векторный вирус. Определенные успехи были достигнуты при создании аденовирусных химерных векторов. Так, для химерного AV вектора на основе 5 и 3 серотипов AV человека показана высокая аффинность связывания с CD46, экспрессируемым на многих солидных опухолях [28]. Химерный AV вектор на основе серотипов 5 и 35 вызывал эффективную трансдукцию клеток гладких мышц сосудов при лечении колоректального рака и ишемических ран [29]. Продемонстрирован потенциал использования химерного AV вектора на основе 5 и 11 серотипов для терапии глиомы и химерного AV вектора 3 и 11 серотипов для терапии рака толстой кишки [30].

Кроме создания химерных AV векторов активно проводятся исследования по созданию препаратов на основе вирусов, которые не встречаются у человека или встречаются редко, такие как AV человека 26 серотипа, AV собаки 2 серотипа и AV шимпанзе 3 серотипа. Одним из первых препаратов на основе данных AV был химерный AV вектор на основе AV человека 26 серотипа и AV шимпанзе 5 серотипа, которые использовались для получения вакцины против лихорадки Эбола [31].

Кроме иммуногенности существует еще потенциальный риск инициации вирусом воспалительной реакции. В частности, при разработке ГТП, содержащего ген, кодирующий орнитин-транскарбамилазу, на этапе клинического исследования было показано отсутствие трансдукции терапевтического гена, секвестрация AV вектора в печени и развитие тяжелой гепатотоксичности с летальным исходом [32].

Несмотря на значительные успехи, требуются дальнейшие усилия для модификации вирусных векторов. В частности проблемой при производстве препаратов на основе AV векторов может быть присутствие значительного количества «пустых» AV частиц, не содержащих терапевтический ген. При создании вакцины против лихорадки Эбола было установлено, что эффективность вакцины зависит от количества AV частиц, при этом оптимальным является содержание  $10^{10}$ – $10^{12}$  AV частиц в дозе препарата [33]. Од-

нако получение препарата в производственных условиях с высоким титром вируса и удаление пустых векторов остается проблемой.

Таким образом, активные исследования применения AV векторов для доставки терапевтического гена позволили выявить их слабые места и определить подходы для устранения недостатков. При этом во многих лабораториях были созданы библиотеки AV векторов, что позволило создать новые векторы для лечения рака простаты и поджелудочной железы, а также глиомы [34]. В частности, в исследовании Y. Yamamoto с соавт. был получен AV вектор, несущий ген лиганда, вызывающего сильный онколитический эффект при раке поджелудочной железы [35].

Показана эффективность использования AV вектора для встраивания гена фактора IX свертывания крови в хромосому собак с гемофилией B, у которых в течение 960 суток наблюдался синтез фактора IX [36]. Успешной оказалась также разработка AV вектора для долговременной экспрессии гена, кодирующего аланин-глиоксилат аминотрансферазу (AGT) у пациентов с первичной гипероксалурией 1 типа, редким заболеванием почек, вызывающим рецидивы почечнокаменной болезни [37]. Достигнуты успехи в создании ГТП на основе AV для лечения опухолевых заболеваний, причем разработанные препараты не только инициировали гибель опухолевых клеток, но и воздействовали на опухолевое микроокружение (рост сосудов, иммунный ответ и др.) [38].

#### **Аденоассоциированный вирусный вектор**

В качестве средства доставки терапевтического гена в клетки-мишени также широко используется аденоассоциированный вирус (AAV). Впервые AAV был выделен как контаминант аденовируса обезьяны, что послужило основой для его названия. В дальнейшем было установлено, что он встречается у человека, животных и птиц. AAV содержит одноцепочечную ДНК длиной 4700 нуклеотидов и не содержит оболочки. Геном AAV содержит промоторы p5, p19 и p40 и три гена, фланкированные двумя ITR: ген *rep* (кодирует белки, обеспечивающие репликацию вируса), ген *cap* (кодирует капсидные белки) и ген *aar* (кодирует белок, отвечающий за сборку). Ген *rep* кодирует четыре белка (Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40), которые необходимы для репликации и упаковки вирусного генома. Ген *cap* отвечает за синтез капсидных белков (VP1, VP2, VP3), которые образуют внешнюю оболочку капсида [39]. Ген *aar* кодирует белок (AAP), активирующий сборку в альтернативной рамке считывая, перекрывающей ген *cap*. Для инфи-

цирования клеток и репликации AAV требуются вспомогательные белки, факторы или вирусы, такие как AV, вирус простого герпеса, вирус псевдобешенства, цитомегаловирус, УФ-излучение или гидроксимочевина [40]. Для продукции AAV обычно используют культуру клеток HEK293, в которых экспрессируются гены, необходимые для сборки AAV (гены белков E1a, E1b, E2a и E4orf6) [41].

При трансдукции клеток AAV вектором вирусный геном, содержащий терапевтический ген, проникает в ядро клетки и интегрируется, но также вирусный геном может доставляться в эпизомальной форме. Так, имеются данные, что терапевтический ген фактора IX свертывания крови сохранялся у одного пациента в течение 10 лет клинического исследования [42]. Для эффективной трансдукции AAV вектора на поверхности клеток-мишеней должны экспрессироваться определенные рецепторы, к которым AAV проявляет высокую тропность: гепарансульфат протеогликан, интегрины  $\alpha v\beta 5$  и  $\alpha 5\beta 1$ , рецептор фактора роста фибробластов 1 типа, рецептор фактора роста тромбоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, рецептор эпидермального фактора роста, рецептор ламинина и фрагменты сиаловой кислоты. Известно, что разные AAV серотипы обладают разным тропизмом к тканям организма. Так, из 13 существующих серотипов AAV не все способны к трансдукции в клетку. В частности, для серотипа AAV1 установлена высокая способность трансдукции в мышцы, нейроны, сердце и пигментный эпителий сетчатки. Серотип AAV2 может инфицировать многие типы опухолевых клеток (нейроны, почки, пигментный эпителий и фоторецепторные клетки сетчатки). Причем AAV2 является единственным серотипом, при использовании которого возможна трансдукция и доставка терапевтического гена в почки. Векторы на основе серотипов AAV4 и AAV5 могут трансдуцировать пигментный эпителий сетчатки. Векторы на основе серотипа AAV6 обладают высоким тропизмом к тканям сердца и эпителиальным клеткам дыхательных путей, а AAV7 – к клеткам печени [43]. Препарат на основе AAV8 вектора использовался для доставки гена фактора IX в клетки печени при лечении гемофилии. Продемонстрирована успешная трансдукция AAV8 вектором клеток лимфомы, однако при использовании данной конструкции возможно повреждение клеток поджелудочной железы [44].

Для повышения эффективности AAV векторов были разработаны химерные AAV. Например, химерный вектор, содержащий геном AAV2 и капсидные белки AAV5, за счет высокой

тропности последних к нейронам более эффективно трансдуцировал нейрональные клетки, чем родительский AAV2. Кроме того, были созданы химерные AAV, включающие геном одного серотипа и капсидные белки нескольких других серотипов. В частности, химерный вектор AAV-DJ, содержащий капсидные белки восьми различных серотипов AAV, продемонстрировал более высокую эффективность трансдукции *in vitro* по сравнению с серотипом дикого типа и высокую тропность к широкому спектру тканей *in vivo*, а его модификация, серотип AAV-DJ8, проявил повышенную тропность к тканям мозга [45].

При этом одна из проблем применения AAV векторов обусловлена наличием специфических к AAV антител и клеток памяти. Более 50% взрослого населения имеют нейтрализующие антитела к AAV, а в Северной Америке антитела, специфичные к AAV, встречаются у 80% населения [46, 47]. Наиболее высокий уровень иммуногенности выявлен в отношении AAV2, тогда как иммуногенность других серотипов менее выражена. Иммунные реакции против серотипа AAV2, которые развиваются в организме, могут привести к повреждению тканей организма [48]. В частности, при лечении ГТП на основе AAV2 вектора для доставки фактора IX свертывания крови у пациента наблюдалось развитие трансамината (феномен повышения активности печеночных ферментов без проявлений гепатотоксичности) с дальнейшим формированием Т-клеточного иммунного ответа против AAV2 и гепатоцитов [49].

Наличие специфических антител к AAV является одной из причин не только низкой эффективности ГТП, но и причиной тяжелых побочных реакций [50]. Учитывая иммуногенность AAV вектора, повторное системное введение такого препарата осложнено риском развития иммунного ответа. Значительно меньше риск иммуногенности при введении ГТП в органы, которые слабо контактируют с иммунокомпетентными клетками, например в глаз.

Для ускользания от иммунного распознавания были разработаны мозаичные или гибридные векторы [51]. Например, применение гибридов, состоящих из комбинации AAV серотипов 2 и 5 (вектор AAV2.5), приводит к снижению распознавания системой иммунитета и позволяет ускользать от действия нейтрализующих антител [52]. Учитывая, что индукция иммунного ответа в первую очередь связана с наличием в вирусе цитозин-фосфат-гуанин динуклеотидного мотива (CpG), для снижения иммунного ответа были разработаны AAV векторы без CpG [53]. Созданные для внутривенной доставки терапев-

тических генов векторы AAV6.2, AAV2i8, AAVrh10 и AAVrh32.33 обладают сниженной способностью к секвестрации в печени и индукции ответа Т-клеток, что было отмечено при клиническом наблюдении [54].

Потенциальный риск применения AAV вектора также может быть связан со способностью встраивания AAV в геном клетки и с развитием генотоксичности, что было продемонстрировано в исследованиях на модельных животных [55]. Обычно ГТП на основе векторных вирусов конструируют таким образом, чтобы они не встраивались в зародышевые клетки. Тем не менее один случай обнаружения AAV2 вектора в сперматозоидах зарегистрирован при системном введении ГТП [56].

Одной из проблем является сложность масштабирования производства ГТП на основе AAV векторов. При масштабном производстве ГТП на основе AAV векторов достаточно большое количество капсидов в препарате остаются «пустыми» (без терапевтического гена) [57]. В литературе дискутируется вопрос о необходимости удаления «пустых» капсидов, так как их удаление основано на методе ультрацентрифугирования, что очень сложно осуществить при масштабном производстве препарата при соблюдении принципов надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP) [58].

Таким образом, несмотря на ряд достоинств AAV векторов, к которым можно отнести непатогенность AAV, безопасность и широкое применение в качестве платформы для доставки генов, основными факторами, которые ограничивают их применение в генотерапии, являются следующие: возможность доставки небольшого по размерам терапевтического гена (не более 5000 п.н.), иммуногенность капсидных белков, сложность производства препарата в больших объемах, необходимость введения высоких доз для достижения эффективности, широкий тропизм и потенциальный риск развития активного иммунного ответа против AAV [59].

## Генотерапевтические препараты

Несмотря на множество доклинических и клинических исследований к настоящему времени на рынке находится небольшое количество ГТП. Первый препарат для генотерапии, Gendicine (Shenzhen Sibiono GeneTech Co., Ltd, Китай), разработанный на основе рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген белка p53 человека дикого типа (rAd-p53), был одобрен в Китае в 2003 г. Препарат предназначен для лечения плоскоклеточного рака головы и шеи, раз-

витие которого в 50% случаев сопровождается мутацией гена *p53*. Введение препарата вызывало торможение клеточного цикла и апоптоз в опухолевых клетках. Препарат применялся путем интратуморальных инъекций и/или внутривенных инфузий один раз в неделю в течение 8 недель. Препарат Gendicine продемонстрировал высокую эффективность и безопасность при лечении более чем 30000 онкологических пациентов [60]. Недостатком данного препарата является необходимость непосредственного введения в опухоль, и, следовательно, он не эффективен в отношении тех видов опухолей, в которые не может быть введен, или против метастатических клеток.

Компанией Introgen Therapeutics разработан аналогичный препарат Advexin на основе AV вектора, несущего ген *p53*. В отличие от Gendicine препарат Advexin вводится не интратуморально, что позволяет расширить спектр показаний. Однако при регистрации данного препарата по ускоренной процедуре FDA в 2008 г. заявка на его регистрацию не была одобрена из-за опасений по поводу безопасности AV векторов после того, как в 1999 г. умер участник клинических исследований [61].

Компанией Ark Therapeutics (Великобритания) была подана заявка в EMA на регистрацию препарата Sergero на основе аденовирусного вектора с геном, кодирующим тимидинкиназу, для лечения глиомы. Однако эксперты EMA пришли к заключению, что разработчиками были нечетко продемонстрированы эффективность и безопасность препарата.

Препарат Oncorine (Shanghai Sunway Biotech Co., LTD, Китай) на основе онколитического вируса с дефектом репликации, несущий ген *p53*, предназначен для лечения рака головы и шеи, был одобрен в Китае в 2005 г. Препарат Oncorine в сочетании с химиотерапией продемонстрировал высокую эффективность и приемлемый профиль безопасности.

Препарат Rixin-G (Epeius Biotechnologies Corporation, США) создан на основе химерного ретровирусного вектора, несущего ген цитотоксического циклина G1, экспрессия которого приводит к блокированию активности циклина G1 и ингибированию пролиферации опухолевых клеток. Препарат был одобрен в Республике Филиппины в 2005 г., а позже – в США в качестве орфанного препарата для лечения опухоли поджелудочной железы. Препарат вводится внутривенно. В ретровирусные частицы встроены мотив, полученный из фактора свертывания крови фон Виллебранда, который избирательно связывается с коллагеновыми белками микроо-

кружения опухоли и с рецепторами опухолевых клеток, что способствует проникновению в клетки и последующей интеграции генетического материала в хромосомы активно делящихся опухолевых клеток [62]. Клинические исследования препарата подтвердили его безопасность, противоопухолевую активность и возможность увеличения средней продолжительности жизни пациентов.

Первым зарегистрированным в EMA препаратом на основе AAV1 вектора является Glybera (UniQure, Нидерланды). Препарат предназначен для лечения редкого моногенного синдрома семейной хиломикронемии (Lipoprotein lipase deficiency, LPLD). Заболевание связано с мутацией гена, кодирующего продукцию липопротеинлипазы (lipoprotein lipase, LPL) и передается по аутосомно-рецессивному типу. Внутримышечное введение Glybera в ткань скелетной мускулатуры приводит к трансдукции AAV1 вектором клеток мышц, и в этих клетках начинается синтез LPL. Введенный в мышечную ткань ген LPL в составе AAV1 вектора не встраивается в хромосомы, а остается в эписомальной форме. Так как мышечные клетки делятся очень медленно, то терапевтический ген сохраняется в течение многих лет, что было показано при исследовании на приматах [63]. Для предотвращения развития иммунного ответа на вирус введение препарата осуществляют на фоне иммуносупрессивной терапии. Учитывая высокую стоимость препарата и очень малое количество лиц, у которых встречается LPLD, руководство Голландской компании UniQure не стало в 2017 г. продлевать лицензию на продажу препарата.

Препарат Luxturna (Spark Therapeutics, Inc.) на основе AAV2 вектора одобрен FDA в 2017 г. в качестве орфанного для лечения хориодермии, которая является редким наследственным рецессивным дегенеративным заболеванием сетчатки, приводящим к дегенерации хориокапилляров пигментного эпителия сетчатки и фоторецепторов глаза. Заболевание связано с дефектом гена, кодирующего геранилтрансферазу. Препарат содержит в составе вирусного вектора дикий тип гена *RPE65* и вводится больным пациентам с дистрофией сетчатки (при подтвержденной двуаллельной мутации гена *RPE65*) для восстановления зрения в течение нескольких месяцев. Лечение препаратом вызывает заметное улучшение способности пациентов видеть при тусклом свете [64].

Препарат Imlygic (разработка компании BioVex Inc., приобретенная Amgen) зарегистрирован FDA как препарат с показанием для лечения меланомы. Препарат разработан

на основе вектора вируса простого герпеса, который является онколитическим вирусом. Введение препарата и инфицирование опухолевых клеток вирусным вектором приводит к тому, что вирус начинает реплицироваться в опухолевых клетках и синтезировать гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), что приводит к лизису опухолевых клеток и высвобождению опухолевых антигенов, на которые затем при стимуляции GM-CSF формируется иммунный ответ. Препарат вводят *in situ* в кожные, подкожные и узловые пораженные участки [65]. Курс лечения Imlygic включает серию инъекций в очаги меланомы в течение 6 месяцев для полного излечения. Препарат также зарегистрирован в ЕС и Австралии для лечения меланомы.

Российским ПАО «Институт стволовых клеток человека» был разработан и зарегистрирован в 2012 г. препарат Неоваскулген, который является первым отечественным невирусным препаратом для генотерапии<sup>9</sup>. Препарат разработан для лечения заболеваний с атеросклеротическим поражением периферических артерий и представляет собой плазмидную ДНК, несущую ген VEGF, клонированный под промотором CMV. Терапевтический ген стимулирует ангиогенез и кровоснабжение в пораженном участке. Препарат вводится внутримышечно по возможности максимально близко к участку ишемии. Клинические пострегистрационные исследования свидетельствуют об эффективности препарата, которую оценивали по значительному увеличению расстояния при движении пациентов без возникновения боли.

### Клинические исследования генотерапевтических препаратов

Первое в мире клиническое исследование препарата для генотерапии было проведено в 1989 г. В настоящее время в мире зарегистрировано более 3700 клинических исследований ГТП в 204 странах мира. Более половины клинических исследований проводятся с использованием ГТП на основе AV и ретровирусов. Следует отметить, что преобладают разработки препаратов для онколитической терапии и вакцинации.

Более чем 200 клинических исследований проводится с препаратами на основе AAV векторов. Учитывая, что многие векторы AAV (осо-

бенно AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 и AAV9) способны проникать через гематоэнцефалический барьер, на основе данных векторов проводятся клинические исследования препаратов для лечения лизосомных болезней накопления, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, эпилепсии, спинальной мышечной атрофии, болезни Баттена и др. [66]. Кроме того, разработаны и проходят клинические исследования препараты на основе AAV векторов для лечения тяжелой гемофилии В, которые содержат ген фактора IX [67].

### Регуляторные требования к генотерапевтическим препаратам

#### Нормативные требования FDA

Один из первых законов, регламентирующий безопасность биологических препаратов, был разработан в США в 1902 г. Причиной появления закона явилась трагедия с заражением столбняком и гибелью детей после введения противодифтерийной сыворотки в 1901 г. [68].

В составе FDA в 1972 г. был организован Центр оценки и исследования биологических препаратов (Center for Biologics Evaluation and Research, CBER). В 1980-х годах, когда начались исследования по переносу генов в стволовые клетки, возникла необходимость в создании подразделения, специализирующегося по данной проблеме. Это привело к образованию нового подразделения CBER, которое получило название Управление клеточной, тканевой и генотерапии (Office of Cellular, Tissue and Gene Therapies, OCTGT), которое занимается регулированием вопросов, в первую очередь связанных с безопасностью проведения клинических исследований ГТП<sup>10</sup>.

С появлением первых продуктов на основе генно-инженерных технологий (лекарственные средства, продукты питания и др.), в первую очередь на основе рекомбинантной ДНК, к вопросам, связанным с генно-модифицированными продуктами, значительно возрос интерес общественности. В связи с этим в США в 1974 г. при Национальном институте здравоохранения (National Institutes of Health, NIH) был образован Консультативный комитет по рекомбинантной ДНК (Recombinant DNA Advisory Committee, RAC). В RAC было разработано Руководство по исследованиям молекул, полученных с использованием рекомбинантной ДНК<sup>11</sup>, которое регламентирует систему надзора за исследова-

<sup>9</sup> <https://neovasculgen.info/dose-preparata-neovaskulgen>

<sup>10</sup> [www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/NewsEvents/ucm232821.htm](http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/NewsEvents/ucm232821.htm)

<sup>11</sup> NIH guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules (NIH guidelines). NIH; 2019. <https://osp.od.nih.gov/biotechnology/nih-guidelines/>

ниями по переносу генов. Несмотря на то что RAC контролирует исследования, финансирование которых одобрено NIH, в США все частные компании, работающие в данном направлении, соблюдают рекомендации RAC и NIH. Кроме того, RAC проводит открытые заседания для анализа критических проблем безопасности при их появлении.

В последнее время Американское общество генной и клеточной терапии (American Society of Gene and Cell Therapy, ASGCT) начало активную дискуссию по вопросу о необходимости одобрения программ клинических исследований в RAC<sup>12</sup>. Свою позицию ASGCT обосновывает тем, что RAC был образован с целью предотвращения возможности попадания терапевтического гена в клетки зародышевой линии или мутации вирусных векторов. Однако по данным ASGCT в течение 30 лет применения генотерапии не было случаев развития данных осложнений.

#### **Нормативные требования ЕМА**

В Европейском союзе (ЕС) в составе регуляторного органа ЕМА вопросами, связанными с лекарственными препаратами, в том числе и генотерапевтическими, занимается Комитет по лекарственным средствам для человека (Committee for Proprietary Medicinal Products, CHMP). При появлении ГТП и других современных лекарственных средств в Европейском союзе была разработана особая нормативно-правовая база – Регламент № 1394/2007<sup>13</sup> по лекарственным препаратам для передовой терапии (advanced therapy medicinal products, ATMPs). По мнению специалистов ЕМА лекарственные препараты для передовой терапии представляют собой основной класс инновационных методов лечения, существенно отличающихся от классических терапевтических средств. Разработанный Регламент № 1394/2007 вместе с Директивой 2009/120 ЕС<sup>14</sup> устанавливают основные требования к лекарственным препаратам для передовой терапии и их регистрации.

Данный документ регламентирует четыре различных типа продуктов, в том числе и лекарственные препараты для генотерапии (Gene therapy medicinal products, GTMPs).

Регламентом № 1394/2007 было инициировано создание Комитета по передовой терапии (Committee for Advanced Therapies, CAT). В состав CAT входят 22 эксперта, значительная часть которых с опытом работы в области генотерапии. Основная функция CAT заключена в рассмотрении заявок на регистрацию. При этом решение CAT не является решающим, оно должно быть одобрено в том числе и CHMP.

Первый документ, регламентирующий вопросы качества, доклинических и клинических исследований ГТП, был подготовлен ЕМА в 2001 г.<sup>15</sup> Следует отметить, что данный документ распространяется не только на ГТП, но и на генетически модифицированные клетки и ДНК-вакцины для профилактики инфекционных заболеваний. Со временем появилась новая информация, были разработаны новые технологии и методы исследования, был накоплен опыт регистрации и применения ГТП, что потребовало пересмотра данного документа. В связи с этим ЕМА пересмотрело руководство и утвердило в 2018 г. новую редакцию Руководства ЕМА по качеству, доклиническим и клиническим аспектам лекарственных средств генотерапии<sup>16</sup>. В пересмотренном руководстве были учтены правовые и технические требования, изложенные в Регламенте № 1394/2007 по лекарственным препаратам для передовой терапии и Директиве 2009/120/ЕС. Учитывая, что в последней Директиве дано новое определение лекарственных препаратов для генотерапии, пересмотренное Руководство ЕМА не распространяется на продукты на основе генетически модифицированных клеток и ДНК-вакцин (для профилактики инфекционных заболеваний).

Раздел, посвященный вопросам оценки качества и производства ГТП в пересмотренном Руководстве ЕМА, переработан таким образом,

<sup>12</sup> <https://www.kurzweilai.net/gene-therapists-ask-to-be-released-from-the-rac>

<sup>13</sup> Regulation (EC) No 1394/2007 of the European parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1394&from=EN>

<sup>14</sup> Commission directive 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009L0120>

<sup>15</sup> Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products (CPMP/BWP/3088/99). EMA; 2001. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-quality-preclinical-clinical-aspects-gene-transfer-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-quality-preclinical-clinical-aspects-gene-transfer-medicinal-products_en.pdf)

<sup>16</sup> Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMA/CAT/80183/2014). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf)

чтобы охарактеризовать как можно более широкий спектр векторов доставки (новые вирусные векторы, невирусные и бактериальные векторы)<sup>17</sup>. В разделах Руководства, посвященных доклиническим исследованиям, представлена информация об исследованиях по обоснованию пути и схемы введения препарата. Кроме того, представлены подробные рекомендации по подбору моделей *in vitro* и *in vivo*, которые позволяют оценить эффекты, вызываемые непосредственно ГТП.

В части Руководства ЕМА, посвященной клиническим исследованиям ГТП с учетом особенности данной группы препаратов, включены рекомендации по изучению не только самого ГТП, но и трансгенного продукта<sup>18</sup>. В новой редакции Руководства были обновлены рекомендации по фармакологическим исследованиям, например: изменение требований к исследованиям биораспределения и выведения вектора, введение специальных требований к исследованиям фармакокинетики трансгенного продукта. Также были переработаны и расширены требования к исследованиям эффективности и безопасности, подробно описаны вопросы, касающиеся конечных точек клинической безопасности. Кроме того, в разделе клинических исследований представлены требования к фармаконадзору<sup>19</sup>.

#### **Опыт регистрации генотерапевтических препаратов в ЕМА**

В работе М. Carvalho с соавт. проанализированы особенности регистрации ГТП в ЕМА в настоящее время [69]. Так, в период с 2008 по 2017 г. ЕМА рассмотрело 7 заявок на регистрацию ГТП, из них только 3 препарата были зарегистрированы. Среди поданных на регистрацию преобладали препараты для лечения опухолевых заболеваний (5 препаратов). По данным авторов практически ко всем препаратам (кроме одного) были замечания экспертов ЕМА по параметрам качества, которые касались характеристики производственного процесса и спецификации [69]. При этом в досье двух (Advexin и CLG) из четырех отклоненных заявок на регистрацию не были в полной мере охарактеризованы показатели репликации вирусов. Присутствие в сериях препаратов, которые вводятся человеку, реплицирующихся аденовирусов нежелательно, поскольку они могут бесконтрольно реплицироваться у пациента, что создает потенциальные риски для безопасности [69].

Проблемы оценки эффективности ГТП в клинических исследованиях связаны не только с особенностью данных препаратов, но и с другими факторами. Во-первых, очень часто ГТП разрабатываются как орфанные препараты. Обычно орфанные препараты регистрируются «на условиях», т. е. на основании оценки на ограниченной выборке и им выдается временная лицензия до представления материалов в полном объеме. При этом очень сложно бывает набрать выборку до регистрации, чтобы с высокой степенью статистической достоверности продемонстрировать эффективность препарата. В частности, в ЕМА (в период с 2007 по 2017 г.) из 7 заявок на регистрацию в 5 были заявки на регистрацию орфанных препаратов. Во-вторых, в литературе уже достаточно долго дискутируется вопрос о конечных точках эффективности противоопухолевых препаратов. В своих требованиях по оценке противоопухолевых лекарственных средств ЕМА рекомендует в качестве приемлемых конечных точек эффективности следующие критерии: уровень излечения, общая выживаемость, выживаемость без прогрессирования или выживаемость без заболевания [70]. Среди 7 заявок на регистрацию в ЕМА (в период с 2007 по 2017 г.) к представленным материалам 5 препаратов у экспертов ЕМА были замечания, касающиеся достоверности результатов оценки эффективности. Причем по данным экспертов ЕМА один препарат (CLG) оказывал более негативное влияние на выживаемость больных с опухолью по сравнению со стандартным лечением.

Как свидетельствует опыт разработки, основная проблема безопасности связана с иммуногенностью ГТП. В частности, при регистрации в ЕМА препарата Glybera результаты его клинического исследования показали, что введение препарата активно инициирует гуморальный и клеточный ответ на препарат. Для решения данной проблемы разработчиками было предложено введение препарата на фоне трехмесячной иммуносупрессивной терапии. При регистрации ГТП необходимо оценить иммуногенность не только к самому препарату, но и к белку, за экспрессию которого отвечает терапевтический ген в препарате. В частности, при регистрации препарата Strimvelis в ЕМА для лечения заболевания, вызванного дефицитом аденозиндезаминазы, разработчики констатировали, что препарат обладает низкой иммуногенностью, но не представили результаты оценки уровня антител против аденозиндезами-

<sup>17</sup> Там же.

<sup>18</sup> Там же.

<sup>19</sup> Там же.

назы, что послужило поводом для представления замечаний со стороны экспертов EMA [69].

## Заключение

В настоящее время зарегистрировано незначительное количество ГТП (FDA зарегистрировано 13 ГТП, EMA – 16 ГТП), что обусловлено и особенностью данной группы препаратов, и проблемами, общими для регистрации всех лекарственных средств. Одна из основных проблем ГТП связана с использованием вирусных векторов для доставки терапевтического гена в клетку-мишень. Современные методы редактирования генома позволяют получать вирусные векторы с необходимыми свойствами, однако для каждого конкретного ГТП требуются особые условия модификации вирусного вектора.

Учитывая, что ГТП являются препаратами последнего поколения, совершенствование нормативно-правовой базы для оценки качества, эффективности и безопасности данной группы препаратов, а также их регистрации яв-

ляется необходимым. Опыт FDA и EMA показал, что для оценки безопасности и эффективности ГТП недостаточно процедурных мероприятий, которые используются при регистрации традиционных препаратов. В структурах FDA и EMA образованы подкомитеты с рекомендательными функциями, которые профессионально занимаются экспертной оценкой генотерапевтических препаратов.

В Российской Федерации в настоящее время активно ведутся разработки новых ГТП. Зарегистрирован и успешно применяется один отечественный ГТП для лечения нарушений периферического кровоснабжения.

Представленный обзор свидетельствует о необходимости создания отечественной нормативной базы, а также нормативных рекомендаций в рамках государств – членов Евразийского экономического союза для разработки, оценки качества, безопасности и эффективности ГТП, а также регистрации этой группы препаратов.

## Литература/References

1. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Медуницын НВ, Крючков НА. Механизмы развития нежелательного иммунного ответа при применении биотехнологических препаратов. *Иммунология*. 2017;38(5):271–83. [Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Medunitsyn NV, Kryuchkov NA. Mechanisms of development of the undesirable immune response at use of biotechnological medicines. *Immunologiya = Immunology*. 2017;38(5):271–83 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-5-271-283>
2. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttua S. History of gene therapy. *Gene*. 2013;525:162–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
3. Cartier-Lacave N, Ali R, Ylä-Herttua S, Kato K, Baetschi B, Lovell-Badge R, et al. Debate on germline gene editing. *Hum Gene Ther Methods*. 2016;27(4):135–42. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.28999.deb>
4. McCarthy M. Scientists call for moratorium on clinical use of human germline editing. *BMJ*. 2015;351:h6603. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6603>
5. Morrow T. Novartis's Kymriah: harnessing immune system comes with worry about reining in costs. *Manag Care*. 2017;26(10):28–30.
6. Yano K, Watanabe N, Tsuyuki K, Ikawa T, Kasanuki H, Yamato M. Regulatory approval for autologous human cells and tissue products in the United States, the European Union, and Japan. *Regen Ther*. 2015;1:45–56. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2014.10.001>
7. Deev R, Plaksa I, Bozo I, Mzhavanadze N, Suchkov I, Chervyakov Y, et al. Results of 5-year follow-up study in patients with peripheral artery disease treated with PL-VEGF165 for intermittent claudication. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2018;12(9):237–46. <https://doi.org/10.1177/1753944718786926>
8. Wade N. UCLA gene therapy racked by friendly fire. *Science*. 1980;210(4469):509–11. <https://doi.org/10.1126/science.6932738>
9. Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 1990;323:570–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>
10. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Zhang F, Adams S, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase – deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci Transl Med*. 2011;3(97):97ra80. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002716>
11. Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther*. 2000;7:2–8. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3501084>
12. Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13714–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.240335297>
13. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80:148–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016>
14. Haccin-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al.

- LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302(5644):415–9. <https://doi.org/10.1126/science.1088547>
15. Nam CH, Rabbitts TH. The role of LM02 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther*. 2006;13(1):15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.09.010>
  16. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review. *JAMA Oncol*. 2017;3(6):841–9. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064>
  17. Giacca M, Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release*. 2012;161(2):377–88. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.008>
  18. Chattopadhyay S, Sen GC. dsRNA-activation of TLR3 and RLR signaling: gene induction-dependent and independent effects. *J Interferon Cytokine Res*. 2014;34(6):427–36. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0034>
  19. Herrero MJ, Sabater L, Guenechea G, Sendra L, Montilla AI, Abargues R, et al. DNA delivery to 'ex vivo' human liver segments. *Gene Ther*. 2012;19:504–12. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.144>
  20. Wold WS, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013;13(6):421–33. <https://doi.org/10.2174/1566523213666131125095046>
  21. Majhen D, Ambriović-Ristov A. Adenoviral vectors—how to use them in cancer gene therapy? *Virus Res*. 2006;119(2):121–33. <https://doi.org/10.1016/j.virus-res.2006.02.001>
  22. Wen S, Schneider DB, Driscoll RM, Vassalli G, Sassani AB, Dichek DA. Second-generation adenoviral vectors do not prevent rapid loss of transgene expression and vector DNA from the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1452–8. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.6.1452>
  23. Sakhuja K, Reddy PS, Ganesh S, Cantaniag F, Pattison S, Limbach P, et al. Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2003;14(3):243–54. <https://doi.org/10.1089/10430340360535797>
  24. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther*. 2005;12:S18–27. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302612>
  25. Fausther-Bovendo H, Kobinger GP. Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important? *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(10):2875–84. <https://doi.org/10.4161/hv.29594>
  26. Wang X, Xing M, Zhang C, Yang Y, Chi Y, Tang X, et al. Neutralizing antibody responses to enterovirus and adenovirus in healthy adults in China. *Emerg Microbes Infect*. 2014;3(5):e30. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.30>
  27. Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison DB, Bowen RL, Israel BA, Albu JB, Augustus AS. Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29:281–6. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802830>
  28. Trinh HV, Lesage G, Chennampampil V, Vollenweider B, Burckhardt CJ, Schauer S, et al. Avidity binding of human adenovirus serotypes 3 and 7 to the membrane cofactor CD46 triggers infection. *J Virol*. 2012;86(2):1623–37. <https://doi.org/10.1128/jvi.06181-11>
  29. Cho YS, Do MH, Kwon SY, Moon C, Kim K, Lee K, et al. Efficacy of CD46-targeting chimeric Ad5/35 adenoviral gene therapy for colorectal cancers. *Oncotarget*. 2016;7:38210–23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9427>
  30. Li X, Mao Q, Wang D, Xia H. A novel Ad5/11 chimeric oncolytic adenovirus for improved glioma therapy. *Int J Oncol*. 2012;41:2159–65. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1674>
  31. Tapia MD, Sow SO, Lyke KE, Haidara FC, Diallo F, Doumbia M, et al. Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(1):31–42. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00362-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00362-x)
  32. Irons EE, Flatt JW, Doronin K, Fox TL, Acchione M, Stewart PL, Shayakhmetov DM. Coagulation factor binding orientation and dimerization may influence infectivity of adenovirus-coagulation factor complexes. *J Virol*. 2013;87(17):9610–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.01070-13>
  33. Ledgerwood JE, DeZure AD, Stanley DA, Coates EE, Novik L, Enama ME, et al. Chimpanzee adenovirus vector Ebola vaccine. *N Engl J Med*. 2017;376:928–38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1410863>
  34. Miura Y, Yamasaki S, Davydova J, Brown E, Aoki K, Vickers S, Yamamoto M. Infectivity-selective oncolytic adenovirus developed by high-throughput screening of adenovirus-formatted library. *Mol Ther*. 2013;21(1):139–48. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.205>
  35. Yamamoto Y, Nagasato M, Rin Y, Henmi M, Ino Y, Yachida S, et al. Strong antitumor efficacy of a pancreatic tumor-targeting oncolytic adenovirus for neuroendocrine tumors. *Cancer Med*. 2017;6(10):2385–97. <https://doi.org/10.1002/cam4.1185>
  36. Hausl MA, Zhang W, Mütter N, Rauschhuber C, Franck HG, Merricks EP, et al. Hyperactive sleeping beauty transposase enables persistent phenotypic correction in mice and a canine model for hemophilia B. *Mol Ther*. 2010;18(11):1896–906. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.169>
  37. Castello R, Borzone R, D'Aria S, Annunziata P, Piccolo P, Brunetti-Pierrri N. Helper-dependent adenoviral vectors for liver-directed gene therapy of primary hyperoxaluria type 1. *Gene Ther*. 2016;23:129–34. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.107>
  38. Rosewell Shaw A, Suzuki M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. *Curr Opin*

- Virology*. 2016;21:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.virology.2016.06.009>
39. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):427–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355>
40. Carter BJ. Adeno-associated virus and the development of adenoassociated virus vectors: a historical perspective. *Mol Ther*. 2004;10:981–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.09.011>
41. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol*. 2012;507:229–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386509-0.00012-0>
42. Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, Hawk SM, Flake AW, Mingozi F, High KA. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood*. 2012;119(13):3038–41. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-382317>
43. Strobel B, Duechs MJ, Schmid R, Stierstorfer BE, Bucher H, Quast K, et al. Modeling pulmonary disease pathways using recombinant adeno-associated virus 6.2. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(3):291–302. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0338MA>
44. Nathwani AC, Nienhuis AW, Davidoff AM. Our journey to successful gene therapy for hemophilia B. *Hum Gene Ther*. 2014;25(11):923–6. <https://doi.org/10.1089/hum.2014.2540>
45. Smith LJ, Ul-Hasan T, Carvaines SK, Van Vliet K, Yang E, Wong KK Jr, et al. Gene transfer properties and structural modeling of human stemcell-derived AAV. *Mol Ther*. 2014;22(9):1625–34. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.107>
46. Murphy SL, Li H, Zhou S, Schlachterman A, High KA. Prolonged susceptibility to antibody-mediated neutralization for adenoassociated vectors targeted to the liver. *Mol Ther*. 2008;16(1):138–45. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300334>
47. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis*. 2009;199(3):381–90. <https://doi.org/10.1086/595830>
48. Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther*. 2011;11(4):321–30. <https://doi.org/10.2174/156652311796150354>
49. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011;365:2357–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108046>
50. Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Pogoda JM, et al. Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure. *Gene Ther*. 2016;23(3):313–9. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.109>
51. Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, et al. In silico reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep*. 2015;12(6):1056–68. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.019>
52. Bowles DE, McPhee SW, Li C, Gray SJ, Samulski JJ, Camp AS, et al. Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV-vector. *Mol Ther*. 2012;20(2):443–55. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.237>
53. Faust SM, Bell P, Cutler BJ, Ashley SN, Zhu Y, Rabinowitz JE, Wilson JM. CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2994–3001. <https://doi.org/10.1172/jci68205>
54. Mays LE, Vandenberghe LH, Xiao R, Bell P, Nam HJ, Agbandje-McKenna M, Wilson JM. Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins. *J Immunol*. 2009;182(10):6051–60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803965>
55. Chandler RJ, Sands MS, Venditti CP. Recombinant adeno-associated viral integration and genotoxicity: insights from animal models. *Hum Gene Ther*. 2017;28(4):314–22. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.009>
56. Brandon EF, Hermsen HP, van Eijkeren JC, Tiesjema B. Effect of administration route on the biodistribution and shedding of replication-deficient AAV2: a qualitative modelling approach. *Curr Gene Ther*. 2010;10(2):91–106. <https://doi.org/10.2174/156652310791111047>
57. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol*. 2012;507:229–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386509-0.00012-0>
58. Wright JF. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies. *Gene Ther*. 2008;15(11):840–8. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.65>
59. Ertl HCJ, High KA. Impact of AAV-capsid-specific T-cell responses on design and outcome of clinical gene transfer trials with recombinant adenoassociated viral vectors: an evolving controversy. *Hum Gene Ther*. 2017;28(4):328–37. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.172>
60. Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The first approved gene therapy product for cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 years in the clinic. *Hum Gene Ther*. 2018;29(2):160–79. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>
61. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol*. 2011;29:121–8. <https://doi.org/10.1038/nbt.1769>
62. Kim S, Federman N, Gordon EM, Hall FL, Chawla SP. Rexin-G®, a tumor-targeted retrovector for malignant peripheral nerve sheath tumor: a case report. *Mol Clin Oncol*. 2017;6:861–5. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1231>
63. Wang D, Zhong L, Nahid MA, Gao G. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11(3):345–64. <https://doi.org/10.1517/1742524.7.2014.871258>

64. MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Seymour L, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet*. 2014;383(9923):1129–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62117-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62117-0)
65. Breitbach CJ, Lichty BD, Bell JC. Oncolytic viruses: therapeutics with an identity crisis. *EBioMedicine*. 2016;9:31–6. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.046>
66. Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, Parker S, Cartier N. Adeno-associated virus-based gene therapy for CNS diseases. *Hum Gene Ther*. 2016;27(7):478–96. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.087>
67. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosaes C, Chowdhury P, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371:1994–2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407309>
68. Roossinck MJ, Bazán ER. Symbiosis: viruses as intimate partners. *Annu Rev Virol*. 2017;4:123–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042323>
69. Carvalho M, Martins AP, Sepodes B. Hurdles in gene therapy regulatory approval: a retrospective analysis of European Marketing Authorization Applications. *Drug Discovery Today*. 2019;24(3):823–8. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.12.007>
70. Dabisch I, Dethling J, Dintsios CM, Drechsler M, Kalanovic D, Kaskel P, et al. Patient relevant endpoints in oncology: current issues in the context of early benefit assessment in Germany. *Health Econ. Rev*. 2014;4(1):2. <https://doi.org/10.1186/2191-1991-4-2>

**Вклад авторов.** А.А. Солдатов – разработка дизайна статьи, обработка и анализ литературных данных, написание текста рукописи; Ж.И. Авдеева – критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; Д.В. Горенков – анализ и обобщение литературных данных, доработка текста рукописи; Л.М. Хантимирова – анализ литературных данных, редактирование текста рукописи; С.Г. Гусева – сбор материала для статьи, доработка текста рукописи; В.А. Меркулов – критическое обсуждение текста рукописи.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** В.А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Authors' contributions.** A.A. Soldatov – elaboration of the study design, review and analysis of literature, writing of the text; Zh.I. Avdeeva – revision and editing of the text; D.V. Gorenkov – analysis and consolidation of literature data, follow-on revision of the text; L.M. Khantimirova – analysis of literature, editing of the text; S.G. Guseva – analysis of literature, follow-on revision of the text; V.A. Merkulov – review of the text.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Conflict of interest.** V.A. Merkulov is the Editor-in-chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

## Об авторах / Authors

**Солдатов Александр Алексеевич**, д-р мед. наук.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>  
[Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

**Авдеева Жанна Ильдаровна**, д-р мед. наук, проф.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>  
[Avdeeva@expmed.ru](mailto:Avdeeva@expmed.ru)

**Горенков Дмитрий Витальевич**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>  
[gorenkov@expmed.ru](mailto:gorenkov@expmed.ru)

**Хантимирова Лейсан Маратовна**, канд. биол. наук.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6269-0201>  
[Khantimirova@expmed.ru](mailto:Khantimirova@expmed.ru)

**Гусева Светлана Геннадиевна**. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7341-101X>

**Меркулов Вадим Анатольевич**, д-р мед. наук, проф.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>  
[merkulov@expmed.ru](mailto:merkulov@expmed.ru)

**Aleksandr A. Soldatov**, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>  
[Soldatov@expmed.ru](mailto:Soldatov@expmed.ru)

**Zhanna I. Avdeeva**, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9377-1378>  
[Avdeeva@expmed.ru](mailto:Avdeeva@expmed.ru)

**Dmitry V. Gorenkov**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>  
[gorenkov@expmed.ru](mailto:gorenkov@expmed.ru)

**Leysan M. Khantimirova**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6269-0201>  
[Khantimirova@expmed.ru](mailto:Khantimirova@expmed.ru)

**Svetlana G. Guseva**. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7341-101X>

**Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>  
[merkulov@expmed.ru](mailto:merkulov@expmed.ru)

Поступила 05.08.2021

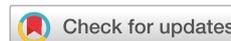
После доработки 03.02.2022

Принята к публикации 11.03.2022

Received 5 August 2021

Revised 3 February 2022

Accepted 11 March 2022



## Разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры очищенного рекомбинантного интерферона бета-1b методом пептидного картирования

Е.О. Голощапова<sup>1,✉</sup>, О.Б. Рунова<sup>1</sup>, А.С. Минеро<sup>1</sup>, О.В. Фадейкина<sup>1</sup>, Р.А. Волкова<sup>1</sup>, М.Б. Дегтерев<sup>2</sup>, С.А. Таран<sup>2</sup>, Р.Р. Шукуров<sup>2</sup>, О.Б. Устинникова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Голощапова Евгения Олеговна; [goloshapova@expmed.ru](mailto:goloshapova@expmed.ru)

### Резюме

Лекарственные препараты на основе рекомбинантных человеческих интерферонов (рЧИФН) бета-1а и бета-1b применяют в качестве препаратов первой линии при лечении рассеянного склероза. При этом рЧИФН бета-1а и бета-1b имеют структурные отличия, обусловленные использованием эукариотической или прокариотической системы экспрессии соответственно. Согласно международным фармакопейным требованиям необходима оценка подлинности первичной структуры рекомбинантного белка методом пептидного картирования, который предполагает использование стандартного образца сравнения. Международный стандартный образец рЧИФН бета-1b для оценки подлинности отсутствует. **Цель работы:** разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности очищенного рекомбинантного рЧИФН бета-1b методом пептидного картирования. **Материалы и методы:** рЧИФН бета-1b производства АО «ГЕНЕРИУМ»; эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8. Исследование проводили методом пептидного картирования с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) и метода масс-спектрометрии высокого разрешения. Результаты оценивали с применением статистических методов расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации. **Результаты:** разработан и аттестован стандартный образец Государственной фармакопеи Российской Федерации для подтверждения подлинности рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447). Аттестованная характеристика представлена в виде диапазонов времен удерживания характеристических пиков: абсолютное время удерживания третьего (референтного) пика составило 42,0–43,2 мин, относительное время удерживания первого пика – 0,61–0,66, второго пика – 0,68–0,73, четвертого пика – 1,04–1,06, пятого пика – 1,14–1,15, шестого пика – 1,22–1,24, седьмого пика – 1,29–1,30. **Выводы:** разработаны требования к ФСО рЧИФН бета-1b, в качестве кандидата в стандартный образец выбран полупродукт рЧИФН бета-1b, отобранный на стадии до добавления человеческого сывороточного альбумина; проведен контроль качества в соответствии с разработанной спецификацией и проанализирована аминокислотная последовательность молекулы с подтверждением наличия дисульфидной связи; получена аттестованная характеристика ФСО; сравнительный анализ пептидных карт разработанного и аттестованного ФСО

рЧИФН бета-1b и стандартного образца (CRS) рЧИФН бета-1a показал различие данных пептидных карт и, следовательно, необходимость применения разработанного ФСО.

---

**Ключевые слова:** рекомбинантный интерферон бета-1b; подлинность; пептидное картирование; высокоэффективная жидкостная хроматография; масс-спектрометрия; фармакопейный стандартный образец (ФСО)

**Для цитирования:** Голощাপова Е.О., Рунова О.Б., Минеро А.С., Фадейкина О.В., Волкова Р.А., Дегтерев М.Б., Таран С.А., Шукуров Р.Р., Устинникова О.Б. Разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры очищенного рекомбинантного интерферона бета-1b методом пептидного картирования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):23–37. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-23-37>

---

## Development and certification of a pharmacopoeial reference standard for primary structure identification of purified recombinant interferon beta-1b by peptide mapping

E.O. Goloshchapova<sup>1</sup>✉, O.B. Rounova<sup>1</sup>, A.S. Minero<sup>1</sup>, O.V. Fadeikina<sup>1</sup>, R.A. Volkova<sup>1</sup>, M.B. Degterev<sup>2</sup>, S.A. Taran<sup>2</sup>, R.R. Shukurov<sup>2</sup>, O.B. Ustinnikova<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Generium JSC, 14 Vladimirsкая St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Evgenia O. Goloshchapova; [goloshapova@expmed.ru](mailto:goloshapova@expmed.ru)

---

### Abstract

Medicines based on recombinant human interferons (rhIFNs) beta-1a and beta-1b are used as first-line treatment of multiple sclerosis. Meanwhile, rhIFN beta-1a and beta-1b have structural differences associated with the eukaryotic or prokaryotic expression systems, respectively. Pharmacopoeias require identification of the primary structure of recombinant proteins by peptide mapping, which involves the use of reference material. Currently, there is no international reference standard available for rhIFN beta-1b structural identification. **The aim of the study** was development and certification of a pharmacopoeial reference standard for identification of the amino acid sequence of purified rhIFN beta-1b by peptide mapping. **Materials and methods:** rhIFN beta-1b produced by GENERIUM and endoproteinase Glu-C from *Staphylococcus aureus* V8 were used in the study. The peptide mapping was performed using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC) and high-resolution mass spectrometry. Statistical evaluation of the results included calculation of the arithmetic mean, standard deviation, and coefficient of variation. **Results:** the authors developed and certified a Russian Pharmacopoeia reference standard for structural identification of rhIFN beta-1b (PhRS 3.2.00447). The certified characteristic is the range of retention times of characteristic peaks: the absolute retention time was 42.0–43.2 for the third (reference) peak, the relative retention time was 0.61–0.66 for the first peak, 0.68–0.73 for the second peak, 1.04–1.06 for the fourth peak, 1.14–1.15 for the fifth peak, 1.22–1.24 for the sixth peak, and 1.29–1.30 for the seventh peak. **Conclusions:** the authors developed requirements for the rhIFN beta-1b pharmacopoeial reference standard. The material chosen as the candidate reference standard was an intermediate rhIFN beta-1b product sampled before addition of human serum albumin. The quality control was carried out in accordance with the developed specification. The authors analysed the amino acid sequence

of the molecule, confirmed the presence of the disulfide bond, and obtained the certified characteristic of the reference standard. Comparative analysis of the peptide maps of the certified rhIFN beta-1b pharmacopoeial reference standard and the rhIFN beta-1a reference standard revealed differences between the maps, and, therefore, confirmed the relevance of the developed reference standard.

**Key words:** recombinant interferon beta-1b; identification; peptide mapping; high performance liquid chromatography; mass spectrometry; pharmacopoeial reference standard (PhRS)

**For citation:** Goloshchapova E.O., Rounova O.B., Minero A.S., Fadeikina O.V., Volkova R.A., Degterev M.B., Taran S.A., Shukurov R.R., Ustinnikova O.B. Development and certification of a pharmacopoeial reference standard for primary structure identification of purified recombinant interferon beta-1b by peptide mapping. *BIОpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):23–37. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-23-37>

## Введение

Лекарственные препараты на основе рекомбинантных человеческих интерферонов (рЧИФН) бета-1а и бета-1b применяют в качестве препаратов первой линии при лечении рассеянного склероза. При этом рЧИФН бета-1а и бета-1b имеют существенные структурные отличия, обусловленные использованием эукариотической или прокариотической системы экспрессии соответственно [1, 2].

рЧИФН бета-1а представляет собой гликопротеин, идентичный по аминокислотной последовательности ИФН бета человека. В качестве продуцента рЧИФН бета-1а используют эукариотическую клеточную культуру яичника китайского хомячка СНО (Chinese hamster ovary). рЧИФН бета-1b представляет собой негликозилированный белок, в качестве продуцента которого используют бактериальную клеточную культуру *Escherichia coli*. Молекулы рЧИФН бета-1а и рЧИФН бета-1b состоят из 166 и 165 аминокислотных остатков соответственно, при этом в молекуле рЧИФН бета-1b отсутствует N-концевой метионин, а остаток цистеина в позиции 16 заменен на серин [1].

Указанные структурные особенности вариантов интерферона бета человека при сохранении общих биологических свойств лежат в основе их различий по удельной активности, характеру побочных действий, способности к индукции нейтрализующих антител (иммуногенности), схемам и способам введения лекарственных препаратов на основе терапевтических белков рЧИФН бета-1а и рЧИФН бета-1b [3].

В литературе встречаются сведения о клинических исследованиях, позволяющих сделать вывод о возможности замены препаратов рЧИФН бета-1а на рЧИФН бета-1b, однако такую воз-

можность не следует рассматривать как полную взаимозаменяемость данных подтипов интерферонов. Выбор гликозилированной или негликозилированной формы в каждом конкретном случае зависит от множества факторов, в том числе от индивидуальных особенностей пациента [4–7].

Одним из наиболее значимых этапов подтверждения качества рЧИФН бета является оценка подлинности его структуры с помощью комплекса методов, важнейшим из которых является пептидное картирование (ВЭЖХ). Данный метод предполагает использование стандартного образца сравнения.

Методика пептидного картирования, изложенная в монографии 01/2009:1639 Европейской фармакопеи, а также стандартный образец CRS (Chemical Reference Substance) предназначены для рЧИФН бета-1а. При этом методика предусматривает использование эндопротеазы LysC с рабочей областью около рН 9,0, что неприемлемо для рЧИФН бета-1b, поскольку данный белок нестабилен в нейтральной и щелочной среде. Монография в Европейской фармакопее и соответствующий стандартный образец рЧИФН бета-1b для подтверждения подлинности первичной структуры отсутствуют. Ранее нами была разработана методика пептидного картирования для рЧИФН бета-1b, учитывающая стабильность белка при кислых значениях рН [8, 9].

Цель работы – разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца (ФСО) для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности очищенного рЧИФН бета-1b методом пептидного картирования. Задачи исследования: разработать требования к кандидату в ФСО для подтверждения подлинности структуры рЧИФН бета-1b и процедуре его аттестации; осуществить выбор кандидата в ФСО; разработать спецификацию и оценить

качество кандидата в стандартный образец; установить аттестованную характеристику ФСО; провести сравнительный анализ пептидных карт аттестованного ФСО рЧИФН бета-1b и CRS рЧИФН бета-1a.

## Материалы и методы

### Материалы:

- исследуемый образец – кандидат в ФСО рЧИФН бета-1b производства АО «ГЕНЕРИУМ»;
- стандарт рЧИФН бета-1a (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), CRS, кат. № Y0001101, серия 3);
- эндопротеиназа Glu-C (*Staphylococcus aureus* V8 proteinase, Sigma-Aldrich, кат. № P2922; 500–1000 U/mg);
- гуанидина гидрохлорид (Sigma-Aldrich);
- дитиотреитол (Sigma-Aldrich);
- уксусная кислота (Sigma-Aldrich);
- ацетат натрия (Sigma-Aldrich);
- центрифужные фильтры Amicon Ultra (Merck Millipore, кат. № UFC501024, объем 0,5 мл, Ultracel-10K);
- ферменты для мультиферментного протеолиза при определении аминокислотной последовательности кандидата в ФСО: протеаза Asp-N (Promega, кат. № VA1160), пепсин (Promega, кат. № V1959), протеаза Glu-C (Promega, кат. № V1651), протеаза Lys-C (Promega, кат. № VA1050), иммобилизованный трипсин (Thermo Fisher Scientific, кат. № 60109-101-B).

### Оборудование:

жидкостные хроматографы Agilent Technologies Infinity 1260 (Agilent Technologies, США); Waters Alliance e2695 (Waters, США); Waters Acquity (Waters, США); Shimadzu Nexera X2 (Shimadzu Corporation, Япония).

### Методы

**Метод пептидного картирования с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ).**

Растворы:

- ацетатный буферный раствор (рН 4,50–4,57);
- подвижная фаза А: доводят 1 мл трифторуксусной кислоты до 1000 мл водой;
- подвижная фаза В: к 1 мл трифторуксусной кислоты прибавляют воду до 100 мл и доводят объем до 1000 мл ацетонитрилом.

Процедура.

Кандидат в ФСО растворяли в воде для получения раствора с концентрацией около 0,6 мг/мл. Далее проводили гидролиз: 50 мкл кандидата в ФСО помещали в пробирку, добавляли 3 мкл раствора эндопротеиназы Glu-C и 20 мкл ацетатного буферного раствора, перемешивали и помещали в термостат при температуре 37 °С. Через 18 ч добавляли 0,2 мл 6 М раствора гуанидина гидрохлорида, перемешивали и прибавляли 0,007 мл 2 М раствора дитиотреитола. Перемешивали и помещали пробирку в термостат при температуре 100 °С на 1 минуту и затем охлаждали до температуры 2–8 °С. Образцы, полученные в результате гидролиза, использовали при проведении хроматографического разделения.

Условия хроматографического разделения: скорость потока – 1 мл/мин; температура колонки – 30±1 °С; детектор – УФ-детектор, длина волны 214 нм; объем пробы – 100 мкл.

Хроматографирование проводили с использованием хроматографической колонки YMC-Pack ODS-A (100×4,6 мм, октадецилсилил (C18) модифицированный силикагель с диаметром частиц 5 мкм, размер пор 300 Å, YMC, Япония) при температуре 30 °С с применением спектрофотометрического детектора (длина волны 214 нм) и градиентного режима с использованием двух подвижных фаз: подвижная фаза 1: 0,1% трифторуксусная кислота в воде; подвижная фаза 2: 0,1% трифторуксусная кислота в смеси ацетонитрил–вода, 9:1 при скорости потока 1 мл/мин [8] с применением хроматографов Agilent Technologies Infinity 1260, Waters Alliance e2695, Shimadzu Nexera X2 и Waters Acquity.

**Метод масс-спектрометрии высокого разрешения для анализа первичной структуры ФСО.** Анализ первичной структуры молекулы

Таблица 1. Программа градиента  
Table 1. Gradient programme

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза А, %, об./об. <i>Mobile phase A, %, v/v</i>	Подвижная фаза В, %, об./об. <i>Mobile phase B, %, v/v</i>
0→8	100	0
8→68	100→40	0→60
68→72	40	60
72→75	40→100	60→0
75→80	100	0

рЧИФН бета-1b с проведением параллельного гидролиза целевого белка пятью протеазами с различной специфичностью и последующим хроматомасс-спектрометрическим анализом полученных гидролизатов осуществляли в системе ВЭЖХ Infinity 1260 Capillary LC System (Agilent Technologies, США) с масс-спектрометрическим детектором QTOF 6550 (Agilent Technologies, США).

Ферментативный гидролиз белка рЧИФН бета-1b для анализа первичной структуры проводили в следующих условиях:

- Пепсин. К раствору, содержащему 50 мкг белка, добавляли 2,5 мкл 1 н раствора HCl и 1 мкл раствора пепсина (1,0 мг/мл). Инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 ч. Реакцию останавливали нагревом смеси до 95 °С в течение 10 мин.
- Имобилизованный трипсин. К 150 мкл коммерческого реакционного буфера из состава набора SMART Digest Kit прибавляли 15 мкл суспензии имобилизованного трипсина и 50 мкл раствора белка (1,0 мг/мл). Инкубировали при температуре 70 °С и интенсивном встряхивании (1400 об/мин) в течение 1 ч. Реакцию останавливали охлаждением образца до комнатной температуры; образец центрифугировали (12 000 г, 15 мин) и отбирали супернатант для анализа.
- Asp-N. К раствору, содержащему 25 мкг белка, добавляли 2,1 мкл 6 М раствора гуанидин-гидрохлорида, 0,5 мкг Asp-N (0,2 мг/мл) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 ч.
- Эндопроотеиназа Glu-C. К раствору, содержащему 25 мкг белка, добавляли 0,7 мкл 6 М раствора гуанидин-гидрохлорида, 0,5 мкг Glu-C (0,4 мг/мл) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 ч.
- Эндопроотеиназа Lys-C. К 25 мкл раствора белка (2,0 мг/мл) прибавляли 40 мкл раствора AccuMAP Denaturing Solution (Promega), 12 мкл буфера (AccuMAP 10X Low pH Reaction Buffer, Promega), 15 мкл воды и 25 мкл раствора Lys-C. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего добавляли 20 мкл буфера (AccuMAP 10X Low pH Reaction Buffer), 155 мкл воды и 25 мкл раствора Lys-C. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 3 ч. Реакцию останавливали добавлением 6,4 мкл трифторуксусной кислоты.

Разделение пептидов проходило в нанопотоковом режиме на устройстве ProtiD-Chip-43 (Agilent Technologies, США) с использованием следующих фаз: фаза А – 0,1% муравьиная кислота в 50 мМ формиате аммония; фаза Б – смесь фазы А с ацетонитрилом, 1:9; элю-

ирование пептидов проводили в режиме линейного градиента (1–48% фазы Б за 52 мин); регистрацию сигналов – в режиме положительной ионизации и дата-зависимого тандемного сканирования. Для анализа результатов использовали программное обеспечение Peaks AB v.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc.) со следующими условиями: максимальное значение допуска на расхождение между теоретической и экспериментальной массой пептида – 12 ppm для масс-спектров в режиме фронтального сканирования и 0,02 Да для масс-спектров в режиме тандемного сканирования. При соотношении регистрируемых масс пептидов с теоретическими значениями учитывались химические (аддукты с ионами натрия, формилирование, отщепление аммония или воды) и посттрансляционные (отщепление N-концевого метионина, окисление остатков метионина, триптофана и гистидина, дезамидирование остатков аспарагина или глутамина) модификации.

Для подтверждения первичной структуры белка использовали следующую аминокислотную последовательность рЧИФН бета-1b: MS YNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRM NFDIPEEIKLQQLQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQD SSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEK EDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAW TIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN.

**Метод масс-спектрометрии высокого разрешения для анализа аминокислотной последовательности пептидов, получаемых в результате пептидного картирования ФСО.** Анализ проводили с хроматомасс-спектрометрической идентификацией целевых пептидных фрагментов в каждой фракции элюата в системе ВЭЖХ Nexera X2 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором Q Exactive HF Biopharma (Thermo Scientific). В качестве образцов использовали 8 фракций объемом 100–200 мкл, полученных в результате гидролиза и последующего хроматографического разделения кандидата в ФСО. Состав фракции: 0,5–1 мкг пептида в подвижной фазе. Условия гидролиза и хроматографического разделения ФСО описаны выше. Разделение пептидов проходило на колонке Acquity UPLC® Peptide CSH C18 (2,1×100 мм, Waters, США) использованием подвижных фаз: фаза А – 0,1% муравьиная кислота в воде; фаза Б – 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле; элюирование проводили в режиме линейного градиента (3–40% фазы Б за 6,5 мин), регистрацию сигналов – в режиме положительной ионизации и дата-зависимого тандемного сканирования. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение Biopharma Finder v.3.2 (Thermo

Scientific) и Peaks AB v.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc.). При соотнесении регистрируемых масс пептидов с теоретическими значениями учитывались химические (аддукты с ионами натрия, формилирование, отщепление аммония или воды) и посттрансляционные (неотщепление N-концевого метионина, окисление остатков метионина, триптофана и гистидина, дезамидирование остатков аспарагина или глутамина) модификации.

#### **Статистическая обработка результатов.**

Для оценки результатов использовали статистические методы анализа с вычислением среднего арифметического  $X_{cp}$  по формуле (1) и среднеквадратичного отклонения  $S$  по формуле (2):

$$X_{cp} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad (1)$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - X_{cp})^2} \quad (2)$$

### **Результаты и обсуждение**

На основании теоретического анализа предполагаемых условий применения были разработаны требования к кандидату ФСО для подтверждения подлинности структуры рЧИФН бета-1b:

- отсутствие вспомогательных веществ белковой или иной природы, потенциально влияющих на профиль пептидной карты;
- стабильность раствора;
- соответствие требованиям спецификации на субстанцию за исключением показателей, изменяемых направленно (например, формы выпуска, pH и т. д.);
- соответствие не менее 95% аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным.

Разработаны требования к процедуре аттестации:

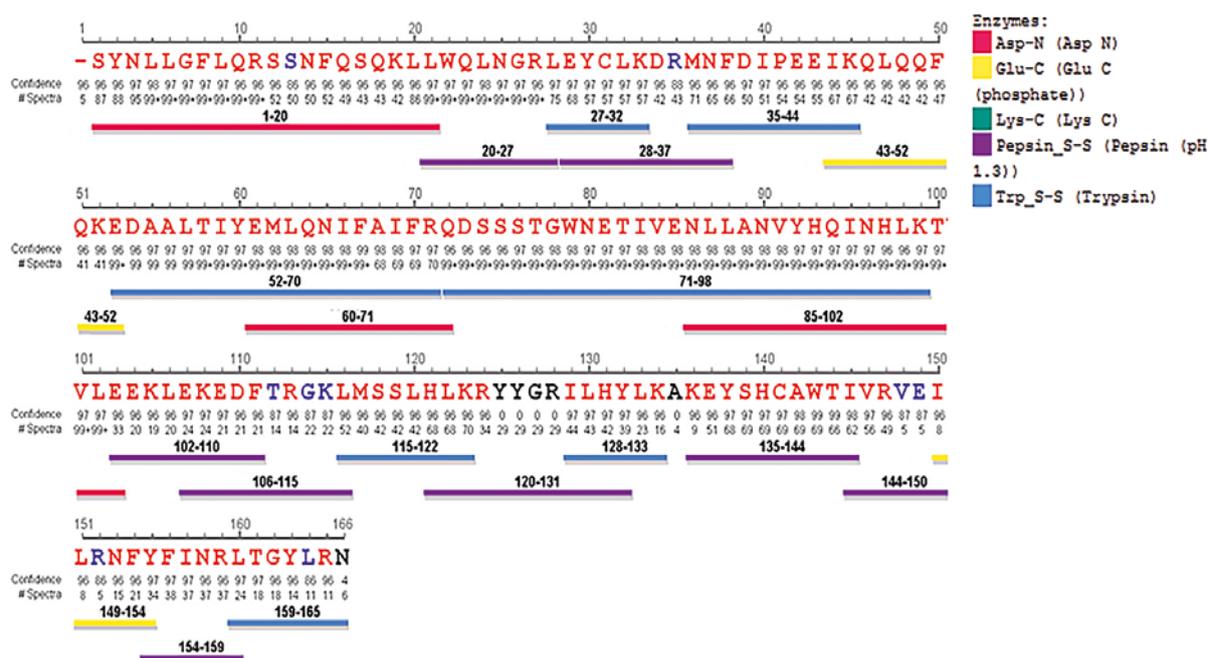
- наличие методики пептидного картирования, обладающей достаточной специфичностью для выявления значимых структурных отличий молекулы рЧИФН бета-1b;
- анализ аминокислотной последовательности основных пептидов с оценкой покрытия теоретической последовательности молекулы рЧИФН бета-1b;
- установление диапазонов времен удерживания основных (характеристических) пиков на основании результатов, полученных в условиях воспроизводимости.

В качестве материала для получения кандидата в ФСО был выбран полупродукт рЧИФН бета-1b производства АО «ГЕНЕРИУМ», отобранный на финальной стадии очистки белка до добавления стабилизатора – человеческого

сывороточного альбумина (ЧСА). Для обеспечения стабильности молекулы рЧИФН бета-1b без белкового стабилизатора полупродукт быстро разбавляли в глициновом буфере (pH 3,0), содержащем трегалозу (50 мг/мл) и полисорбат 80 (0,05 мг/мл). Водородный показатель довели 2 М раствором хлористоводородной кислоты до значения pH 3,0–3,5, конечное содержание белка до 0,25 мг/мл. Полученный раствор разливали по 1 мл во флаконы формата 2R из стекла I гидролитического класса (ООО «ШОТТ Фармасьютикал Пэккэджинг», Россия), прикрывали бромбутиловыми пробками и лиофилизировали в камере лиофильной установки (Labconco, США) в следующих условиях – флаконы замораживали в морозильнике при температуре минус 70 °С в течение 8 ч, затем проводили первичную сушку в течение 24 ч при температуре плиты сублиматора 30 °С, вакууме от 7 до 10 Па и скорости повышения температуры около 2 °С/ч, досушивание (вторичную сушку) проводили в течение 4 ч до конечной температуры продукта 25 °С. Лиофилизированные образцы после высушивания имели вид хорошо сформированной таблетки белого цвета, плотно прилегающей к стеклу.

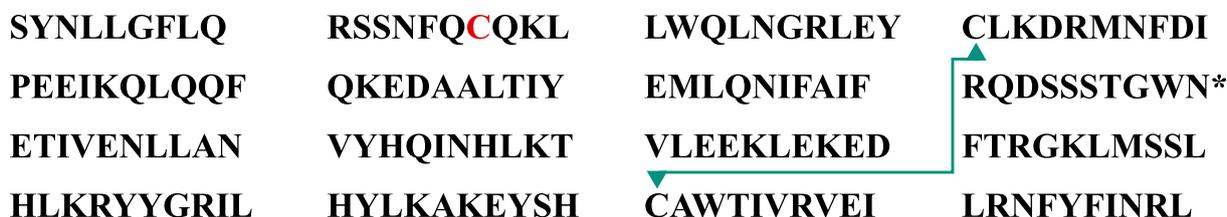
В качестве основы для оценки качества кандидата в ФСО была использована нормативная документация на Интерферон бета-1b субстанцию-раствор (замороженный) ФС 001677-290818, при этом номенклатура показателей спецификации и нормы были частично изменены: норма по показателю «Описание» – в связи с заменой замороженной формы на лиофилизированную; норма по показателю «pH» – в связи с изменением диапазона; исключен показатель «Аномальная токсичность»; показатель «Стерильность» заменен на показатель «Микробиологическая чистота», поскольку кандидат в ФСО не является препаратом для введения людям; исключены показатели «Общий белок» и «Вирусная безопасность» в связи с отсутствием ЧСА. Кандидату в ФСО было присвоено наименование «Лиофилизат интерферона бета-1b без добавок белковой природы»; разработана Спецификация № ОКК-СПЦ-710-01, включающая оценку 18 показателей, и оценено соответствие кандидата в ФСО по данной спецификации, в частности по показателям:

- хроматографической чистоты (количество олигомеров и фрагментов молекул составило 1% при норме не более 5%);
- родственных примесей (количество дезамидированных форм составило 6% при норме не более 8%);
- специфической активности рЧИФН бета-1b



**Рис. 1.** Ключевые характеристические пептиды аминокислотной последовательности кандидата в фармакопейный стандартный образец интерферона бета-1b, идентифицированные по результатам хроматомасс-спектрометрического анализа продуктов гидролиза белка протеазами с различной специфичностью. В легенде сверху расположение цветных отрезков соответствует положению пептидов в аминокислотной цепи. В легенде справа цветами обозначены примененные протеазы (Asp-N, Glu-C, Arg-C, Lys-C, пепсин, трипсин).

**Fig. 1.** Key characteristic peptides of the amino acid sequence of the candidate interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard, identified by chromato-mass spectrometric analysis of protein hydrolysis products by proteases with different specificity. In the legend above, the location of the coloured segments corresponds to the position of the peptides in the amino acid chain. In the legend on the right, the proteases used (Asp-N, Glu-C, Arg-C, Lys-C, pepsin, trypsin) are marked with colours.

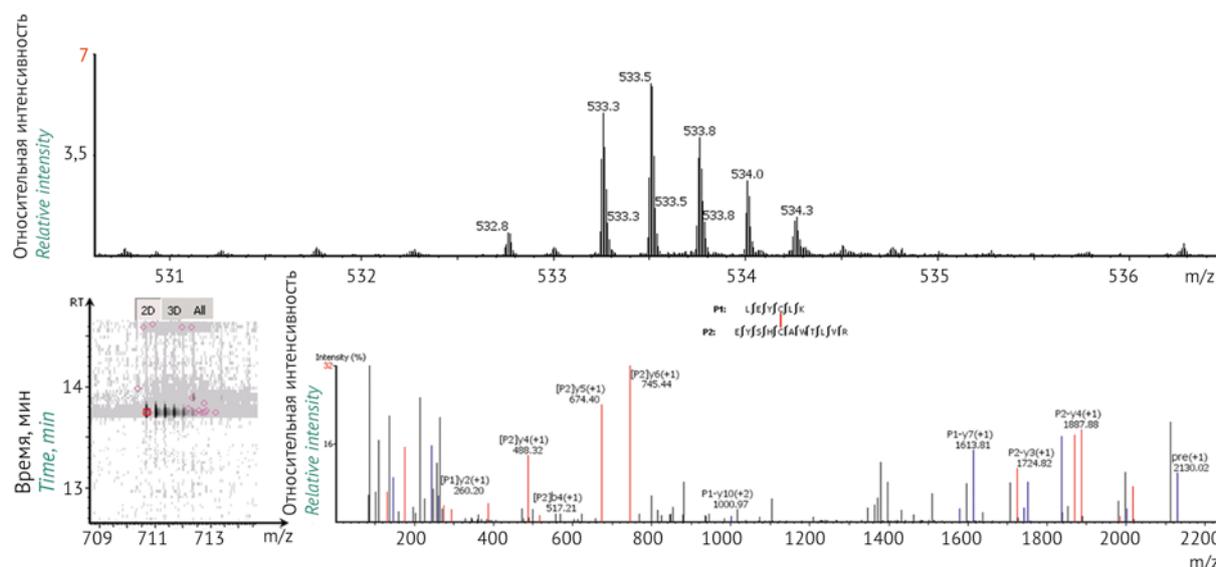


**Рис. 2.** Аминокислотная последовательность интерферона бета-1b. Стрелкой отмечена дисульфидная связь (Cys30–Cys140).

**Fig. 2.** Amino acid sequence of interferon beta-1b. The disulfide bond (Cys30–Cys140) is indicated by the arrow.

(8,2 млн МЕ/мл при норме не менее 4 млн МЕ/мл);  
 – количества рЧИФН бета-1b (0,24 мг/мл при норме от 0,22 до 0,28 мг/мл);  
 – количества остаточных белков штамма-производителя и количество остаточной ДНК штамма-производителя (3,1 нг/мг ИФН бета-1b и 1,78 пг/мг рЧИФН бета-1b соответственно).  
 Также была проведена оценка первичной структуры молекулы с применением мультферментного протеолиза целевого белка с последующим хроматомасс-спектрометрическим анализом полученных гидролизатов.  
 Оценка показала полное совпадение ожидаемой аминокислотной последовательности кан-

дидата в ФСО с известной последовательностью рЧИФН бета-1b (рис. 1 и 2) [1]. Суммарная доля идентифицированной части аминокислотной последовательности составила 100%. Было подтверждено наличие дисульфидной связи между цистеинами, находящимися в положениях 30 и 140 (рис. 3).  
 Далее для аттестации ФСО рЧИФН бета-1b применяли методику пептидного картирования, разработанную на предыдущем этапе работы [8]. Анализ профилей пептидных карт кандидата в ФСО, полученных в процессе валидации вышеуказанной методики, позволил выбрать 7 характеристических пиков, отличающихся достаточной интенсивностью и стабильным



**Рис. 3.** Хроматомасс-спектрометрические свойства пептида аминокислотной последовательности ИФН бета-1b (положения 27–32 – 136–146), содержащего в своем составе дисульфидную связь между цистеинами, находящимися в положениях 30 и 140. Сверху – масс-спектр четырехзарядного иона пептида; слева внизу – двумерная масс-хроматограмма трехзарядного иона пептида; справа внизу – его тандемный масс-спектр.

**Fig. 3.** Chromatomass spectrometric properties of the disulfide-containing peptide from positions 27–32 to 136–146 with bond location Cys30–Cys140. Top—mass spectrum of a four-charged peptide ion; bottom left—two-dimensional mass chromatogram of a triple-charged peptide ion; bottom right—its tandem mass spectrum.

временем удерживания. Пик под номером 3 как наиболее стабильный был выбран в качестве основного пика с абсолютным временем удерживания около 42,5 минуты, остальные 6 пиков – характеристическими пиками с относительными временами удерживания (рис. 4).

На основании двадцати результатов, полученных в условиях воспроизводимости в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 (работу выполнили четыре специалиста в двух лабораториях с использованием четырех хроматографов), были рассчитаны диапазоны абсолютного и относительных времен удерживания характеристических пиков (табл. 2), представляющих собой аттестованную характеристику ФСО, и разработана сопроводительная документация – паспорт и инструкция по применению ФСО 3.2.00447.

Диапазон абсолютного времени удерживания пика 3 рассчитывали как среднее значение времени удерживания  $X_{cp3} \pm 3S$ , где  $S$  – среднеквадратичное отклонение при  $n = 20$ . Диапазон относительных времен удерживания пиков 1, 2, 4, 5, 6, 7 рассчитывали как средние значения времен удерживания  $X_{cp1(2,4,5,6,7)} \pm 2S$ , где  $S$  – среднеквадратичное отклонение при  $n = 20$  [10].

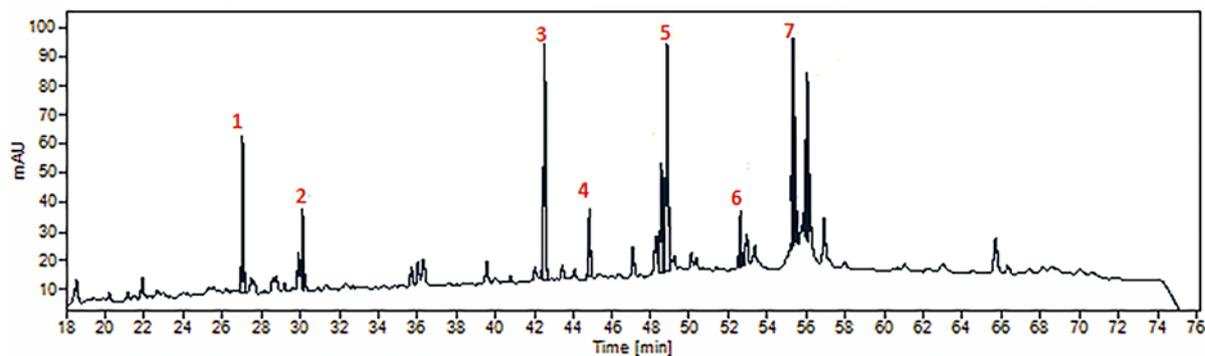
Для подтверждения, что пептиды, соответствующие выбранному характеристическим пикам, содержат наиболее значимые

фрагменты молекулы рЧИФН бета-1b, было проведено исследование их аминокислотной последовательности. Для этого был проведен препаративный отбор фракций соответствующих пиков и их последующее исследование методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения (табл. 3) [11–13].

В результате исследования было выявлено, что суммарно данные пептиды составляют 77% аминокислотной последовательности ФСО рЧИФН бета-1b. При этом наиболее информативным для оценки структуры рЧИФН бета-1b является пик № 6, поскольку именно данный пептид содержит серин вместо цистеина в позиции 16 и не содержит N-концевой метионин, что является основным структурным отличием белковой части молекулы рЧИФН бета-1b от рЧИФН бета-1a.

В ходе работы также проведен сравнительный анализ пептидных карт ФСО (рЧИФН бета-1b) и CRS (рЧИФН бета-1a) (рис. 5 и 6, табл. 4).

Времена удерживания характеристических пиков ФСО рЧИФН бета-1b в целом совпадают с временами удерживания характеристических пиков стандартного образца рЧИФН бета-1a (стандарта CRS). Исключение составляет пик 6, содержащий N-концевой фрагмент молекулы (с 1-го по 42-й аминокислотный остаток) и характеризующийся наличием метионина для стан-



**Рис. 4.** Типичная пептидная карта кандидата в фармакопейный стандартный образец интерферона бета-1b. Ось X – время, мин; ось Y – оптическая плотность.

**Fig. 4.** A typical peptide map of the candidate material for interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard. X axis–time, min; Y axis–optical density.

дарту CRS и его отсутствием для ФСО, а также заменой аминокислоты в 16 (17) позиции, что подтверждается данными масс-спектрометрического анализа (табл. 2). Также наблюдается отличие профилей пептидных карт в диапазоне 54,5–58,0 мин. При этом на хроматограмме рЧИФН бета-1а наблюдается значительное количество негидролизованного белка (кластерные пики в диапазоне 64–69 мин), что предположительно может быть результатом более слабого гидролиза молекулы стандарта CRS, вызванного присутствием гликанов.

Сравнительный анализ хроматограмм рЧИФН бета-1а (стандарта CRS) и рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447), полученных в условиях пептидного картирования (пригодных для менее стабильного белка – рЧИФН бета-1b), а также результаты масс-спектрометрического анализа пептидов подтвердили необходимость использования ФСО рЧИФН бета-1b в качестве образца сравнения, так как пептидные карты данных белков различаются.

## Выводы

Разработаны требования к ФСО рЧИФН бета-1b, а именно:

- отсутствие вспомогательных веществ белковой или иной природы, потенциально влияющих на профиль пептидной карты;
- стабильность раствора стандартного образца;
- соответствие требованиям спецификации на субстанцию за исключением показателей, изменяемых направленно (например, формы выпуска, pH и т. д.).

Показано соответствие аминокислотной последовательности молекулы рЧИФН бета-1b теоретическим данным (более 95%). В качестве кандидата в ФСО рЧИФН бета-1b выбран полупродукт рЧИФН бета-1b, отобранный на финальной стадии очистки до добавления ЧСА, проведен контроль качества в соответствии с разработанной спецификацией и проанализирована аминокислотная последовательность молекулы с подтверждением наличия дисульфидной связи.

**Таблица 2.** Аттестованная характеристика фармакопейного стандартного образца интерферона бета-1b  
**Table 2.** Certified characteristic of interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard

Пик <i>Peak</i>	Абсолютное время удерживания, мин <i>Absolute retention time, min</i>	Относительное время удерживания, диапазон <i>Relative retention time, range</i>
1	–	0,61–0,66
2	–	0,67–0,73
3	42,0–43,2	–
4	–	1,04–1,06
5	–	1,14–1,15
6	–	1,22–1,24
7	–	1,29–1,30

**Таблица 3.** Результаты исследования аминокислотной последовательности пептидов интерферона бета-1b, соответствующих характеристическим пикам, методом масс-спектрометрии  
**Table 3.** Results of mass spectrometric analysis of the amino acid sequences of interferon beta-1b peptides corresponding to the characteristic peaks

Пептид <i>Peptide</i>	Положение в цепи <i>Location in the chain</i>	Измеренная мономерная молекулярная масса. Да <i>Measured monoisotopic molecular weight, Da</i>	Тандемный масс-спектр <i>Tandem mass spectrum</i>
1	43–52	1288,71	<p style="text-align: center;">IKQLQQFQKE</p>
2	53–60	894,43	<p style="text-align: center;">DAALTYE</p>
3	109–136	3422,88	<p style="text-align: center;">DFTRGKLMSSLHLKRYGRILHYLKAKE</p>

Продолжение таблицы 3  
 Table 3 (continued)

Пептид <i>Peptide</i>	Положение в цепи <i>Location in the chain</i>	Измеренная мономерная масса, Да <i>Measured monoisotopic molecular weight, Da</i>	Тандемный масс-спектр <i>Tandem mass spectrum</i>
4	149–165	2172,20	<p>ILRNFYFINRLTGylRN</p>
5	85–102	2118,16	<p>NLLANVYHQINHLKTVLE</p>
6	1–42	5092,53	<p>SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEE</p>

Пептид <i>Peptide</i>	Положение в цепи <i>Location in the chain</i>	Измеренная мономерная молекулярная масса, Да <i>Measured monoisotopic molecular weight, Da</i>	Тандемный масс-спектр <i>Tandem mass spectrum</i>
7	81–102	2560,40	<p>TIVENLLANVYHQINHLKTVLE</p>

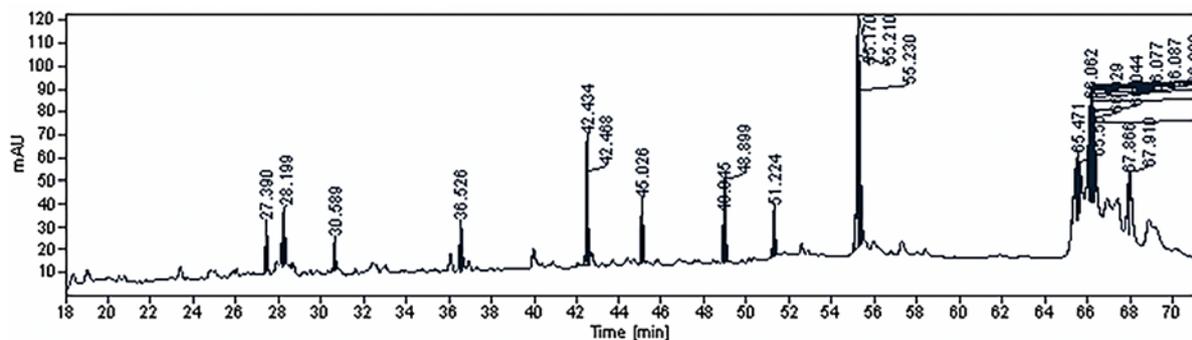


Рис. 5. Пептидная карта интерферона бета-1а CRS. Ось X – время, мин; ось Y – оптическая плотность.

Fig. 5. Peptide map of the interferon beta-1a CRS. X axis–time, min; Y axis–optical density.

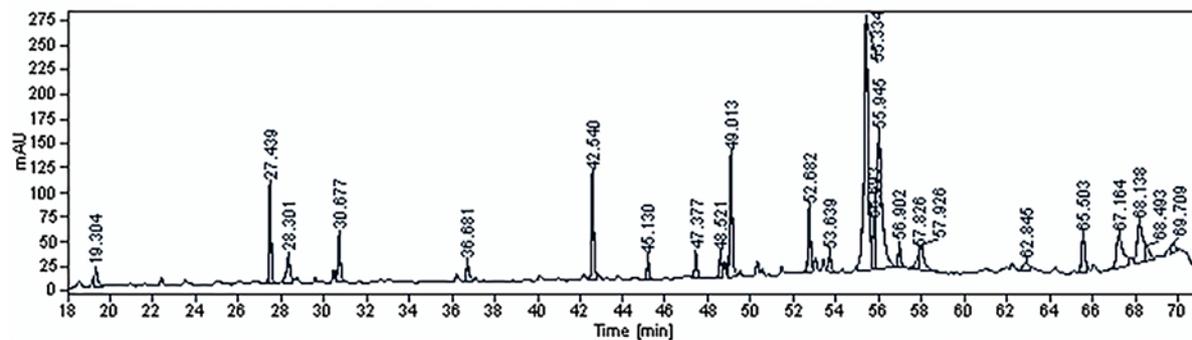


Рис. 6. Пептидная карта фармакопейного стандартного образца интерферона бета-1b. Ось X – время, мин; ось Y – оптическая плотность.

Fig. 6. Peptide map of the interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard. X axis–time, min; Y axis–optical density.

**Таблица 4.** Времена удерживания характеристических пиков фармакопейного стандартного образца бета-1b и интерферона бета-1a CRS

**Table 4.** Characteristic peak retention times of the interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard and interferon beta-1a CRS

Пик <i>Peak</i>	Время удерживания характеристических пиков, мин <i>Peak retention time, min</i>	
	интерферон бета-1a CRS <i>interferon beta-1a CRS</i>	фармакопейный стандартный образец интерферона бета-1b <i>interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard</i>
1	27,390	27,439
2	30,589	30,677
3	42,434	42,540
4	45,026	45,130
5	48,899	49,013
6	51,224	52,682
7	55,170	55,334

Установлена аттестованная характеристика ФСО рЧИФН бета-1b в виде диапазонов абсолютного и относительных времен удерживания характеристических пиков: абсолютное время удерживания третьего пика составило 42,0–43,2 мин, относительное время удерживания первого пика – 0,61–0,66, второго пика – 0,68–0,73, четвертого

пика – 1,04–1,06, пятого пика – 1,14–1,15, шестого пика – 1,22–1,24, седьмого пика – 1,29–1,30.

Сравнительный анализ пептидных карт разработанного ФСО рЧИФН бета-1b и CRS рЧИФН бета-1a показал различие данных пептидных карт и, следовательно, необходимость применения разработанного ФСО.

## Литература/References

1. Бобрускин АИ, Кононова НВ, Мартянов ВА, Шустер АМ. Промышленный способ получения и очистки рекомбинантного интерферона бета-1b человека из телец включения. Патент Российской Федерации № 2473696; 2013. [Bobruskin AI, Kononova NV, Martianov VA, Shuster AM. Industrial method for production and purification of recombinant human interferon beta-1b from inclusion bodies. Patent of the Russian Federation No. 2473696; 2013 (In Russ.)]
2. Orru S, Amoresano A, Siciliano R, Napoleoni R, Finocchiaro O, Datola A, et al. Structural analysis of modified forms of recombinant IFN-beta produced under stress-simulating conditions. *Biol Chem.* 2000;381(1):7–17. <https://doi.org/10.1515/BC.2000.002>
3. Runkel L, Meier W, Pepinsky R, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res.* 1998;15(4):641–9. <https://doi.org/10.1023/a:1011974512425>
4. Hahn N, Pharm D, Palmer K, Delate T. Therapeutic interferon interchange in relapsing multiple sclerosis lowers health care and pharmacy expenditures with comparable safety. *Perm J.* 2018;22:18–46. <https://doi.org/10.7812/TPP/18-046>
5. Alenda R, Costa-Frossard L, Alvarez-Lafuente R, Espejo C, Rodriguez-Martin E, de la Maza SS, et al. Blood lymphocyte subsets identify optimal responders to IFN-beta in MS. *J Neurol.* 2018;265(1):24–31. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8625-6>
6. Попова ЕВ, Бойко АН, Быкова ОВ, Нанкина ИГ, Батышева ТТ. Опыт применения российского биоаналога интерферона бета-1b в лечении детского рассеянного склероза. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2016;6:73–5. [Popova EV, Boyko AN, Bykova OV, Nankina IG, Batysheva TT. Experience of application of Russian biosimilar of interferon beta-1b for treatment of pediatric multiple sclerosis. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2016;6:73–5 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17116/jnevro20161166173-75>
7. Hyun JW, Kim G, Kim Y, Kong B, Joung A, Park NY, et al. Neutralizing antibodies against interferon-beta in korean patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurol.* 2018;14(2):186–90. <https://doi.org/10.3988/jcn.2018.14.2.186>
8. Голощапова ЕО, Минеро АС, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Разработка методики пептидного картирования для оценки подлинности рекомбинантного интерферона бета-1b. *Биофармацевтический журнал.* 2021;13(1):22–7. [Goloshchapova EO,

- Minero AS, Runova OB, Ustinnikova OB. Development of a peptide mapping technique to evaluate the authenticity of recombinant interferon beta-1b. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2021;13(1):22–7 (In Russ.) <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-1-21-26>
9. Голощачова ЕО, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Рекомбинантные интерфероны бета-1а и бета-1b: особенности структуры белка и проблемные вопросы подтверждения ее подлинности. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(8):61–4. [Goloshchapova EO, Runova OB, Ustinnikova OB. Recombinant interferons beta-1a and beta-1b: protein structure features and problematic issues of identity confirmation. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(8):61–4 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-8-61-64>
  10. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):44–50 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>
  11. Zhang Z, Pan H, Chen X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(1):147–76. <https://doi.org/10.1002/mas.20190>
  12. Tian Y, Ruotolo B. The growing role of structural mass spectrometry in the discovery and development of therapeutic antibodies. *Analyst*. 2018;143(11):2459–68. <https://doi.org/10.1039/c8an00295a>
  13. Hada V, Bagdi A, Bihari Z, Timari SB, Fizil A, Szantay C Jr. Recent advancements, challenges, and practical considerations in the mass spectrometry-based analytics of protein biotherapeutics: A viewpoint from the biosimilar industry. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;161:214–38. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.024>

**Вклад авторов.** *Е.О. Голощачова* – формирование задач исследования, выполнение экспериментальных работ и статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, формирование документации на стандартные образцы, написание текста рукописи; *О.Б. Рунова* – обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; *А.С. Минеро* – выполнение экспериментальных работ, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; *О.В. Фадейкина* – проверка документации на стандартные образцы; *Р.А. Волкова* – обсуждение результатов исследования, проверка и согласование документации на стандартные образцы, редактирование рукописи; *М.Б. Дегтерев* – хроматомасс-спектрометрические исследования, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; *С.А. Таран* – выполнение экспериментальных работ, обсуждение результатов исследования, редактирование документации на стандартные образцы, редактирование рукописи; *Р.Р. Шукуров* – обсуждение результатов исследования, проверка и согласование документации на стандартные образцы, редактирование рукописи; *О.Б. Устинникова* – идея и дизайн исследования, планирование и обсуждение результатов исследования, обсуждение и проверка документации на стандартные образцы, редактирование и дополнение текста рукописи.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

**Authors' contributions.** *E.O. Goloshchapova*—elaboration of research tasks, carrying out experimental work, statistical processing of the data, discussion of the results, preparation of the reference material documentation, writing of the text; *O.B. Rounova*—discussion of the study results, editing of the text; *A.S. Minero*—performing experimental work, discussion of the study results, editing of the text; *O.V. Fadeikina*—review of the reference material documentation; *R.A. Volkova*—discussion of the study results, review and approval of the reference material documentation, editing of the text; *M.B. Degterev*—performing chromatomass spectrometric studies, discussion of the study results, editing of the text; *S.A. Taran*—performing experimental work, discussion of the study results, editing of the reference material documentation, editing of the text; *R.R. Shukurov*—discussion of the study results, review and approval of the reference material documentation, editing of the text; *O.B. Ustinnikova*—elaboration of the idea and design of the study, planning and discussion of the results of the study, discussion and review of the reference material documentation, editing of the text of the paper and supplementing it with necessary information. **Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4). **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

**Голощачова Евгения Олеговна.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6611-0101>  
[Goloshapova@expmed.ru](mailto:Goloshapova@expmed.ru)

**Рунова Ольга Борисовна,** канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>  
[Runova@expmed.ru](mailto:Runova@expmed.ru)

**Минеро Анастасия Сальвадоровна.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>  
[minero@expmed.ru](mailto:minero@expmed.ru)

**Фадеекина Ольга Васильевна,** канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>  
[Fadeikina@expmed.ru](mailto:Fadeikina@expmed.ru)

**Волкова Рауза Асхатовна,** д-р биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>  
[Volkova@expmed.ru](mailto:Volkova@expmed.ru)

**Дегтерев Максим Борисович.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>  
[degterev@ibcgenerium.ru](mailto:degterev@ibcgenerium.ru)

**Таран Сергей Анатольевич,** канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5875-6933>  
[taran@ibcgenerium.ru](mailto:taran@ibcgenerium.ru)

**Шукуров Рахим Рахманкулович,** канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>  
[shukurov@ibcgenerium.ru](mailto:shukurov@ibcgenerium.ru)

**Устинникова Ольга Борисовна,** канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>  
[Ustinnikova@expmed.ru](mailto:Ustinnikova@expmed.ru)

*Поступила 09.09.2021*

*После доработки 02.02.2022*

*Принята к публикации 11.03.2022*

**Eugenia O. Goloshchapova.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6611-0101>  
[Goloshapova@expmed.ru](mailto:Goloshapova@expmed.ru)

**Olga B. Rounova,** Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>  
[Runova@expmed.ru](mailto:Runova@expmed.ru)

**Anastasia S. Minero.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>  
[minero@expmed.ru](mailto:minero@expmed.ru)

**Olga V. Fadeikina,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>  
[Fadeikina@expmed.ru](mailto:Fadeikina@expmed.ru)

**Rauza A. Volkova,** Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>  
[Volkova@expmed.ru](mailto:Volkova@expmed.ru)

**Maksim B. Degterev.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>  
[degterev@ibcgenerium.ru](mailto:degterev@ibcgenerium.ru)

**Sergey A. Taran,** Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5875-6933>  
[taran@ibcgenerium.ru](mailto:taran@ibcgenerium.ru)

**Rakhim R. Shukurov,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>  
[shukurov@ibcgenerium.ru](mailto:shukurov@ibcgenerium.ru)

**Olga B. Ustinnikova,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>  
[Ustinnikova@expmed.ru](mailto:Ustinnikova@expmed.ru)

*Received 9 September 2021*

*Revised 2 February 2022*

*Accepted 11 March 2022*



## Разработка стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero

Е.Г. Абрамова<sup>1,2,✉</sup>, Ю.К. Гаврилова<sup>1</sup>, С.В. Генералов<sup>1</sup>, О.А. Лобовикова<sup>1</sup>,  
И.В. Шульгина<sup>1</sup>, А.В. Комиссаров<sup>1</sup>, А.К. Никифоров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Университетская, д. 46, г. Саратов, 410005, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Театральная пл., д. 1, г. Саратов, 410012, Российская Федерация

✉ Абрамова Елена Геннадьевна; [abramova.PhD2018@yandex.ru](mailto:abramova.PhD2018@yandex.ru)

### Резюме

Разработка и применение новых методов контроля качества лекарственных средств предполагает использование большого количества референтного материала для контрольных исследований. Специалистами ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора предложен альтернативный методический подход для определения активности антирабического иммуноглобулина на культуре клеток, внедрение которого в практику диктует необходимость разработки стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи. **Цель работы:** разработка и оценка метрологических характеристик стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero. **Материалы и методы:** иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади; перевиваемая клеточная культура Vero; фиксированный вирус бешенства (штамм Москва 3253<sub>vero</sub>); стандартный образец активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи. Специфическую активность кандидата в СОП и образцов антирабического иммуноглобулина определяли в реакции нейтрализации на культуре клеток. Учет результатов осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа. Статистическую обработку проводили в соответствии с общей фармакопейной статьей 1.1.0014.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания. **Результаты:** в ходе испытаний установлена аттестуемая характеристика СОП по показателю «Специфическая активность», соответствующая значению  $180,8 \pm 18,8$  МЕ/мл. Граничные значения доверительного интервала определены при уровне вероятности 0,95. Установлен срок годности СОП – 1,5 года при хранении в соответствии с СанПиН 3.3686-21. По итогам аттестации образцу присвоен номер 41-01-20, разработан и утвержден комплект технической и эксплуатационной документации. Применение разработанного СОП позволяет проводить анализ специфической активности антирабического иммуноглобулина *in vitro*, выраженной в международных единицах, для подтверждения соответствия требованиям нормативной документации. **Выводы:** разработан стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации

вируса на клеточной культуре, аттестованный относительно стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи.

**Ключевые слова:** иммуноглобулин антирабический; стандартный образец активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи; стандартный образец предприятия; вирус бешенства; реакция нейтрализации; культура клеток

**Для цитирования:** Абрамова Е.Г., Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Разработка стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):38–48. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-38-48>

## Development of an in-house reference standard for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used in the virus neutralisation test in a Vero cell culture

E.G. Abramova<sup>1,2,✉</sup>, Yu.K. Gavrilova<sup>1</sup>, S.V. Generalov<sup>1</sup>, O.A. Lobovikova<sup>1</sup>, I.V. Shulgina<sup>1</sup>, A.V. Komissarov<sup>1</sup>, A.K. Nikiforov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Russian Research Antiplague Institute “Microbe”, 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russian Federation

<sup>2</sup> Saratov State Vavilov Agrarian University, 1 Teatrnaya Sq., Saratov 410012, Russian Federation

✉ Elena G. Abramova; [abramova.PhD2018@yandex.ru](mailto:abramova.PhD2018@yandex.ru)

### Resume

The development and use of new methods of quality control of medicines involve the use of a lot of reference materials in quality control testing. Specialists of the Russian Research Antiplague Institute “Microbe” have proposed an alternative methodological approach to determination of potency of anti-rabies immunoglobulin in cell culture, which requires the development of an in-house reference standard (RS) certified against the biological reference preparation (BRP) of the European Pharmacopoeia – human rabies immunoglobulin. **The aim of the study** was to develop and evaluate the metrological characteristics of an in-house RS for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used in the virus neutralisation test in a Vero cell culture. **Materials and methods:** the following materials were used in the study: equine rabies immunoglobulin, Vero continuous cell culture, fixed rabies virus (Moscow 3253<sub>Vero</sub> strain), human rabies immunoglobulin BRP of the European Pharmacopoeia. The potencies of the candidate in-house RS and rabies immunoglobulin samples were determined in the neutralisation test in cell culture. The results were recorded using a fluorescent microscope. Statistical processing was carried out in accordance with general chapter 1.1.0014.15 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th edition. **Results:** the certified value of the in-house RS potency was 180.8±18.8 IU/mL. The confidence limits were determined at the 0.95 probability level. The shelf life of the in-house RS is 1.5 years (when stored according to the sanitary regulation SanPiN 3.3686-21). The certified in-house RS was assigned with the number 41-01-20. A set of technical and operational documentation was developed and approved for the in-house RS. The developed in-house RS can be used for *in vitro* determination of anti-rabies immunoglobulin potency, expressed in international units, to confirm its compliance with the product specification file. **Conclusions:** the authors developed an in-house RS for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used in the virus neutralisation test in cell culture, certified against the human rabies immunoglobulin BRP of the European Pharmacopoeia.

**Key words:** anti-rabies immunoglobulin; human rabies immunoglobulin BRP of the European Pharmacopoeia; in-house reference standard; rabies virus; neutralisation test; cell culture

**For citation:** Abramova E.G., Gavrilova Yu.K., Generalov S.V., Lobovikova O.A., Shulgina I.V., Komissarov A.V., Nikiforov A.K. Development of an in-house reference standard for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used in the virus neutralisation test in a Vero cell culture. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):38–48. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-38-48>

## Введение

Контроль качества лекарственных препаратов, в том числе иммунобиологических (ИЛП), предусматривает использование стандартных образцов, вопросы разработки которых весьма актуальны в последние десятилетия в связи с повышением требований к качеству лекарственных препаратов, выпускаемых в Российской Федерации [1]. Одним из важнейших показателей качества ИЛП «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади» (АИГ, производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), применяемого для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей при укусах больными или подозрительными на бешенство животными, является специфическая активность [2]. Согласно нормативным документам, значение данного показателя, выраженное в Международных единицах (МЕ), выявляют *in vivo* в реакции нейтрализации (РН) вируса бешенства на белых мышах<sup>1</sup>. Ранее в РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора был разработан и аттестован относительно международного стандарта ВОЗ (WHO, 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human) стандартный образец предприятия (СОП) специфической активности гетерологичного АИГ в РН на белых мышах при проведении выпускающего контроля качества препарата коммерческих серий [3]. В рамках научно-исследовательских и экспериментальных работ в направлении поиска новых эффективных методов *in vitro* для определения специфической активности АИГ специалистами ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора разработан альтернативный методический подход, суть которого заключается в осуществлении РН вируса бешенства на чувствительной клеточной культуре. Показан высокий уровень корреляции результатов данного теста и традиционной реакции нейтрализации на белых мышах [4].

Предложенный подход представляет собой модификацию метода FAVN (fluorescent antibody virus neutralization test), широко используемого за рубежом в ветеринарной и медицинской практике [5, 6]. К преимуществам использования разработанного теста относится сокращение срока получения результатов с 14 до 3 сут, отсутствие необходимости использования животных, а также возможность одновременного исследования большего количества образцов. Отметим, что метод FAVN рекомендован ВОЗ для оценки протективной активности антирабических лекарственных препаратов<sup>2</sup>. В отечественной практике метод FAVN на сегодняшний день применяют в аккредитованных ветеринарных лабораториях для оценки уровня содержания антител у вакцинированных животных. Разработка и внедрение эффективных экспрессных методов выявления вируснейтрализующих антител в отечественную практику здравоохранения в настоящее время представляется весьма актуальным направлением, требующим развития [7]. Следует отметить, что перспектива внедрения предлагаемого метода определения специфической активности АИГ и антирабических сывороток животных-производителей *in vitro* в РН на культуре клеток в производственную практику требует использования большого количества референтного материала для контрольных исследований. Референт-образцом при отработке условий постановки контрольного теста *in vitro* служил стандартный образец активности антирабического иммуноглобулина человека (Human rabies immunoglobulin BRP) Европейской фармакопеи, рекомендованный ВОЗ для определения активности антирабического иммуноглобулина в тесте на культуре клеток. ВОЗ рекомендует использовать первичные международные стандартные образцы для установления значений аттестуемых характеристик вторичных стандартных образцов,

<sup>1</sup> Фармакопейная статья 3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.  
Фармакопейная статья предприятия ФСП Р N002639/01-250210, изм. № 4 N002639/01-090216 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; 2010.

<sup>2</sup> Human rabies immunoglobulin, monograph 0723. European Pharmacopoeia 6th ed.; 2013.  
Rabies immune globulin. USP 42–NF 36; 2019.  
Brazilian Pharmacopoeia 6th ed.; 2019.

а не для рутинных лабораторных исследований<sup>3</sup>. В связи с этим актуальной является разработка СОП для применения в РН вируса бешенства на культуре клеток, аттестованного по указанному стандартному образцу Европейской фармакопеи. Согласно классификации, стандартным образцом предприятия или рабочим стандартным образцом является стандартный образец, утвержденный руководителем предприятия в установленном порядке и применяемый в соответствии с нормативными документами предприятия [8].

Цель настоящей работы – разработка и оценка метрологических характеристик СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработка и аттестация СОП активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero;
- утверждение СОП, разработка технической и эксплуатационной документации (свидетельство, макеты маркировок первичной и вторичной упаковок, инструкция по применению);
- оценка практического применения разработанного СОП.

## Материалы и методы

### Материалы:

- перевиваемая клеточная линия Vero (клетки почки африканской зеленой мартишки) на уровне 170–180 пассажа из коллекции ООО «Биолот» (Россия), проверенная на отсутствие микоплазм;
- фиксированный вирус бешенства штамм Москва 3253<sub>Vero</sub>, адаптированный к росту на перевиваемой клеточной культуре Vero; исходный штамм фиксированного вируса бешенства Москва 3253 из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, номер депозита 61/91;
- стандартный образец активности антирабического иммуноглобулина человека (Human rabies immunoglobulin BRP) Европейской фармакопеи (batch 1, product code H1100000, European Directorate for the Quality

of Medicines & HealthCare (EDQM) Council of Europe, Strasbourg)<sup>4</sup> с активностью 91 МЕ/мл (референс-образец);

- иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади (7 образцов);
- диагностический антирабический иммуноглобулин, меченый флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-АИГ), сухой, для диагностики бешенства животных методом иммунофлуоресценции (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия);
- основные среды и растворы: питательная среда Игла MEM жидкая, с L-глутамином (ООО «Биолот», Россия); раствор Дальбекко (DPBS) без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (ООО «Биолот», Россия); раствор версена 0,02% (ООО «Биолот», Россия); раствор трипсина 0,25% (ООО «Биолот», Россия); сыворотка крови крупного рогатого скота (КРС) жидкая для культур клеток (ООО «Биолот», Россия);
- система асептическая одноразовая, объем 5 дм<sup>3</sup> (Flexboy, Sartorius Stedim Biotech, Германия);
- ампулы стеклянные ШП-2 объемом 2 мл (SCHOTT AG, Германия);
- флаконы культуральные (Orange Scientific, Бельгия);
- планшеты для культивирования клеточных культур, 96-луночные, Greiner bio-one (Cellstar, Германия).

### Оборудование

Установка для мойки ампул (BAS, Германия); стерилизатор суховоздушный (ICOS SD-P 602/A, Германия); установка для розлива и запайки ампул (BAS, Германия); установка для определения механических включений (BAS, Германия); установка для определения герметичности ампул (BAS, Германия); бокс микробиологической безопасности (класс биологической безопасности III) БМБ-III-«Ламинар-С»-1,8 (320.180.03) («Ламинарные системы», Россия); инкубатор с углекислой средой (CO<sub>2</sub>-инкубатор) MCO-15AC (Sanyo, Япония); микроскоп инвертированный «Микромед И-Люм» (Россия).

### Методы

Реакция нейтрализации вируса бешенства на культуре клеток. Для определения инфицирующей дозы вируса для клеточных культур (ID<sub>50</sub>) в лунках 96-луночного планшета готовили

<sup>3</sup> WHO Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards. Technical Reports Serie 932. Annex 2. Geneva: WHO; 2004.

<sup>4</sup> Zwahlen RD. Collaborative study for the establishment of human rabies immunoglobulin Biological Reference Preparation batch no. 1. Pharmeuropa Bio 99-1, 10-18, 1999. [https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=H1100000\\_1](https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=H1100000_1)  
List of European pharmacopoeia reference standards. Effective from 2022/1/31. Catalogue code: H1100000. [https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/web\\_catalog\\_CRS.pdf](https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/web_catalog_CRS.pdf)

четырёхкратные разведения вирусосодержащей жидкости от  $10^{-2,3010}$  до  $10^{-6,1544}$ , используя в качестве разводящей жидкости питательную среду Игла МЕМ, содержащую от 2 до 5% сыворотки крови КРС для культивирования клеток. В каждую лунку микропланшета вносили равный объём культуры клеток Vero в концентрации  $(3,5 \pm 0,5) \times 10^5$  кл/0,1 мл. Микропланшеты с клетками и вирусом выдерживали 72 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  при 37 °С. Далее фиксировали монослой клеток охлажденным раствором ацетона и методом иммунофлуоресценции исследовали клеточную культуру на наличие вируса. Результат учитывали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа при 100–200-кратном увеличении. Инфицированные вирусом клетки имели флуоресцирующую желто-зеленую окраску, оцениваемую на три или четыре балла в соответствии с инструкцией к диагностическому антирабическому иммуноглобулину. При наличии в лунке одной или нескольких флуоресцирующих клеток клеточный монослой считали инфицированным. Титр вируса бешенства рассчитывали методом Reed и Muench<sup>5</sup>.

Постановку реакции нейтрализации вируса бешенства на культуре клеток осуществляли согласно общепринятой методике<sup>6</sup> в модификации Ю.К. Гавриловой с соавт. [4]. При оценке показателя «Специфическая активность» кандидата в СОП параллельно определяли титр стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи (референс-образец). Для этого все образцы (испытываемые и референс-образец) разводили в питательной среде Игла МЕМ с КРС в соотношении 1:50, а затем титровали в лунках 96-луночного планшета с двукратным или трехкратным шагом соответственно по 50 или 100 мкл. Исходя из предварительно рассчитанного значения титра вируса готовили его рабочее разведение. Далее в каждую лунку

микропланшета с исследуемыми образцами вносили равный объём рабочего разведения вируса, при этом инфекционная доза вируса составляла от 100 до 500  $\text{ID}_{50}$ /0,05 мл. Планшеты с исследуемыми образцами инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего в каждую лунку вносили равный объём культуры клеток Vero в рабочей концентрации. Планшеты с исследуемыми образцами инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего монослой клеток фиксировали и окрашивали флуоресцирующими специфическими антителами. При учете результатов отсутствие флуоресцирующих клеток в монослое свидетельствовало о нейтрализации вируса в исследуемом образце. Расчет титра антител осуществляли по методу Reed и Muench<sup>7</sup>. Активность испытуемого образца – кандидата в СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического, выраженную в международных единицах (МЕ), рассчитывали по формуле:

$$CA = \frac{A}{B} \times n, \quad (1)$$

где  $CA$  – активность СОП (МЕ/мл);  $A$  – обратная величина титра СОП;  $B$  – обратная величина титра референс-образца;  $n$  – активность референс-образца (МЕ/мл).

Для оценки значения специфической активности при аттестации СОП активности антирабического иммуноглобулина использовали среднее арифметическое исследуемой выборки и его доверительный интервал, определяемые в соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) 1.1.0014.15<sup>8</sup> с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Изучение кандидата в СОП по показателям: «Стерильность», «Подлинность», «Пирогенность», «Механические включения», «Извлекаемый объём» проводили согласно нормативным документам<sup>9</sup>.

Для установления срока годности оценивали стабильность СОП активности антирабического иммуноглобулина в долгосрочных испытаниях

<sup>5</sup> Rupprecht CE, Fooks AR, Abela-Ridder B, eds. Laboratory techniques in rabies. 5th ed. Vol. 1. WHO; 2018.

<sup>6</sup> Там же.

<sup>7</sup> Там же.

<sup>8</sup> Общая фармакопейная статья 1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

<sup>9</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.4.2.0003.15 Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.4.2.0005.18 Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

при хранении в условиях, соответствующих требованиям санитарных правил СанПиН 3.3686-21<sup>10</sup>.

## Результаты и обсуждение

При разработке СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в РН на культуре клеток были учтены требования нормативной документации на гетерологичный антирабический иммуноглобулин<sup>11</sup>. В качестве кандидата в СОП был выбран специфический иммуноглобулин коммерческой серии 174, биологические и физико-химические показатели которого отвечали требованиям фармакопейной статьи предприятия<sup>12</sup>. Кандидат в СОП специфической активности для применения в РН *in vitro* представлял собой специфический иммуноглобулин, выделенный из иммунной сыворотки крови лошади, иммунизированной рабическим антигеном на основе фиксированного вируса бешенства производственного штамма Москва 3253. Для осаждения гамма-глобулина иммунную сыворотку фракционировали риванол-спиртовым методом в соответствии с промышленным регламентом<sup>13</sup>. Приготовление жидкого иммуноглобулина, его очистку и стерилизацию с использованием баромембранных процессов проводили в соответствии с промышленным регламентом<sup>14</sup>.

Для изготовления кандидата в СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина очищенный стерильный раствор антирабического иммуноглобулина разливали по 1,3 мл в ампулы объемом 2 мл. Предварительно ампулы обрабатывали автоматически на установке для мойки ампул с использованием воды для инъекций. Вымытые ампулы проверяли визуально на целостность, затем проводили депирогенизацию и стерилизацию ампул при температуре 250±2 °С в течение 1 ч. Розлив стерильного иммуноглобулина из полимерного стерильного апиrogenного контейнера в ампулы по 1,3 мл осуществляли в чистых помещениях, в контролируемых условиях зоны А автоматически с использованием машины для розлива и за-

пайки ампул. Заполненные и запаянные ампулы с препаратом контролировали по следующим показателям: «Подлинность», «Механические включения», «Стерильность», «Пирогенность», «Специфическая активность», «Извлекаемый объем». По результатам испытаний выявлено соответствие качества образцов в первичной упаковке нормируемым требованиям (табл. 1).

Аттестуемой метрологической характеристикой кандидата в СОП являлась специфическая активность в Международных единицах (МЕ/мл). Для решения задачи по аттестации СОП в тесте на культуре клеток определяли специфическую активность трех образцов кандидата в СОП в трех-четыре повторностях, в общей сложности было поставлено 10 реакций нейтрализации вируса бешенства на культуре клеток Vero (табл. 2). В предварительных экспериментах была установлена оптимальная доза вируса бешенства для определения уровня антирабических антител в реакции вируснейтрализации *in vitro*, соответствующая значениям в интервале 100–500 ID<sub>50</sub>/0,05 мл.

В ходе опытов выявлено, что величина специфической активности, выраженная в МЕ/мл и рассчитанная относительно референс-образца с активностью 91 МЕ/мл, составила от 144 до 227 МЕ/мл. Для оценки аттестованного значения специфической активности СОП использовали среднее арифметическое ( $\bar{x}$ ) исследуемой выборки. Ошибку среднего арифметического ( $\Delta\bar{x}$ ) рассчитывали по стандартным методикам с использованием критерия Стьюдента. Коэффициент вариации (отношение стандартного отклонения к среднему) в данном случае составил около 13%, что свидетельствовало об однородной совокупности результатов. Аттестованное значение специфической активности составило 180,8±18,8 МЕ/мл. Граничные значения доверительного интервала определены при уровне вероятности 0,95.

В таблице 3 представлены результаты испытаний стабильности разработанного СОП специфической активности антирабического

<sup>10</sup> Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

<sup>11</sup> Фармакопейная статья 3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

<sup>12</sup> Фармакопейная статья предприятия ФСП Р N002639/01-250210, изм. № 1 N002639/01-121011, изм. № 2 N002639/01-190613, изм. № 3 N002639/01-240215, изм. № 4 N002639/01-090216, изм. № 5 N002639/01-12112019. Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; 2010.

<sup>13</sup> Промышленный регламент ПР № 01898109-56-19 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; 2019.

<sup>14</sup> Там же.

**Таблица 1.** Спецификация кандидата в стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина

**Table 1.** Specification of the candidate in-house reference standard for rabies immunoglobulin potency

Наименование показателя (с указанием метода) <i>Parameter (test method)</i>	Требования НД <i>Requirements of the product specification file</i>	Результаты испытаний <i>Test results</i>
<p>Подлинность: – видоспецифичность (реакция диффузной преципитации);</p> <p>– специфичность антител (биологический на мышах)</p> <p><i>Identification:</i> – <i>species specificity (diffusion precipitation test);</i> – <i>antibody specificity (biological test in mice)</i></p>	<p>Должен соответствовать требованиям НД: – иммуноглобулин должен образовывать четкое кольцо преципитации с сывороткой, преципитирующей белки сыворотки крови лошади, и не образовывать кольцо с сыворотками, преципитирующими белки сыворотки крови человека, крупного рогатого скота и свиньи; – должны присутствовать антирабические антитела</p> <p><i>The product has to meet the specification requirements:</i> – <i>immunoglobulin forms a distinct precipitation ring with serum precipitating horse serum proteins, and does not form any rings with sera precipitating human, cattle, and pig sera proteins;</i> – <i>rabies antibodies are present</i></p>	<p>Соответствует <i>The product meets the requirements</i></p>
<p>Механические включения (визуальный) <i>Particulate matter (visual examination)</i></p>	<p>Должен выдерживать требования общей фармакопейной статьи 1.4.2.0005.18 <i>The product has to meet the requirements of general chapter 1.4.2.0005.18</i></p>	<p>Выдерживает требования НД <i>The product meets the specification requirements</i></p>
<p>Стерильность (метод прямого посева) <i>Sterility (direct inoculation method)</i></p>	<p>Должен быть стерильным <i>The product is sterile</i></p>	<p>Стерилен <i>Sterile</i></p>
<p>Пирогенность (биологический) <i>Pyrogenicity (biological test)</i></p>	<p>Должен быть апиrogenным <i>The product is apyrogenic</i></p>	<p>Апиrogenен <i>Apyrogenic</i></p>
<p>Извлекаемый объем (объемный) <i>Extractable volume (test for extractable volume)</i></p>	<p>Должен быть не менее номинального <i>At least nominal volume</i></p>	<p>Соответствует <i>The product meets the requirements</i></p>

*Примечание.* НД – нормативная документация.

иммуноглобулина по показателю «Специфическая активность» в течение и конце срока годности (1,5 года), а также через 1 месяц после истечения срока годности. Из этих данных следует, что значение аттестованной характеристики СОП оставалось в пределах установленного при аттестации интервала (табл. 3).

Специфическая активность в тесте на культуре клеток составила соответственно 181,6; 173,7 и 174,3 МЕ/мл, что свидетельствует о стабильности СОП активности антирабического иммуноглобулина в течение срока годности.

Разработанному СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток присвоен номер 41-01-20, он внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Разработан и утвержден пакет технической и эксплуатационной документации на научно-техническую продукцию СОП 41-01-20 (свидетельство, макеты маркировок первичной и вторичной упаковок, инструкция по применению).

Указанный СОП предназначен для проведения исследований, целью которых является внедрение метода определения специфической активности антирабического иммуноглобулина в РН на культуре клеток в производственную практику.

Апробация разработанного СОП предусматривала исследование специфической активности *in vitro* в РН на культуре клеток Vero образцов антирабического иммуноглобулина различных серий. При расчете по формуле использовали аттестованное значение специфической активности СОП 41-01-20, соответствующее 181 МЕ/мл. Показано, что значения протективного титра антител имели величину от 1:1880 до 1:2700, а рассчитанная относительно разработанного СОП активность в МЕ/мл составила 150–216 МЕ/мл. Полученные результаты продемонстрировали соответствие выявленных значений требованиям нормативной документации на антирабический иммуноглобулин, согласно которой специфическая активность должна соответствовать величине не менее 150 МЕ/мл (табл. 4).

Таким образом, применение разработанного СОП позволяет проводить анализ специфической

**Таблица 2.** Результаты определения специфической активности кандидатов в стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero с использованием стандартного образца Европейской фармакопеи

**Table 2.** Potencies of the candidate in-house reference standards of anti-rabies immunoglobulin potency obtained in the neutralisation reaction on Vero cell culture using the European Pharmacopoeial biological reference preparation

№ опыта <i>Test number</i>	Образцы кандидата в СОП <i>Candidate in-house RS samples</i>	Титр активности референс-образца <i>RS potency titer</i>	Активность референс-образца в МЕ/мл <i>RS potency (IU/mL)</i>	Титр активности кандидата в СОП <i>Candidate in-house RS potency titer</i>	Активность кандидата в СОП (МЕ/мл) <i>Candidate in-house RS potency (IU/mL)</i>	Аттестованное значение активности кандидата в СОП (МЕ/мл) ( $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ ) <i>Certified potency of the candidate in-house RS (IU/mL) (<math>\bar{x} \pm \Delta \bar{x}</math>)</i>
1	Образец 1, опыт 1 <i>Sample 1, test 1</i>	1:5841	91	1:14591	227	180,8±18,8
2				1:9411	147	
3				1:12150	189	
4	Образец 2, опыт 2 <i>Sample 2, test 2</i>	1:1559	91	1:2700	158	
5				1:3394	198	
6				1:3024	177	
7	Образец 3, опыт 3 <i>Sample 3, test 3</i>	1:2016	91	1:4525	204	
8				1:4032	182	
9				1:3200	144	
10				1:4032	182	

*Примечание.* СОП – стандартный образец предприятия.

*Note.* RS—reference standard.

**Таблица 3.** Результаты испытаний стабильности кандидата в стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero

**Table 3.** Results of stability testing of the candidate in-house reference standard of anti-rabies immunoglobulin potency, obtained in the neutralisation test on Vero cell culture

Срок хранения, мес. <i>Shelf life, months</i>	Специфическая активность в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero, МЕ/мл <i>Potency in the neutralisation test in the Vero cell culture, IU/mL</i>
0 (на момент выпуска) <i>0 (at the time of release)</i>	180,8±18,8
9 мес. (n = 6) <i>9 months (n = 6)</i>	181,6±30,5
18 мес. (n = 6) <i>18 months (n = 6)</i>	173,7±21,8
19 мес. (n = 6) <i>19 months (n = 6)</i>	174,3±13,3

*Примечание.* n – объем выборки. Представлены граничные значения доверительного интервала среднего результата (по Стьюденту).

*Note.* n—sample size. The table gives the confidence limits for the mean value (according to the Student's t-test).

**Таблица 4.** Специфическая активность антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на культуре клеток с применением разработанного стандартного образца предприятия

**Table 4.** Potencies of anti-rabies immunoglobulin in the neutralisation tests in cell culture using the developed in-house reference standard

Образец АИГ, номер ERIG sample number	Титр антител (активность, МЕ/мл) <i>Antibody titer (potency, IU/mL)</i>			
	реакция нейтрализации № 1 <i>neutralisation test 1</i>	реакция нейтрализации № 2 <i>neutralisation test 2</i>	реакция нейтрализации № 3 <i>neutralisation test 3</i>	используемый стандартный образец предприятия <i>in-house reference standard</i>
1	1:2347 (188)	1:2700 (216)	1:2400 (192)	СОП 41-01-20 1:2263 (181) <i>In-house reference standard</i> 41-01-20 1:2263 (181)
2	1:2263 (181)	1:2091 (167)	1:2138 (171)	
3	1:1880 (150)	1:2248 (180)	1:1905 (152)	
4	1:1903 (152)	1:1872 (150)	1:2043 (163)	

*Примечание.* АИГ – антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади.  
*Note.* ERIG – equine rabies immunoglobulin.

активности антирабического иммуноглобулина *in vitro*, выраженной в международных единицах, для подтверждения соответствия требованиям нормативной документации. Наличие СОП позволит проводить исследования по отработке контрольного теста *in vitro* без использования дорогостоящего стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи, что позволит экономить финансовые затраты на обеспечение зарубежными стандартными образцами, а также успешно соблюдать фармацевтическую систему качества на предприятии и соответствовать требованиям отечественных и международных регуляторных органов<sup>15</sup>.

По результатам исследований планируется подготовка проекта изменений в фармакопейной статье предприятия «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» показателя «Специфическая активность».

## Выводы

1. Проведена аттестация кандидата в СОП специфической активности антирабического

## Литература/References

1. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of the certification procedure for biological reference

ского иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток. С применением стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи установлена аттестуемая характеристика СОП – специфическая активность в Международных единицах, соответствующая значению 180,8±18,8 МЕ/мл.

2. На основании данных по оценке стабильности СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина установлен срок годности 1,5 года при хранении при температуре от 2 до 8 °С.
3. Разработан и утвержден пакет технической и эксплуатационной документации на научно-техническую продукцию СОП 41-01-20: свидетельство, макеты маркировок первичной и вторичной упаковок, инструкция по применению. СОП внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

standards. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):44–50 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>

2. Мовсесянц АА, Бутырский АЮ, Бондарев ВП, Олещук ЮВ, Постнова ЕЛ, Мухачева АВ. К вопросу

<sup>15</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. Утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89. ICH Q7 Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients (CPMP/ICH/4106/00). EMA; 2000.

- о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015;5:85–9. [Movsesyants AA, Butyrsky AYu, Bondarev VP, Olefir YuV, Postnova EL, Mukhacheva AV. On the issue of the use of heterologous anti-rabies immunoglobulin for the specific prevention of rabies in humans. *Ėpidemiologiā i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccination Prevention*. 2015;5:85–9 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-5-85-89>
3. Абрамова ЕГ, Лобовикова ОА, Шульгина ИВ, Комиссаров АВ, Савицкая ЛВ, Генералов СВ и др. Разработка стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4(21):160–4. [Abramova EG, Lobovikova OA, Shulgina IV, Komissarov AB, Savitskaya LV, Generalov SV, et al. Development of quality control sample to assess specific activity of anti-rabies immunoglobulin obtained from equine blood serum. *Razrabotka i registraciā lekarstvennyh sredstv = Drug Development & Registration*. 2017;4(21):160–4 (In Russ.)]
  4. Гаврилова ЮК, Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Савицкая ЛВ, Галкина МВ, Кочкин АВ. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. *Биотехнология*. 2018;34(4):83–8. [Gavrilova YuK, Generalov SV, Abramova EG, Savitskaya LV, Galkina MV, Kochkin AV. Express analysis of activity of anti-rabies serum and anti-rabies immunoglobulin in cell cultures by immunofluorescence method. *Biotehnologiya = Biotechnology*. 2018;34(4):83–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88>
  5. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*. 1998;212(1):79–87. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00212-3)
  6. Баркова ИП, Нагиева ФГ, Никулина ВГ, Лисаков АН. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах. *Инфекция и иммунитет*. 2013;3(4):323–6. [Barkova IP, Nagieva FG, Nikulina VG, Lisakov AN. The rapid culture method for the indication of rabies virus antigens in infected cell cultures. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2013;3(4):323–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2013-4-323-326>
  7. Мовсеянц АА, Олефир ЮВ. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):10–6. [Movsesyants AA, Olefir YuV. Current challenges of preventive vaccination against rabies. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):10–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16>
  8. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(4):229–37. [Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA, et al. Current issues of standard samples in the field of circulation of biological medicines. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(4):229–37 (In Russ.)]

**Вклад авторов.** **Е.Г. Абрамова** – написание текста рукописи, общее руководство исследованиями; **Ю.К. Гаврилова** – сбор и систематизация данных научной литературы, получение экспериментальных данных, оформление и интерпретация результатов; **С.В. Генералов** – получение экспериментальных данных, анализ полученных данных, статистическая обработка данных; **О.А. Лобовикова** – статистическая обработка данных, редактирование рукописи; **И.В. Шульгина** – анализ данных литературы, редактирование рукописи; **А.В. Комиссаров** – получение экспериментальных данных, редактирование рукописи; **А.К. Никифоров** – окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

**Благодарности.** Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

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

**Authors' contributions.** **E.G. Abramova**—writing of the text, coordination and management of the study; **Yu.K. Gavrilova**—systematisation of scientific literature, obtaining experimental data, interpretation of the results, formatting of the paper; **S.V. Generalov**—obtaining experimental data, analysis and statistical processing of the obtained results; **O.A. Lobovikova**—statistical processing of the obtained results, editing of the text; **I.V. Shulgina**—literature review, editing of the text; **A.V. Komissarov**—obtaining experimental data, editing of the text; **A.N. Nikiforov**—final approval of the paper for publication.

**Acknowledgements.** The study was performed without external funding.

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

## Об авторах / Authors

**Абрамова Елена Геннадьевна**, д-р биол. наук. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8798-1547>  
[abramova.PhD2018@yandex.ru](mailto:abramova.PhD2018@yandex.ru)

**Гаврилова Юлия Кирилловна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7919-3412>  
[ylia-93@list.ru](mailto:ylia-93@list.ru)

**Генералов Сергей Вячеславович**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1461-5383>  
[svgeneraloff@gmail.com](mailto:svgeneraloff@gmail.com)

**Лобовикова Оксана Анатольевна**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8085-2331>  
[Lobovikova\\_OA@microbe.ru](mailto:Lobovikova_OA@microbe.ru)

**Шульгина Ирина Витальевна**, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5866-4091>  
[Shulgina\\_IV@microbe.ru](mailto:Shulgina_IV@microbe.ru)

**Комиссаров Александр Владимирович**, д-р биол. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1609-0384>  
[komissarov-9@yandex.ru](mailto:komissarov-9@yandex.ru)

**Никифоров Алексей Константинович**, д-р биол. наук, доц. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>  
[rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

**Elena G. Abramova**, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8798-1547>  
[abramova.PhD2018@yandex.ru](mailto:abramova.PhD2018@yandex.ru)

**Yuliya K. Gavrilova**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7919-3412>  
[ylia-93@list.ru](mailto:ylia-93@list.ru)

**Sergey V. Generalov**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1461-5383>  
[svgeneraloff@gmail.com](mailto:svgeneraloff@gmail.com)

**Oksana A. Lobovikova**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8085-2331>  
[Lobovikova\\_OA@microbe.ru](mailto:Lobovikova_OA@microbe.ru)

**Irina V. Shulgina**, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5866-4091>  
[Shulgina\\_IV@microbe.ru](mailto:Shulgina_IV@microbe.ru)

**Aleksandr V. Komissarov**, Dr. Sci. (Biol.), Professor.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1609-0384>  
[komissarov-9@yandex.ru](mailto:komissarov-9@yandex.ru)

**Aleksey K. Nikiforov**, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>  
[rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

*Поступила 28.07.2021*

*После доработки 03.02.2022*

*Принята к публикации 11.03.2022*

*Received 28 July 2021*

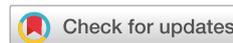
*Revised 3 February 2022*

*Accepted 11 March 2022*

УДК 615.373:615.065

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-49-59>

Научная статья | Scientific article



## Стандартизация метода определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека

О.Г. Корнилова , М.А. Кривых, А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова

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

✉ Корнилова Ольга Геннадьевна; [Kornilova@expmed.ru](mailto:Kornilova@expmed.ru)

### Резюме

Оценка содержания активатора прекалликреина является необходимой составляющей контроля специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека. Вариабельность свойств биологических реагентов прекалликреина человека, хромогенного субстрата указывает на необходимость стандартизации хромогенного метода использованием компонентов стандартного образца (СО) не только для построения калибровочного графика, но и для подтверждения достоверности, стабильности и воспроизводимости полученных результатов в различных диапазонах значений в пределах регламентированных. **Цель работы:** совершенствование процедуры контроля качества препаратов из плазмы крови человека по содержанию активатора прекалликреина. **Материалы и методы:** содержание активатора прекалликреина определяли хромогенным методом по общей фармакопейной статье 1.8.2.0013.18 Государственной фармакопеи Российской Федерации с использованием реагентов прекалликреина различных производителей. СО разрабатывали на основе метода добавок с использованием раствора альбумина человека и реагента  $\beta$ -фрагмента фактора Хагемана. По результатам определения содержания активатора прекалликреина в компоненте контроля строили контрольные карты Шухарта. **Результаты:** методом добавок разработан двухкомпонентный СО содержания активатора прекалликреина с регламентированным количеством  $\beta$ -фрагмента фактора Хагемана; обоснована необходимость комплектации СО реагентом прекалликреина отечественного производства; отраслевой стандартный образец (ОСО) 42-28-445 аттестован с использованием всех доступных реагентов прекалликреина человека, ОСО 42-28-446 – с использованием реагента прекалликреина, входящего в состав набора. Аттестованное значение содержания активатора прекалликреина составило: в компоненте для оценки содержания активатора прекалликреина серии 1 обоих ОСО – 51 МЕ; в компоненте контроля ОСО 42-28-445 при восстановлении в 1,0 мл воды очищенной – 8,3–11,9 МЕ/мл, при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной – 5,4–6,6 МЕ/мл; в компоненте контроля ОСО 42-28-446 – 9,1–11,1 и 5,6–6,4 МЕ/мл соответственно. Компонент для оценки содержания активатора прекалликреина предназначен для построения калибровочного графика, компонент контроля – для оценки достоверности результатов испытаний и построения контрольных карт. Анализ полученных карт для компонента контроля позволил оценить стабильность аналитической работы. **Выводы:** компоненты разработанных СО в сочетании с контрольными картами Шухарта позволяют не только определять содержание активатора прекалликреина, но и контролировать процесс анализа, оценивать его изменения, связанные со сменой серии реагентов. Компонент контроля позволяет оценивать стабильность аналитической работы и обеспечивает стандартность методики.

**Ключевые слова:** лекарственные препараты иммуноглобулинов и альбумина человека; активатор прекалликреина; прекалликреин человека; стандартизация; стандартный образец; аттестация; стабильность аналитической работы; контрольные карты Шухарта

**Для цитирования:** Корнилова О.Г., Кривых М.А., Воропаев А.А., Фадейкина О.В., Волкова Р.А. Стандартизация метода определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(1):49–59. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-49-59>

## Standardisation of the method for prekallikrein activator determination in human immunoglobulin and albumin products

O.G. Kornilova ✉, M.A. Krivykh, A.A. Voropaev, O.V. Fadeikina, R.A. Volkova

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

✉ *Olga G. Kornilova; [Kornilova@expmed.ru](mailto:Kornilova@expmed.ru)*

### Resume

Assessment of prekallikrein content is essential for safety control of human immunoglobulin and albumin products. The inherent variability of human prekallikrein reagents and chromogenic substrates indicates the need for standardisation of the chromogenic assay, using the components of a reference standard (RS) not only for construction of calibration curves, but also for confirmation of validity, consistency, and reproducibility of results within different established ranges. **The aim of the study** was to improve the quality control of human plasma products in terms of prekallikrein activator content. **Materials and methods:** prekallikrein activator content was determined by the chromogenic assay according to the procedure described in General Monograph 1.8.2.0013.18 of the Russian Pharmacopoeia, using various prekallikrein reagents. An RS was developed in a spiking test, using human albumin solution and Hageman factor beta-fragment reagent. Shewhart control charts were prepared based on the results of determination of prekallikrein activator content in the RS control component. **Results:** a two-component RS for prekallikrein activator content with an assigned Hageman factor beta fragment content was developed using the spiking test. The authors substantiated the necessity of using a Russian-produced prekallikrein reagent as the RS component. The in-house reference standard IRS 42-28-445 was certified using all available human prekallikrein reagents, and the IRS 42-28-446 was certified using the prekallikrein reagent included in the kit. The certified prekallikrein activator content is: 51 IU in the batches 1 of IRS components intended for prekallikrein determination; 8.3–11.9 IU/mL in the IRS 42-28-445 control component, after reconstitution in 1.0 mL of purified water, and 5.4–6.6 IU/mL after reconstitution in 2.0 mL of purified water; and 9.1–11.1 IU/mL and 5.6–6.4 IU/mL in the IRS 42-28-446 control component after reconstitution in 1.0 mL and 2.0 mL of purified water, respectively. The IRS component intended for prekallikrein determination is designed for calibration curve construction, while the IRS control component is designed for assessing the validity of test results and preparation of control charts. The analysis of the control charts for the control component made it possible to evaluate the consistency of the analytical process. **Conclusions:** the components of the developed RSs in combination with Shewhart control charts allow for both determination of prekallikrein activator content, and control of the analytical process, as well as assessment of changes related to the replacement of the reagent batch. The RS control component allows for assessment of analytical process consistency and ensures the standardisation of the test procedure.

**Key words:** human immunoglobulin and albumin products; prekallikrein activator; human prekallikrein; standardisation; reference standard; certification; analytical process consistency; Shewhart control charts

**For citation:** Kornilova O.G., Krivykh M.A., Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Volkova R.A. Standardisation of the method for prekallikrein activator determination in human immunoglobulin and albumin products. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):49–59. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-49-59>

## Введение

Одной из возможных причин возникновения нежелательных реакций при инфузионной терапии лекарственными препаратами иммуноглобулинов (ЛП ИГЧ) и альбумина человека (ЛП АЧ) является гипотензивное действие активатора прекалликреина (АПК). Являясь активированным  $\beta$ -фрагментом фактора свертывания крови XII (фактора Хагемана), этот компонент плазмы крови человека в остаточном количестве может содержаться в готовом препарате и при внутривенном введении вызывать активацию и переход прекалликреина (ПК) в калликреин, который, в свою очередь, вызывает активацию кининового пути и синтез брадикинина, обладающего сосудорасширяющим действием [1]. Контроль остаточного содержания активатора прекалликреина в ЛП ИГЧ и ЛП АЧ<sup>1</sup>, допустимым пределом которого является 35 МЕ/мл, осуществляется хромогенным методом посредством сравнения со стандартным образцом (СО), откалиброванным в международных единицах (МЕ)<sup>2</sup>. Современные СО, применяемые в международной фармакопейной практике, представляют собой серию препарата АЧ с повышенным содержанием АПК, приближающимся к предельно допустимому в ЛП АЧ. В настоящее время разработано и аттестовано несколько СО АПК<sup>3</sup>, каждый из которых является средством передачи единицы величины, выраженной в МЕ, и используется для построения калибровочного графика<sup>4</sup>. Аtte-

стованная характеристика представляет собой среднее значение содержания АПК без указания допустимых отклонений. Хромогенный метод определения содержания АПК в ЛП ИГЧ и ЛП АЧ предусматривает использование биологического реагента ПК, стандартизация которого по всем свойствам невозможна. Существенное значение имеет концентрация хромогенного субстрата, соответствующая количеству синтезируемого калликреина при взаимодействии испытуемого образца и ПК. Кроме того, стабильность и воспроизводимость результатов этого метода контроля качества подвержена влиянию таких факторов, как соотношение образца и ПК в реакционной смеси, ионная сила и значение pH реакционной смеси, время и температура инкубации [2]. Фармакопейный метод предусматривает возможность выполнения различных методик, характеризующихся вариабельностью перечисленных параметров. Это обстоятельство указывает на необходимость стандартизации метода использованием компонентов СО не только для построения калибровочного графика, но и для подтверждения достоверности, стабильности и воспроизводимости полученных результатов в различных диапазонах в пределах регламентированных значений. Следить за возможными трендами в результатах испытаний и оперативно принимать меры для обеспечения надлежащего качества испытаний позволяют контрольные карты. Опыт использования

<sup>1</sup> Фармакопейная статья 3.3.2.0006.18 Альбумин человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

2.6.15. Prekallikrein activator 04/2016:20615. European Pharmacopoeia. 10th ed.; 2018.

<sup>2</sup> Общая фармакопейная статья 1.8.2.0013.18 Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

<sup>3</sup> Non WHO Reference Material 1st British Reference preparation for prekallikrein activator (PKA). NIBSC code: 79/572. Instructions for use (Version 5.0, Dated 23/05/2012). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/79-572.pdf>  
Certificate prekallikrein activator. USP Catalog No. 1559709, Lot No. F034G0. <https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1559709-F034G0.pdf>

Fox B, Ezeajughi E, Roberts G, Longstaff C, Rigsby P, Regourd E, Terao E. International collaborative study to calibrate proposed 3rd WHO international standard and Ph. Eur. biological reference preparation batch 7 for prekallikrein activator. Expert committee on biological standardization (WHO/BS/2019.2357). WHO; 2019. [https://www.who.int/biologicals/expert\\_committee/BS.2019.2357\\_3rd\\_IS\\_PKA.pdf](https://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS.2019.2357_3rd_IS_PKA.pdf)

<sup>4</sup> Корнилова ОГ. Теоретическое и экспериментальное обоснование подходов к обеспечению специфической безопасности и стандартизации лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека: дис. ... д-ра фарм. наук. М.; 2021.

отечественного отраслевого стандартного образца (ОСО) СОС 42-28-430 «Иммуноглобулин человека (антикомплементарная активность)» в совокупности с контрольными картами Шухарта<sup>5</sup> наглядно продемонстрировал эффективность контроля испытаний ЛП ИГЧ по показателю «Антикомплементарная активность», а также оценки его изменения, связанного со сменой серии реагентов<sup>6</sup>. Один и тот же СО не может быть использован для целей калибровки и оценки пригодности системы / оценки приемлемости результатов испытаний<sup>7</sup>. Применяемые в международной практике СО позволяют стандартизировать качество ЛП по содержанию АПК, но оценить воспроизводимость и приемлемость результатов испытаний с их использованием невозможно.

Цель работы – совершенствование процедуры контроля качества препаратов из плазмы крови человека по содержанию активатора прекалликреина. Для достижения поставленной цели была решена задача разработки нового двухкомпонентного стандартного образца содержания активатора прекалликреина.

## Материалы и методы

### Материалы:

- реагент прекалликреин человека (производства Nyphen Biomed, кат. № PP501, серия F1700635; производства Coachrom Diagnostica, кат. № СОА0022, серии 717551, 703168; производства Enzyme Research Laboratories, кат. № НРК 1302, серия НРК3930; производства EDM Millipore Corporation, кат. № 529583-1MG, серия 2941122; производства ООО Фирма «Технология-Стандарт», серии Д909059, Е001017);
- хромогенный субстрат S-2320 (Chromogenix, серии 0286043, 0789373);
- международный стандартный образец активатора прекалликреина (2nd International standard for prekallikrein activator, NIBSC code: 02/168), аттестованное значение 29 МЕ;
- реагент  $\beta$ -фрагмента фактора Хагемана

(Human Coagulation Factor XIIa Beta, 100 mg, 1,09 mg/ml), Cell Sciences, CSI20178A, серия 4118110;

- альбумин человека, раствор для инфузий, 20%, отечественного производства, флаконы по 100 мл.

### Методы

Для подготовки кандидатов в компоненты СО в альбумин человека, раствор для инфузий, 20% вносили расчетное количество реагента  $\beta$ -фрагмента фактора Хагемана, тщательно перемешивали, избегая вспенивания, и разливали по 1,0 мл в ампулы или флаконы.

Высушивание полученных образцов проводили в сушке лиофильной MSR 18, Uzifroid после предварительного замораживания при температуре минус 70 °С и сушке лиофильной Epsilon 2-4 LSC plus, Martin Christ в стандартных условиях. Точность розлива кандидата в СО во флаконы до высушивания определяли взвешиванием пустого и наполненного флакона. Определение средней массы и отклонение от средней массы лиофилизата проводили весовым методом<sup>8</sup>, содержание остаточной воды – методом К. Фишера<sup>9</sup> и по потере в массе при высушивании<sup>10</sup>.

Содержание АПК определяли хромогенным методом кинетическим тестом и тестом по конечной точке в соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации ОФС.1.8.2.0013.18<sup>11</sup> с использованием анализатора иммунологического MultiskanGo (Thermo Fisher Scientific). Содержание АПК вычисляли с использованием методов построения калибровочной кривой (линейная зависимость скорости изменения оптической плотности в 1 минуту от концентрации АПК или оптической плотности от концентрации АПК) и параллельных шкал при доверительной вероятности 0,95. Расчет среднего арифметического ( $\bar{x}$ ), стандартного отклонения ( $S_x$ ), критерия Фишера ( $F_{exp}$ ), относительное стандартное отклонение ( $RSD$ ) выполняли с помощью формул и табличных данных с использованием програм-

<sup>5</sup> ГОСТ Р ИСО 7870-1-2011. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 1. Общие принципы. ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

<sup>6</sup> Корнилова О.Г. Теоретическое и экспериментальное обоснование ... дис. ... д-ра фарм. наук. М.; 2021.

<sup>7</sup> ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).

<sup>8</sup> Общая фармакопейная статья 1.4.2.0009.15 Однородность массы дозированных лекарственных форм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>9</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.3.0002.15 Определение воды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>10</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>11</sup> Общая фармакопейная статья 1.8.2.0013.18 Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

**Таблица 1.** Содержание активатора прекалликреина в экспериментальных образцах компонентов стандартного образца для определения содержания активатора прекалликреина**Table 1.** Prekallikrein activator content in the components of the prekallikrein activator reference standard

Наименование компонента стандартного образца <i>Reference standard component</i>	Концентрация реагента $\beta$ -фрагмента фактора Хагемана, нг/мл <sup>a</sup> <i>Hageman factor <math>\beta</math>-fragment concentration, ng/mL<sup>a</sup></i>	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл <sup>b</sup> <i>Prekallikrein activator content, IU/mL<sup>b</sup></i>		
		кинетический тест <i>kinetic assay</i>	тест по конечной точке <i>endpoint assay</i>	среднее значение <i>mean value</i>
Компонент для оценки содержания активатора прекалликреина <i>Component for determination of prekallikrein activator content</i>	16	37,4	38,7	38,0
	17	44,7	44,6	45,0
	20	53,3	53,8	54,0
	22	57,4	58,4	58,0
	30	97,0	99,1	98,0
Компонент контроля <i>Control component</i>	2,0	8,3±0,4	8,5±0,4	8,4±0,4
	2,5	10,1±1,6	10,6±1,5	10,4±1,4
	7,0	17,3±2,0	17,9±1,0	17,6±1,6
	9,2	21,7±0,6	22,3±0,4	21,9±0,8
	13,0	26,7±0,8	26,9±0,6	26,8±0,7

<sup>a</sup> Расчетное значение.<sup>b</sup> Для компонента для оценки содержания активатора прекалликреина указано среднее значение  $\bar{x}$  ( $n = 3$ ); для компонента контроля — среднее значение и стандартное отклонение ( $\bar{x} \pm S_x$ ) ( $n = 3$ ).<sup>a</sup> Calculated value.<sup>b</sup> The table gives the mean value  $\bar{x}$  ( $n = 3$ ) for the component for prekallikrein activator determination, and the mean value and standard deviation ( $\bar{x} \pm S_x$ ) ( $n = 3$ ) for the control component.

мы для статистического анализа MS Excel 7.0, а также программы «ПАРАЛАЙН».

По результатам определения содержания АПК в компоненте контроля осуществляли построение контрольных карт Шухарта<sup>12</sup>.

## Результаты и обсуждение

В исследованиях по стандартизации метода определения содержания АПК был обоснован двухкомпонентный СО в виде набора, включающего компонент с содержанием АПК более 35 МЕ/мл, который предназначен для построения калибровочного графика в методике определения АПК (компонент для оценки содержания АПК), и компонент с содержанием АПК менее 35 МЕ/мл, предназначенный для оценки стабильности аналитической работы (компонент контроля) [3]. Значение 35 МЕ/мл является предельно допустимым содержанием АПК в ЛП ИГЧ и ЛП АЧ и соответствует верхней границе калибровочного графика в пределах валидированного диапазона фармакопейного метода<sup>13</sup>. Получение компонентов СО содержания АПК осу-

ществляли добавлением очищенного реагента  $\beta$ -фрагмента фактора Хагемана в 20% раствор альбумина человека. Как видно из данных, представленных в таблице 1, внесение регламентированного количества реагента  $\beta$ -фрагмента фактора Хагемана позволяет получить экспериментальные образцы кандидатов в компоненты СО с заданным содержанием активатора прекалликреина. Кандидаты в компоненты СО содержания активатора прекалликреина после розлива по 1,0 мл в ампулы подвергали замораживанию при температуре не выше минус 70 °С и лиофильному высушиванию на установке для лиофильного высушивания Usifroid<sup>14</sup>. Образцы, полученные данным способом, характеризовались потерей в массе при высушивании до 2,2% и длительным временем растворения лиофилизата (до 35 мин). При использовании аппарата камерного типа Epsilon 2-4 LSC plus процесс лиофилизации кандидатов в компоненты СО, разлитых по 1,0 мл во флаконы, контролировали по температурному режиму, наличию вакуума и электропроводности материала.

<sup>12</sup> ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.<sup>13</sup> Корнилова О.Г. Теоретическое и экспериментальное обоснование ... дис. ... д-ра фарм. наук. М.; 2021.<sup>14</sup> Там же.

**Таблица 2.** Результаты определения характеристик кандидатов в компоненты стандартного образца содержания активатора прекалликреина**Table 2.** Test results for the components of the candidate reference standard for prekallikrein activator content

Наименование характеристики, единицы измерения <i>Parameters, units</i>	Наименование метода <i>Test method</i>	Значение характеристики для компонента стандартного образца, $\bar{x}/\bar{x} \pm S_x$ , RSD (при необходимости) <i>Value obtained for the reference standard component, <math>\bar{x}/\bar{x} \pm S_x</math>, RSD (if necessary)</i>	
		компонент для оценки содержания активатора прекалликреина <i>component for determination of prekallikrein activator content</i>	компонент контроля <i>control component</i>
Средняя масса и отклонение от средней массы лиофилизата ( $n = 10$ ) <i>Average mass and mass variation of the lyophilisate (<math>n = 10</math>)</i>	Весовой <i>Mass variation</i>	0,2063±0,0025 г RSD = 0,9%	0,2070±0,0036 г RSD = 1,7%
Вода ( $n = 3$ ) <i>Water (<math>n = 3</math>)</i>	К. Фишера <i>K. Fischer</i>	0,29%	0,33%
Время получения восстановленного раствора ( $n = 4$ ) <i>Reconstitution time (<math>n = 4</math>)</i>	Хронометрический <i>Chronometric</i>	11 мин <i>11 min</i>	12 мин <i>12 min</i>

По окончании лиофилизации укупоривание образцов под вакуумом резиновыми пробками осуществляли в камере сразу после высушивания. Остаточное содержание воды в образцах, высушенных в аппарате камерного типа, не превысило 0,33%, время получения восстановленного раствора сократилось до 11–12 мин, однородность серии кандидатов в компоненты СО подтвердили оценкой средней массы и отклонения от средней массы (табл. 2).

Унификация метода определения содержания АПК предопределяет необходимость использования всех доступных реагентов ПК для аттестации СО. В то же время использование реагента ПК одного производителя позволит уменьшить неопределенность аттестованного значения. С этой целью СО укомплектовали реагентом ПК отечественного производства. Установление аттестованного значения содержания АПК в компонентах СО проводили по результатам, полученным в одной лаборатории, с привлечением двух исследователей, хромогенным методом кинетическим тестом и тестом по конечной точке в соответствии с ОФС.1.8.2.0013.1815 с использованием всех доступных реагентов прекалликреина (для СО 42-28-445 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина») и использованием реагента ПК, входящего в комплект набора (для СО 42-28-446 «Набор для определения содержания ак-

тиватора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином))<sup>16</sup>.

Использование компонента контроля целесообразно в диапазоне значений, наиболее близких к предполагаемому содержанию АПК в испытуемом образце. Для аттестации компонент для оценки содержания АПК восстанавливали в 1,0 мл воды очищенной, компонент контроля – в 1,0 и в 2,0 мл воды очищенной. Так как компонент для оценки содержания АПК используется для построения калибровочного графика, его аттестованное значение выражали средним значением; аттестованным значением компонента контроля считали диапазон, равный плюс/минус двум стандартным отклонениям от среднего значения (табл. 3, 4).

На основании результатов, представленных в таблице 3, серия 1 СО 42-28-445 была аттестована со значениями содержания активатора прекалликреина:

- компонент для оценки содержания АПК – 51 МЕ;
- компонент контроля: при восстановлении в 1,0 мл воды очищенной 8,3–11,9 МЕ/мл, при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной 5,4–6,6 МЕ/мл (с доверительной вероятностью 0,95).

На основании результатов, представленных в таблице 4, серия 1 СО 42-28-446 была аттестована со значениями содержания активатора прекалликреина:

- компонент для оценки содержания АПК – 51 МЕ;

<sup>15</sup> Общая фармакопейная статья 1.8.2.0013.18 Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

<sup>16</sup> Корнилова О.Г. Теоретическое и экспериментальное обоснование ... дис. ... д-ра фарм. наук. М.; 2021.

**Таблица 3.** Содержание активатора прекалликреина в компонентах ОСО 42-28-445 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина»

**Table 3.** Prekallikrein activator content in the components of the IRS 42-28-445 “Kit for determination of prekallikrein activator content”

Наименование компонента <i>Component</i>	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x}/\bar{x}\pm S_x$ , МЕ/мл ( $p = 0,95$ ) ( $n = 18$ ) <i>Prekallikrein activator content,</i> $\bar{x}/\bar{x}\pm S_x$ , IU/mL ( $p = 0,95$ ) ( $n = 18$ )			Коэффициент вариации, % <i>Coefficient of variation, %</i>
	кинетический тест <i>kinetic assay</i>	тест по конечной точке <i>endpoint assay</i>	среднее значение <i>mean value</i>	
для оценки содержания активатора прекалликреина <i>for prekallikrein activator determination</i>	50,9±0,7	51,0±1,4	51,0±1,6	3,1
для контроля (при восстановлении в 1,0 мл) <i>control (when reconstituted in 1.0 mL)</i>	10,1±0,9	10,1±0,8	10,1±0,9	8,5
контроля (при восстановлении в 2,0 мл) <i>control (when reconstituted in 2.0 mL)</i>	6,0±0,3	6,0±0,2	6,0±0,3	4,2

– компонент контроля: при восстановлении в 1,0 мл воды очищенной 9,1–11,1 МЕ/мл; при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной 5,6–6,4 МЕ/мл (с доверительной вероятностью 0,95).

Результаты сравнительной оценки линейности и параллелизма линий регрессии для международного стандартного образца активатора прекалликреина и компонента для оценки содержания АПК разработанного нами СО (в обеих комплектациях) позволили сделать вывод об отсутствии статистически значимых различий между ними ( $F_{\text{exp}} < F_{\text{theor}}$ ) (табл. 5).

Соответствие содержания АПК в компоненте контроля аттестованным значениям

свидетельствует о выполнении требований к критерию пригодности системы и является основанием для учета результатов испытаний исследуемых образцов. Инструментом статистического анализа процесса испытаний являются контрольные карты Шухарта индивидуальных значений (X-карта), представляющие собой графики, на которых по горизонтальной оси откладывают порядковый номер испытаний, а по вертикальной – результат испытаний.

Для оценки стабильности аналитической работы на карты наносят графическое обозначение аттестованного (среднего) значения анализируемого показателя в компоненте контроля стандартного образца (центральная линия),

**Таблица 4.** Содержание активатора прекалликреина в компонентах ОСО 42-28-446 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином)

**Table 4.** Prekallikrein activator content in the components of the IRS 42-28-446 “Kit for determination of prekallikrein activator content” (supplied with prekallikrein)

Наименование компонента <i>Component</i>	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x}/\bar{x}\pm S_x$ , МЕ/мл ( $p = 0,95$ ) ( $n = 18$ ) <i>Prekallikrein activator content,</i> $\bar{x}/\bar{x}\pm S_x$ , IU/mL ( $p = 0,95$ ) ( $n = 18$ )			Коэффициент вариации, % <i>Coefficient of variation, %</i>
	кинетический тест <i>kinetic assay</i>	тест по конечной точке <i>endpoint assay</i>	среднее значение <i>mean value</i>	
для оценки содержания активатора прекалликреина <i>for prekallikrein activator determination</i>	50,9±0,9	51,0±1,0	51,0±0,9	1,9
для контроля (при восстановлении в 1,0 мл) <i>control (when reconstituted in 1.0 mL)</i>	10,2±0,4	10,1±0,6	10,1±0,5	5,0
для контроля (при восстановлении в 2,0 мл) <i>control (when reconstituted in 2.0 mL)</i>	6,0±0,2	6,0±0,1	6,0±0,2	2,7

**Таблица 5.** Оценка зависимости изменения оптической плотности или оптической плотности от концентрации активатора прекалликреина в компонентах стандартного образца для определения содержания активатора прекалликреина<sup>17</sup>**Table 5.** Estimation of absorbance/change in absorbance as a function of prekallikrein activator concentration in the reference standard components for determination of prekallikrein activator content<sup>17</sup>

Наименование теста <i>Assay</i>	Реагент прекалликреина <sup>а</sup> <i>Prekallikrein reagent<sup>а</sup></i>	Уравнение линейной регрессии <i>Linear regression equation</i>	Коэффициент детерминации <i>Coefficient of determination</i>	Параллелизм <i>Parallelism</i>		Линейность <i>Linearity</i>	
				$F_{теор}$ $F_{теор}$	$F_{эксп}$ $F_{эксп}$	$F_{теор}$ $F_{теор}$	$F_{эксп}$ $F_{эксп}$
Кинетический тест <i>Kinetic assay</i>	1	$y=0,0021x+0,0016$	0,9942	9,55	0,00	9,01	0,65
	2	$y=0,0012x+0,0007$	0,9969	6,94	0,82	6,16	0,34
	3	$y=0,0005x+0,0002$	0,9993	6,94	0,05	6,16	0,67
	4	$y=0,0004x+0,0003$	0,9970	6,94	0,43	6,16	0,13
	5	$y=0,0017x+0,0039$	0,9984	5,59	1,21	4,35	2,79
Тест по конечной точке <i>Endpoint assay</i>	1	$y=0,054x+0,1111$	0,9902	9,55	0,00	9,01	0,65
	2	$y=0,0328x+0,0394$	0,9912	6,94	0,09	6,16	0,40
	3	$y=0,0149x+0,0686$	0,9975	9,55	0,00	9,28	0,18
	4	$y=0,0102x+0,0785$	0,9986	6,94	0,74	6,16	0,30
	5	$y=0,0235x+0,0228$	0,9929	5,32	0,26	3,84	2,58

<sup>а</sup> Использованы реагенты прекалликреина, производства: 1 – Calbiochem, EMD Millipore Corporation; 2 – Enzyme Research Laboratories; 3 – Hyphen Biomed; 4 – CoaChrom Diagnostica; 5 – ООО Фирма «Технология-Стандарт».

<sup>а</sup> Prekallikrein reagents produced by: 1–Calbiochem, EMD Millipore Corporation; 2–Enzyme Research Laboratories; 3–Hyphen Biomed; 4–CoaChrom Diagnostica; 5–“Tehnologiya-Standart” LLC.

а также линии, обозначающие контрольные границы на расстоянии  $\pm$  двух ( $\pm 2S$ ) и  $\pm$  трех ( $\pm 3S$ ) стандартных отклонений вверх и вниз от среднего значения. Выход результатов за контрольные границы и оценка расположения на карте точек, соответствующих результатам испытаний, должны анализироваться: например, расположение девяти результатов выше или ниже средней линии или шести возрастающих или уменьшающихся результатов подряд может свидетельствовать о появлении систематических влияющих факторов, которые должны быть выявлены<sup>18</sup>.

На рисунках 1 и 2 представлены результаты испытаний ЛП ИГЧ и ЛП АЧ по содержанию АПК с одновременным использованием компонента контроля ОСО 42-28-445-2020 (серия 1) или ОСО 42-28-446-2020 (серия 1). Указанная на каждой контрольной карте центральная

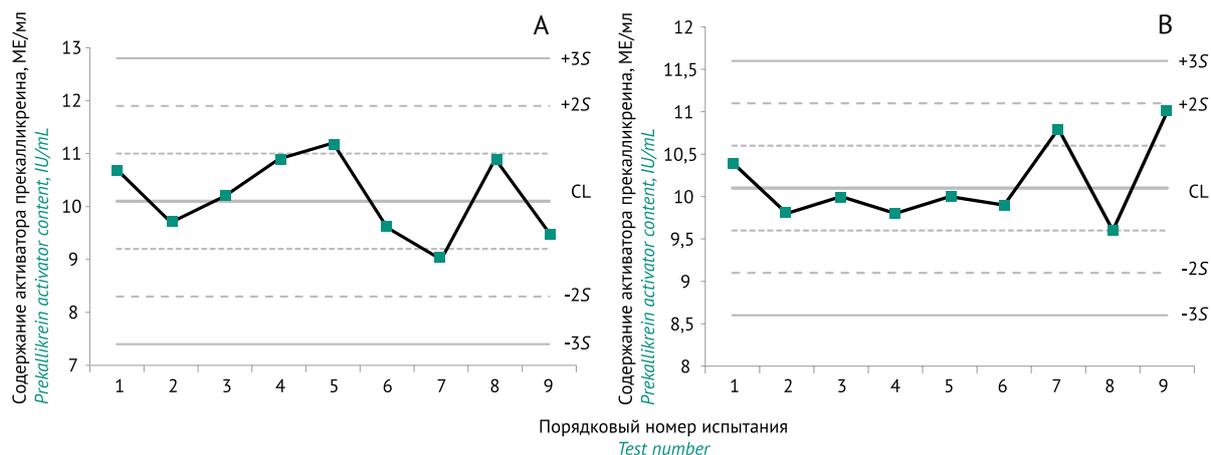
линия соответствует аттестованному значению содержания АПК в компоненте контроля для используемой серии СО, границы поля допуска, соответствуют двум и трем стандартным отклонениям аттестованного значения АПК.

Анализ графиков, представленных на рисунках 1А, 2А, с учетом используемых реагентов ПК различных производителей (точки с 1 по 4 – Hyphen Biomed, точки 5 и 6 – CoaChrom; точка 7 – ООО Фирма «Технология Стандарт», остальные точки – Enzym Research), и графиков, представленных на рисунках 1В, 2В, с учетом используемых серий реагента ПК (точки 1–6 – одна серия, точки 7–9 – другая серия), позволяет сделать вывод об отсутствии влияния смены производителя реагента или серии реагента ПК на стабильность результатов анализа.

С 01.07.2021 в соответствии с Приказом Минздрава России от 20.03.2020 № 202 био-

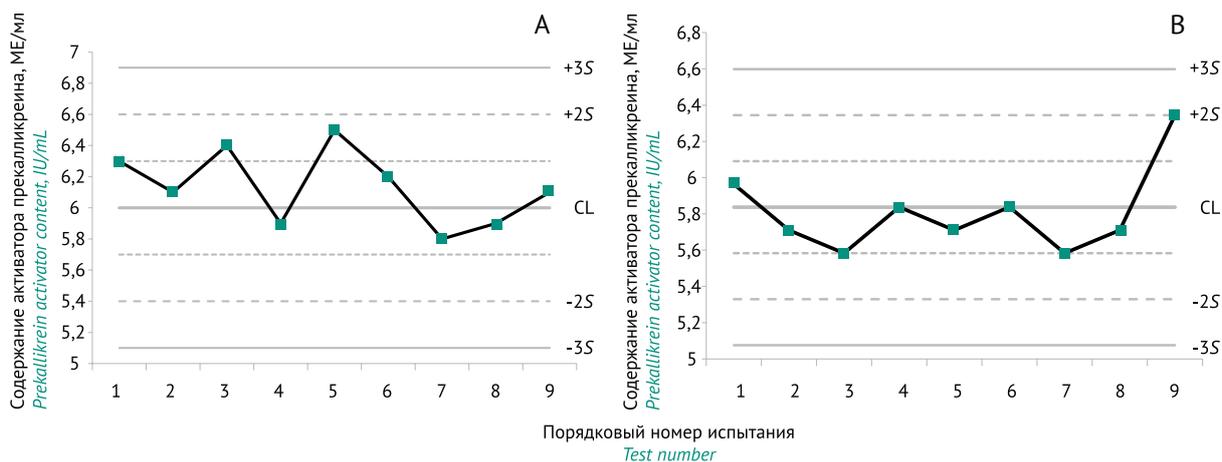
<sup>17</sup> Там же.

<sup>18</sup> ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.



**Рис. 1.** Контрольная карта для оценки стабильности процесса испытаний по показателю «Активатор прекалликреина» с использованием компонента контроля ОСО 42-28-445-2020 (А) и ОСО 42-28-446-2020 (В), восстановленного в 1,0 мл воды очищенной. +3S и +2S – верхние контрольные границы; -3S и -2S – нижние контрольные границы, CL – центральная линия.

**Fig. 1.** Control chart for assessing the analytical process consistency in terms of the “Prekallikrein activator” test parameter, using the control components of the IRS 42-28-445-2020 (A) and IRS 42-28-446-2020 (B), reconstituted in 1.0 mL of purified water. +3S and +2S—upper control limits; -3S and -2S—lower control limits, CL—centre line.



**Рис. 2.** Контрольная карта для оценки стабильности аналитической работы в испытаниях по показателю «Активатор прекалликреина» с использованием компонента контроля ОСО 42-28-445-2020 (А) и ОСО 42-28-446-2020 (В), восстановленного в 2,0 мл воды очищенной. +3S и +2S – верхние контрольные границы; -3S и -2S – нижние контрольные границы, CL – центральная линия.

**Fig. 2.** Control chart for assessing the analytical process consistency in terms of the “Prekallikrein activator” test parameter, using the control components of the IRS 42-28-445-2020 (A) and IRS 42-28-446-2020 (B), reconstituted in 2.0 mL of purified water. +3S and +2S—upper control limits; -3S and -2S—lower control limits, CL—centre line.

логические ОСО имеют статус Фармакопейных стандартных образцов (ФСО) Государственной фармакопеи Российской Федерации<sup>19</sup>. Реестровый номер стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» ФСО 3.1.00445 (ОСО 42-28-445); стандартного образца «Набор для определения содержания активатора пре-

калликреина» (в комплекте с прекалликреином) ФСО 3.1.00446 (ОСО 42-28-446).

### Заключение

Использование метода добавления высокоочищенного реагента β-фрагмента фактора Хагемана в 20% раствор альбумина человека позволило разработать новый двухкомпо-

<sup>19</sup> Приказ Минздрава России от 20.03.2020 № 202 «О Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения» (вместе с «Положением о Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»). [http://www.regmed.ru/content/page/SPhRS\\_docs](http://www.regmed.ru/content/page/SPhRS_docs)

нентный СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» с регламентированным содержанием активатора прекалликреина более 35 МЕ/мл в компоненте для оценки содержания АПК и менее 35 МЕ/мл в компоненте контроля и усовершенствовать процедуру контроля качества препаратов из плазмы крови человека по содержанию АПК. Предложены две комплектации СО, одна из которых может использоваться с любым реагентом ПК (ФСО 3.1.00445 (ОСО 42-28-445)), вторая – с реагентом ПК, входящим в состав комплекта (ФСО 3.1.00446 (ОСО 42-28-446)). Аттестованное значение содержания активатора прекалликреина составило: в компоненте для оценки содержания активатора прекалликреина – 51 МЕ; в компоненте контроля ФСО 3.1.00445 (ОСО 42-28-445) при восстановлении в 1,0 мл воды очищен-

ной – 8,3–11,9 МЕ/мл, при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной – 5,4–6,6 МЕ/мл; в компоненте контроля ФСО 3.1.00446 (ОСО 42-28-446) – 9,1–11,1 и 5,6–6,4 МЕ/мл соответственно. Указанная на каждой контрольной карте центральная линия соответствует аттестованному значению содержания АПК в компоненте контроля для используемой серии СО, границы поля допуска соответствуют двум и трем стандартным отклонениям аттестованного значения АПК.

Построение контрольных карт Шухарта для результата анализа СО для определения содержания АПК может быть использовано для оценки стабильности аналитической работы при проведении испытаний лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по показателю качества «Активатор прекалликреина».

## Литература/References

1. Messadi-Laribi E, Griol-Charhbil V, Gaies E, Vincent MP, Heudes D, Meneton P, et al. Cardioprotection and kallikrein-kinin system in acute myocardial ischaemia in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(4):489–93. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04902.x>
2. Корнилова ОГ, Кривых МА, Коновалова ЕС, Борисевич ИВ. Разработка методики определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(3):53–7 [Kornilova OG, Krivykh MA, Konovalova ES, Borisevich IV. Development of method for determining the content of prekalikrein activator in medicinal preparations of human immunoglobulins and albumin. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(3):53–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-3-53-57>
3. Корнилова ОГ, Кривых МА, Воропаев АА, Хуснатдинова ЕА. Стандартный образец содержания активатора прекалликреина в препаратах крови человека. Патент Российской Федерации № 2756159; 2020. [Kornilova OG, Krivykh MA, Voropaev AA, Husnatdinova EA. A standard sample of the content of the prekalikrein activator in human blood preparations. Patent of the Russian Federation No. 2756159; 2020 (In Russ.)]

**Вклад авторов.** *О.Г. Корнилова* – идея исследования, проведение экспериментальных исследований, обобщение материала, написание, доработка текста рукописи; *М.А. Кривых* – сбор и систематизация данных, анализ и интерпретация результатов исследования; *А.А. Воропаев* – проведение экспериментальных исследований, обобщение материала, написание рукописи, оформление графического материала; *О.В. Фадейкина* – систематизация данных, анализ и интерпретация результатов исследования; *Р.А. Волкова* – анализ и интерпретация результатов исследования, доработка текста рукописи для публикации. **Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4). **Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Authors' contributions.** *O.G. Kornilova*—elaboration of the study idea, conducting experimental research, summarising the obtained data, writing and editing of the paper; *M.A. Krivykh*—collection and systematisation of data, analysis and interpretation of the research results; *A.A. Voropaev*—conducting experimental research, summarising the obtained data, writing of the paper, preparation of the graphs; *O.V. Fadeikina*—systematisation of the obtained data, analysis and interpretation of the research results; *R.A. Volkova*—analysis and interpretation of the research results, revision and editing of the paper. **Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4). **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

**Корнилова Ольга Геннадьевна**, д-р фарм. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>  
[Kornilova@expmed.ru](mailto:Kornilova@expmed.ru)

**Кривых Максим Андреевич**, канд. фарм. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2003-1264>  
[Krivykh@expmed.ru](mailto:Krivykh@expmed.ru)

**Воропаев Андрей Андреевич**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>  
[voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

**Фадеекина Ольга Васильевна**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>  
[Fadeikina@expmed.ru](mailto:Fadeikina@expmed.ru)

**Волкова Рауза Асхатовна**, д-р биол. наук. ORCID:  
<https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>  
[Volkova@expmed.ru](mailto:Volkova@expmed.ru)

*Поступила 26.08.2021*

*После доработки 15.02.2022*

*Принята к публикации 11.03.2022*

**Olga G. Kornilova**, Dr. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>  
[Kornilova@expmed.ru](mailto:Kornilova@expmed.ru)

**Maksim A. Krivykh**, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2003-1264>  
[Krivykh@expmed.ru](mailto:Krivykh@expmed.ru)

**Andrey A. Voropaev**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>  
[voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

**Olga V. Fadeikina**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>  
[Fadeikina@expmed.ru](mailto:Fadeikina@expmed.ru)

**Rausa A. Volkova**, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>  
[Volkova@expmed.ru](mailto:Volkova@expmed.ru)

*Received 26 August 2021*

*Revised 15 February 2022*

*Accepted 11 March 2022*



## Валидация методики определения специфической активности интерферона бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус

Ю.Н. Лебедева<sup>1</sup>, Н.А. Литвинова<sup>2</sup>, Т.Н. Лобанова<sup>1</sup>, Р.Р. Шукуров<sup>2</sup>, Р.А. Хамитов<sup>2</sup>, Л.А. Гайдерова<sup>1</sup>✉

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

<sup>2</sup> Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Гайдерова Лидия Александровна; [gaiderova@expmed.ru](mailto:gaiderova@expmed.ru)

### Резюме

В настоящее время при лечении рассеянного склероза доказана эффективность препаратов интерферона бета. Одним из важнейших показателей качества, отражающих эффективность и безопасность лекарственных препаратов интерферона бета, является специфическая противовирусная активность. Для определения активности интерферона бета используют биологический метод, который может давать ошибку конечного результата за счет неопределенностей системы, вносящих свой вклад в общую погрешность. В связи с тем что точность оценки величины специфической активности позволяет гарантировать необходимую терапевтическую дозу препарата, особую актуальность приобретает стандартизация и валидация метода определения данного показателя. **Цель работы:** валидация методики определения специфической активности препаратов интерферона бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус. **Материалы и методы:** в исследовании использовали клетки WISH, Vero, A-549, MDBK в комбинации с вирусом энцефаломиокардита мышей. Испытания проводили биологическим методом, основанным на способности интерферона подавлять цитопатическое действие вируса в культуре клеток. Учет результатов осуществляли с использованием методов математической статистики и пакета программ GraphPadPrism, Statistica 2/0. **Результаты:** представлены данные сравнительного анализа результатов определения специфической активности препарата Инфибета® (интерферон бета-1b) с использованием различных сочетаний клетка/вирус. Сравнение результатов проводили по характеристикам графика зависимости «доза–эффект». Показано, что все испытанные клеточные линии пригодны для постановки методики определения активности интерферона бета биологическим методом. Однако наилучшие результаты получены с использованием клеток A-549, WISH в сочетании с вирусом энцефаломиокардита мышей. На указанных системах клетка/вирус провели определение валидационных характеристик: специфичность, линейность, прецизионность, робастность. **Выводы:** валидирована методика, позволяющая измерять специфическую активность интерферона бета в диапазоне 4,8–11,2 МЕ/мл с удовлетворительной точностью, что гарантирует получение достоверных результатов анализа. Показана устойчивость методики и ее внутри- и межлабораторная воспроизводимость.

**Ключевые слова:** интерферон бета; специфическая активность; клеточные культуры; вирус; кривая зависимости «доза–эффект»; валидация; критерии приемлемости; оценка валидационных характеристик

**Для цитирования:** Лебедева Ю.Н., Литвинова Н.А., Лобанова Т.Н., Шукуров Р.Р., Хамитов Р.А., Гайдерова Л.А. Валидация методики определения специфической активности интерферона бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(1):60–79. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-60-79>

## Validation of a test procedure for determination of specific activity of human recombinant interferon beta (Infibeta®) using various cell/virus combinations

Yu.N. Lebedeva<sup>1</sup>, N.A. Litvinova<sup>2</sup>, T.N. Lobanova<sup>1</sup>, R.R. Shukurov<sup>2</sup>, R.A. Khamitov<sup>2</sup>, L.A. Gaiderova<sup>1,✉</sup>

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

<sup>2</sup> Generium JSC, 14 Vladimirsкая St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Lidiya A. Gaiderova; [gaiderova@expmed.ru](mailto:gaiderova@expmed.ru)

### Abstract

Interferon beta preparations have demonstrated efficacy in the treatment of multiple sclerosis. One of the most important quality attributes that support efficacy and safety of interferon beta preparations is specific antiviral activity. Interferon beta activity is determined by the biological test method which can lead to an erroneous final result due to the system uncertainties that contribute to the overall uncertainty. Accurate assessment of specific activity plays an important role in adequate determination of the product's therapeutic dose, therefore the test method standardisation and validation are of particular relevance. **The aim of the study** was to validate a test procedure for assessing specific activity of human recombinant interferon beta preparations, using various cell/virus combinations, as illustrated by the example of Infibeta®. **Materials and methods:** WISH, Vero, A-549, and MDBK cells in combination with mouse encephalomyocarditis virus were used in the study. The testing was performed using the biological test method based on the interferon ability to suppress virus-induced cytopathic effects in cell cultures. The results were processed using methods of mathematical statistics and the Graph-PadPrism, Statistical 2/0 software package. **Results:** the paper compares the results of specific activity determination of Infibeta® (interferon beta-1b) using various cell/virus combinations. The dose-response curves were used to compare the test results. It was demonstrated that all the tested cell lines could be used in the biological test procedure for determination of interferon beta specific activity. However, the best results were obtained with A-549, WISH cells in combination with mouse encephalomyocarditis virus. The following validation characteristics were determined in the cell/virus systems: specificity, linearity, precision, and robustness. **Conclusions:** the study validated the test procedure that enables measurement of interferon beta specific activity in the range of 4.8–11.2 IU/mL at a satisfactory accuracy level, which guarantees reliable test results. The study demonstrated robustness, intermediate precision, and reproducibility of the test procedure.

**Key words:** interferon beta; specific activity; cell cultures; virus; dose–response curve; validation; acceptance criteria; assessment of validation parameters

**For citation:** Lebedeva Yu.N., Litvinova N.A., Lobanova T.N., Shukurov R.R., Khamitov R.A., Gaiderova L.A. Validation of a test procedure for determination of specific activity of human recombinant in-

terferon beta (Infibeta®) using various cell/virus combinations. *BIОpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):60–79. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-60-79>

## Введение

Одной из сложнейших комплексных и глобальных медико-социальных проблем, существующих как в Российской Федерации, так и во всем мире, считается проблема диагностики и лечения рассеянного склероза (РС). Рассеянный склероз – хроническое заболевание центральной нервной системы (ЦНС), в основе патогенеза которого лежат иммунные механизмы повреждения миелиновой оболочки с последующим присоединением атрофических процессов. Терапия РС имеет большое социально-экономическое значение в связи с большим распространением заболевания среди лиц молодого и трудоспособного возраста, у которых оно вызывает ограничение или потерю трудоспособности вследствие нарастания необратимого поражения ЦНС [1].

Учитывая ведущую роль в РС иммунологических нарушений, основным подходом к селективной иммунокоррекции при рассеянном склерозе является направленное воздействие на избыточную продукцию активирующих цитокинов и стимуляцию выработки *in vivo* провоспалительных цитокинов. К препаратам, основным действием которых является влияние на продукцию цитокинов, относятся препараты интерферона бета (ИФН бета), доказавшие клиническую эффективность в ходе многоцентровых клинических исследований двойным слепым методом [2, 3]. Точный механизм действия интерферонов при РС неизвестен. Считается, что ИФН бета снижает продукцию провоспалительных цитокинов – ФНО- $\alpha$  и интерферона гамма, замедляет пролиферацию Т-клеток, стимулирует выработку противовоспалительных цитокинов IL-10 и трансформирующего фактора роста бета-1, снижает экспрессию молекул гистосовместимости II класса и молекул адгезии, тем самым уменьшая антиген-представление в ЦНС и проницаемость гематоэнцефалического барьера [4].

В клинической практике в качестве первой линии терапии при рассеянном склерозе в Российской Федерации применяют рекомбинантные формы ИФН бета: ИФН бета-1а и ИФН бета-1b [2, 5].

Наиболее известны и используются для лечения РС препараты на основе ИФН бета-1b: референтный препарат Бетаферон® и его отечественный биоаналог Инфибета®. Опыт применения этих препаратов показал значительное снижение числа обострений, более легкое их течение, снижение по данным магнитно-резонансной томографии общей площади очагов воспаления [6]. Кроме того, показано, что при использовании препарата Инфибета® частота и выраженность основных клинических побочных реакций была значимо ниже, чем у других препаратов ИФН бета, применяемых в высоких дозах [7, 8].

Одним из важнейших показателей качества, отражающих эффективность и безопасность лекарственных препаратов ИФН бета, является специфическая активность. Для определения активности ИФН бета используют биологический метод, в основе которого – подавление цитопатического действия вирусов в чувствительных культурах клеток<sup>1</sup>. Использование в процедуре биологических объектов, особо чувствительных к изменению внешних условий, способствует большой вариабельности результатов определения по сравнению с химическими методами. Тем не менее биологические методы должны отвечать соответствующим стандартам точности и надежности, так как объективная информация о величине специфической активности, точность ее оценки позволяет обеспечить дозу препарата, гарантирующую необходимый терапевтический эффект. Таким образом, точное определение специфической активности важно для обеспечения эффективности и безопасности применения препаратов ИФН бета, в связи с чем особую актуальность приобретает стандартизация и валидация метода определения данного показателя.

Цель работы – валидация методики определения специфической активности препаратов ИФН бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: выбор красителя для проведения анализа; выбор наиболее подходящей для постановки методики

<sup>1</sup> Общая фармакопейная статья 1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2; 2018.

системы клетка/вирус на основе сравнительного анализа результатов определения специфической активности ИФН бета; определение валидационных характеристик методики.

## Материалы и методы

Для проведения исследований были использованы следующие основные материалы:

- Инфибета®, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, 9,6 млн МЕ (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия);
- Бетаферон®, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, 9,6 млн МЕ (Байер Фарма АГ, Германия);
- международный стандартный образец ИФН бета Working standard interferon beta ser17 mutein, human rDNA derived (NIBSC code: 00/574) (МСО);
- стандартный образец, аттестованный относительно международного стандартного образца (СО);
- среда минимальная с L-глутамином и NEAA (MEM) (Invitrogen-GIBCO, США, кат. № 32561029);
- натрия бикарбонат (Sigma-Aldrich, кат. № S8875);
- пенициллин-стрептомицин, 100-кратный лиофилизированный (ООО НПП «ПанЭко», Россия, кат. № А065);
- трипсин-ЭДТА (10×) (Lonza, Швейцария, кат. № BE17-160E);
- эмбриональная бычья сыворотка (HyClone®, США, кат. № SV 30160);
- диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma-Aldrich, кат. № 472301);
- 0,4% раствор трипанового синего (Sigma-Aldrich, кат. № T8154);
- кристаллический фиолетовый (Merck, Германия, кат. № 1.15940.0025);
- набор для оценки пролиферации клеток ХТТ (реактив ХТТ), включающий раствор соли тетразолия ХТТ и реагент для активации (PanReac, AppliChem, кат. № А8088, или Roche, Merck, Sigma-Aldrich, кат. № 11465015001, или АТСС, кат. № 30-1011К);
- клеточные линии, чувствительные к интерферону: линия клеток амниона человека WISH (АТСС® CCL-25™); линия клеток карциномы протока легкого А-549 (АТСС® CCL-185™); линия клеток почки африканской зеленой мар-тышки Vero (АТСС® CCL-81™); линия клеток почки крупного рогатого скота MDBK (коллекция ФБНУ ГНЦ ВБ «Вектор», АТСС® CCL 22™;

ЕССАСС 90050801; РККК; колл. шифр № 110);

- индикаторный вирус энцефаломиокардита мышей (вирус EMCV) (АТСС® VR-1762™);
- планшеты 96-луночные (Corning, США, кат. № 3599).

Определение специфической активности проводили биологическим методом, который основан на способности ИФН бета-1b подавлять цитопатическое действие индикаторного вируса на культуре клеток, чувствительных к интерферону, в сравнении со стандартным образцом<sup>2</sup>.

### Получение рабочей суспензии клеток

Клеточные линии культивировали в ростовой среде MEM с добавлением 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 1–1,5 г/л натрия бикарбоната для поддержания рН в стандартных условиях: температура 37±1 °С, содержание углекислого газа в атмосфере инкубатора 5,0±0,5%. Пересев клеток осуществляли 3 раза в неделю до посевной плотности не более 0,2 млн клеток/мл и жизнеспособности не менее 85%. Перед анализом активности ИФН бета культуральные флаконы с клетками просматривали под микроскопом и отбирали культуры в логарифмической фазе роста с активно делящимися жизнеспособными клетками, сформировавшими монослой на внутренней поверхности флакона.

Из флакона удаляли ростовую среду и добавляли 1,0–2,0 мл 0,25% раствора Трипсин-ЭДТА, равномерно распределяли его по поверхности клеток покачиванием и выдерживали в течение 5–10 мин, контролируя отслоение клеток под микроскопом, затем вносили 6–8 мл ростовой среды, переносили содержимое в центрифужную пробирку и отмывали от остатков трипсина центрифугированием при 125 g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в 10 мл ростовой среды и определяли количество жизнеспособных.

### Определение титра вируса

За титр вируса принимали величину, обратную разведению, в котором поражение клеточного монослоя в лунках составляет 50%. Титр вируса определяли для каждой серии исследуемого вируса, его величина составляла не менее 10<sup>5</sup> ТЦД<sub>50</sub> (тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток).

Для определения титра вируса клетки в состоянии монослоя с конфлюэнтностью 80–90% инфицировали разведениями вирусной суспензии

<sup>2</sup> Общая фармакопейная статья 1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2; 2018.

от  $10^{-2}$  до  $10^{-10}$  в поддерживающей среде (среда MEM с добавлением 2% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки и 1,0–1,5 г/л натрия бикарбоната). С помощью окрашивания солями тетразолия определяли наибольшее разведение вируса, соответствующее ТЦД<sub>50</sub>. Проводили спектрофотометрию окрашенных клеток в лунках планшета при длине волны 450–500 нм с референсом 650–690 нм относительно воздуха. По результатам измерений строили кривую титрования, отражающую зависимость количества живых клеток (ось ординат) от десятичного логарифма фактора разведения вируса (ось абсцисс). Определяли значение десятичного логарифма разведения, соответствующего 50% выживанию клеток в лунках, с использованием статистической программы GraphPadPrism. Для определения цитопатического действия вируса на клетку использовали дозу вируса 100 ТЦД<sub>50</sub>. За титр (активность) вирусной суспензии принимали величину, обратную десятичному логарифму разведения ( $\lg EC_{50}$ ).

#### **Проведение анализа специфической активности интерферона бета**

Испытание для каждого образца проводили в трех независимых повторностях, используя индивидуальный планшет. Готовили последовательные двукратные разведения образцов испытуемых препаратов ИФН бета и стандартного образца в поддерживающей среде начиная с 150 МЕ/мл и вносили в 96-луночный планшет со сформированным клеточным монослоем, используя по 4 лунки на каждое разведение. После 24 ч инкубации в лунки планшета, содержащие двукратные разведения стандартного и испытуемого образцов, вносили по 50 мкл вирусной суспензии в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Одновременно с внесением вирусной суспензии осуществляли контроль дозы вируса – вносили по 50 мкл 10-кратных разведений вирусной суспензии начиная с разведения 100 ТЦД<sub>50</sub> до разведения 0,1 ТЦД<sub>50</sub> с 10-кратным шагом.

Планшеты инкубировали в стандартных условиях в течение  $48 \pm 3$  ч, до появления признаков цитопатических изменений в клеточном монослое с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД<sub>50</sub>. Клеточный монослой в лунках с вирусом в дозе 0,1 ТЦД<sub>50</sub> должен соответствовать состоянию клеток в контрольных лунках (контроль под микроскопом). Окрашивание проводили кристаллическим фиолетовым или реактивом ХТТ.

#### **Учет и оценка результатов**

Планшеты помещали в планшетный спектрофотометр и определяли оптическую плотность

содержимого каждой лунки при длине волны 450–500 нм с референсом 650–690 нм относительно воздуха. Расчет специфической активности проводили с использованием пакета статистических программ GraphPadPrism. Результаты получали после введения в программу значений оптической плотности для каждой лунки и построения четырехпараметрической дозозависимой кривой. С этой целью в программе выбирали тип анализа *XY tables*, при котором каждая точка определяется двумя координатами (XY). Для каждой точки вводили значения четырех повторов (по числу лунок). В появившейся таблице для значений X вводили активность препарата в МЕ/мл. Для значений Y вводили оптические плотности содержимого лунок. Оценку результатов проводили с помощью нелинейного регрессионного анализа с построением сигмоидальных дозозависимых кривых и использованием четырехпараметрической статистической модели.

При расчете активности ИФН бета-1b по сигмоидальным кривым разведений испытуемого и стандартного образцов должны соблюдаться следующие условия: полученные величины оптических плотностей разведений испытуемого и стандартного образцов должны находиться в диапазоне между значениями оптических плотностей контрольных лунок.

При расчетах результатов использовали методы математической статистики и пакет программ GraphPadPrism, Statistica 2/0.

Коэффициент детерминации ( $R^2$ ) – характеризует степень зависимости между регрессионной моделью и исходными данными.  $R^2$  вычисляли по формуле (1):

$$R^2 = \frac{[\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})]^2}{\sum(X - \bar{X})^2 \sum(Y - \bar{Y})^2}, \quad (1)$$

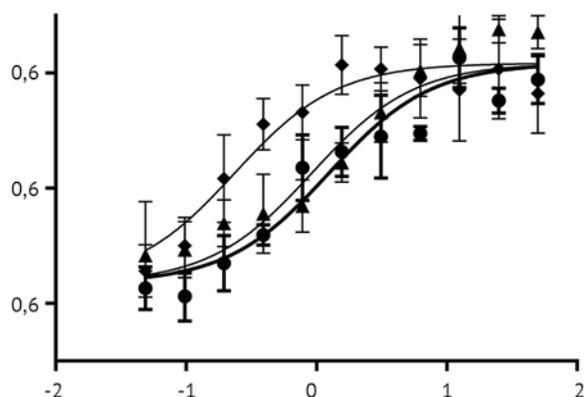
где  $X$  и  $Y$  – индивидуальные значения независимой и зависимой переменных соответственно, а  $\bar{X}$  и  $\bar{Y}$  – средние значения тех же переменных.

## **Результаты и обсуждение**

### **Выбор красителя для проведения анализа**

Обычно при инструментальном учете результатов определения специфической активности ИФН бета для окраски жизнеспособных клеток, не подвергшихся цитопатическому действию вируса, используют различные красители: кристаллический фиолетовый, МТТ, ХТТ и др. [9–11].

На первом этапе исследований испытывали комбинацию А-549/EMCV. При этом для окраши-



Parameter	15 min	10 min	5 min
$R^2$	0,8628	0,8449	0,7771
$EC_{50}$	1,244	0,9195	0,2355

**Рис. 1.** Кривые зависимости «доза–эффект» при определении активности препарата Инфибета® в системе A-549/EMCV при окрашивании кристаллическим фиолетовым и разных режимах инкубации. ● 5, ▲ 10, ◆ 15 мин (min). Ось Y – оптическая плотность ( $OD_{570}$ ). Ось X – десятичный логарифм концентрации образца Инфибета®, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация;  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 1.** Dose–response curves for determination of Infibeta® activity in the A-549/EMCV system after staining with crystal violet and using different incubation modes. ● 5, ▲ 10, ◆ 15 minutes (min). Y-axis–optical density ( $OD_{570}$ ). X-axis–decimal logarithm of Infibeta® sample concentration, [IU/mL].  $EC_{50}$ –half maximal effective concentration;  $R^2$ –coefficient of determination.

вания был использован кристаллический фиолетовый и испытаны разные режимы инкубации с красителем от 5 до 15 мин. Результаты представлены на рисунке 1.

Значение коэффициента детерминации ( $R^2$ ), рассчитанное по полученным экспериментальным данным при всех режимах инкубации, не удовлетворяет критериям приемлемости для биологических методов ( $R^2 \leq 85$ ). Кроме того, относительная разница между оптической плотностью лунок с живыми (наибольшая концентрация ИФН бета) и мертвыми (наименьшая концентрация ИФН бета) клетками не превышает 0,5 о.е., что также неприемлемо. При таких значениях критериев метод не позволяет получать точные и воспроизводимые результаты и нуждается в доработке.

Для снижения гетерогенности результатов и уменьшения разброса между 4 повторами кристаллический фиолетовый заменили на краситель ХТТ. Использование этого красителя основано на восстановлении формазана в присутствии акцептора электронов (активатора) и при участии митохондрий живых клеток до окрашенного комплекса оранжевого цвета. Основное преимущество его применения в вирусологическом тесте – возможность проводить процедуру с монослоем живых клеток, когда не требуются дополнительные этапы промывки, фиксации и просушки монослоя клеток, приводящие к его частичному отслоению и смыву клеток, что, в конечном итоге, приводит к искажению результатов анализа.

Испытание красителя ХТТ проводили на системе A-549/EMCV. Были получены результаты,

удовлетворяющие критериям приемлемости, а именно: результаты подчиняются 4-параметрической сигмоидальной зависимости (рис. 2), позволяющей произвести корректные расчеты параметров; значение  $R^2$  – не менее 0,85.

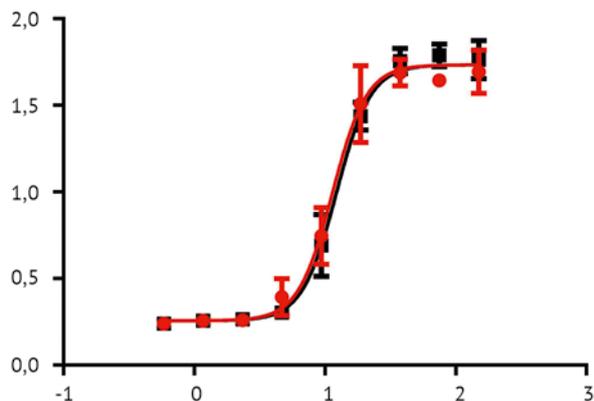
Последующие исследования проводили с применением красителя ХТТ.

#### **Сравнительное определение специфической активности препаратов Инфибета® и Бетаферон®**

Предварительную оценку результатов определения специфической активности препарата Инфибета® проводили по сравнению с референтным препаратом Бетаферон®. В испытаниях использовали три серии препарата Инфибета® и три серии препарата Бетаферон® на четырех клеточных линиях в сочетании с вирусом EMC. Полученные результаты (табл. 1, рис. 3) позволяют сделать вывод о сопоставимости лекарственных препаратов Инфибета® и Бетаферон® по показателю «Специфическая активность». Значения специфической активности в процентах получены путем вычисления отношения полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) стандартного образца к полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) испытуемого образца, умноженному на 100%.

#### **Сравнительный анализ результатов определения специфической активности интерферона бета с использованием различных систем клетка/вирус**

На втором этапе исследований, задачей которого был выбор для определения



Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,9744	0,9874
$EC_{50}$	11,40	12,23

**Рис. 2.** Кривая зависимости «доза–эффект» при определении активности препарата Инфибета® в системе A-549/EMCV с использованием реактива ХТТ. ● – стандартный образец (RS); ■ – испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница между значениями оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация;  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 2.** Dose–response curve for determination of Infibeta® activity in the A-549/EMCV system using the XTT reagent. ● – reference standard (RS); ■ – Infibeta® test sample. Y-axis–difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis–decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ –half maximal effective concentration;  $R^2$ –coefficient of determination.

специфической активности оптимальной биологической системы клетка/вирус, провели испытания с использованием клеточных линий WISH, A-549, Vero и MDBK в комбинации с вирусом EMCV. Сравнение результатов (табл. 2, рис. 4) проводили по характеристикам графика зависимости «доза–эффект» (наличие линейного участка, коэффициент детерминации, значение 50% эффективной дозы  $EC_{50}$ ).

Оптимальной для математического расчета параметров является такая кривая зависимости «доза–эффект», в которой 4 точки располагаются на верхнем плато (клетки живые), 4 точки – на перегибе (начали умирать, но еще проявляется защитное действие ИФН бета) и 4 точки – на нижнем плато (клетки мертвые, вирус полностью поразил клетки монослоя). Имеет значение и наклон кривой: наиболее приемлем наклон около 45 градусов, чем больше градус и круче кривая – тем больше вели-

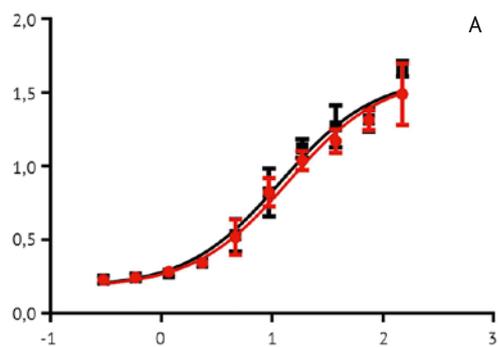
чина ошибки. Расположение точек на слишком пологой кривой также может привести к значительной погрешности при расчетах. Следует подобрать такую систему клетка/вирус, которая будет отвечать указанным требованиям.

Как видно из представленных данных, во всех изученных вариантах кривая «доза–эффект» имеет сигмоидную форму с выраженным линейным участком; в большинстве случаев соблюдается и второе условие (4 точки на перегибе, 4 точки на плато). Таким образом, из приведенных результатов можно сделать вывод о пригодности клеточных линий WISH, Vero, A-549, MDBK в комбинации с вирусом энцефаломиокардита мышей для постановки методики определения активности ИФН бета биологическим методом. Однако следует иметь в виду и некоторые особенности каждой из испытанных систем.

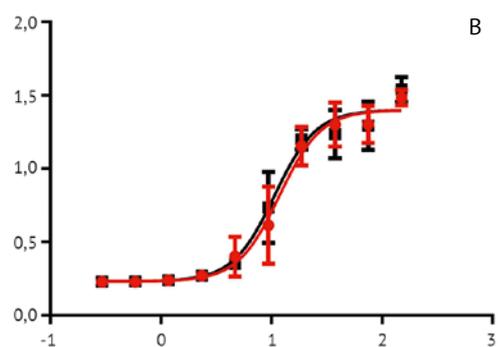
При использовании клеток линии Vero (рис. 5) кривая вышеуказанной зависимости часто имеет

**Таблица 1.** Результаты сравнения специфической активности препаратов Инфибета® и Бетаферон® на различных линиях клеток  
**Table 1.** Results of comparison of Infibeta® and Betaferon® specific activities in different cell lines

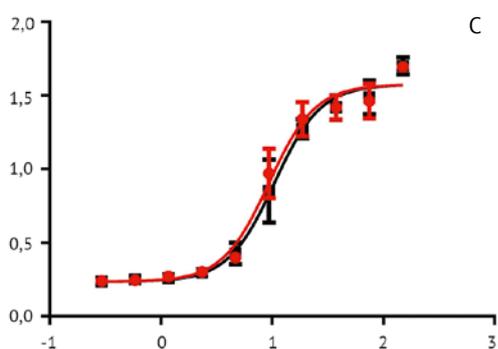
Линия клеток <i>Cell line</i>	Отношение активности препарата Инфибета® к активности препарата Бетаферон®, % <i>Ratio of Infibeta® and Betaferon® specific activities, %</i>
WISH	88,0
MDBK	95,6
A-549	94,3
Vero	100,2



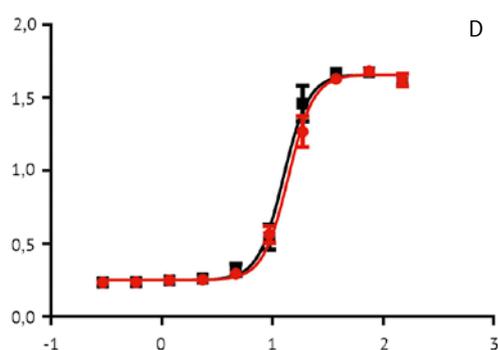
Parameter	Betaferon®	Infibeta®
$R^2$	0,9621	0,9616
$EC_{50}$	13,97	11,96



Parameter	Betaferon®	Infibeta®
$R^2$	0,9488	0,9482
$EC_{50}$	11,79	10,64



Parameter	Betaferon®	Infibeta®
$R^2$	0,9714	0,9730
$EC_{50}$	9,346	10,47



Parameter	Betaferon®	Infibeta®
$R^2$	0,9945	0,9925
$EC_{50}$	13,92	12,59

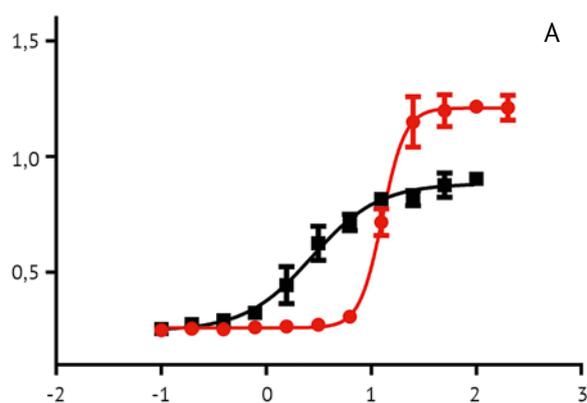
**Рис. 3.** Кривые «доза–эффект» при сравнительном определении противовирусной активности препаратов Инфибета® и Бетаферон® на различных культурах клеток (А – MDBK, В – WISH, С – А-549, D – Vero) в комбинации с вирусом EMCV. ● – стандартный образец Бетаферон® (Betaferon®); ■ – испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разность значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 3.** Dose–response curves for comparison of Infibeta® and Betaferon® antiviral activities in different cell cultures (A–MDBK, B–WISH, C–A-549, D–Vero) combined with EMCV. ●– Betaferon® reference standard; ■– Infibeta® test sample. Y-axis–difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis–decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ –half maximal effective concentration;  $R^2$ –coefficient of determination.

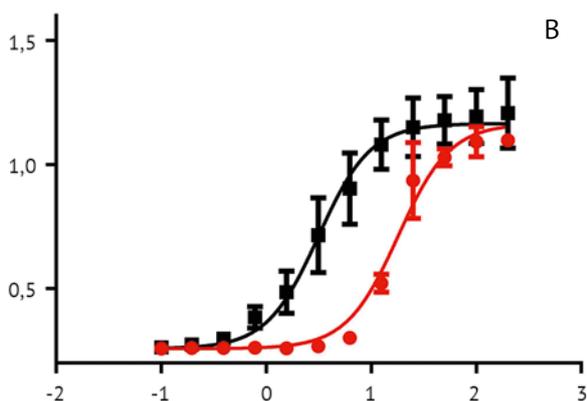
**Таблица 2.** Определение специфической активности препарата Инфибета® на различных культурах клеток с вирусом EMCV  
**Table 2.** Determination of Infibeta® specific activity in different cell cultures with the EMCV virus

Наименование образца <i>Sample</i>	Значение специфической активности при использовании клеточной линии <i>Specific activity in the cell line</i>								Среднее, % <i>Mean, %</i>
	MDBK		WISH		A-549		Vero		
Инфибета® 1 <i>Infibeta® 1</i>	121,6	100,0	102,8	94,5	102,9	105,8	102,4	100,2	104,6
Инфибета® 2 <i>Infibeta® 2</i>	87,7	89,3	91,7	88,7	93,8	91,2	94,8	90,1	90,4

*Примечание.* Указан % от номинального значения активности стандартного образца.  
*Note.* The table gives the percentage of the assigned activity of the reference standard.



Parameter	WISH	Vero
$R^2$	0,9914	0,9729
$EC_{50}$	12,75	2,713



Parameter	A-549	MDBK
$R^2$	0,9706	0,9429
$EC_{50}$	18,02	3,146

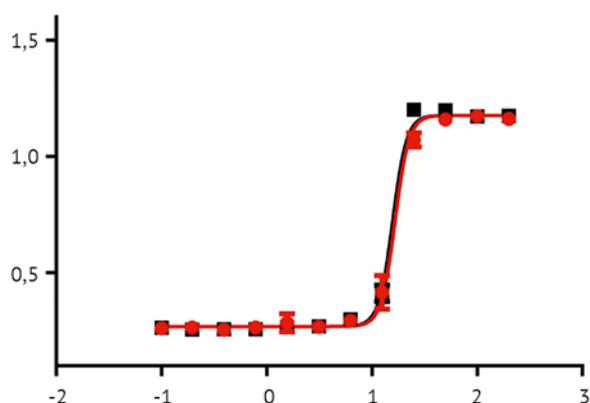
**Рис. 4.** Кривые зависимости «доза–эффект» при определении специфической активности препарата Инфибета® на различных культурах клеток в комбинации с вирусом EMCV. А: ● WISH, ■ Vero; В: ● A-549, ■ MDBK. Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 4.** Dose–response curves for determination of Infibeta® specific activity in different cell cultures combined with EMCV. A: ● WISH, ■ Vero; B: ● A-549, ■ MDBK. Y-axis–difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis–decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ –half maximal effective concentration;  $R^2$ –coefficient of determination.

очень крутой наклон, ярко выраженное верхнее и нижнее плато, в результате при расчете  $EC_{50}$  может возникнуть погрешность.

При использовании клеточной линии MDBK (рис. 6) кривая зависимости, наоборот, имеет слишком пологую форму, верхнее и нижнее плато выражены неявно, что может привести к увеличению погрешности при расчете. Следует отметить также, что именно при проведении исследований на клеточных культурах MDBK и Vero наблюдался наибольший разброс данных.

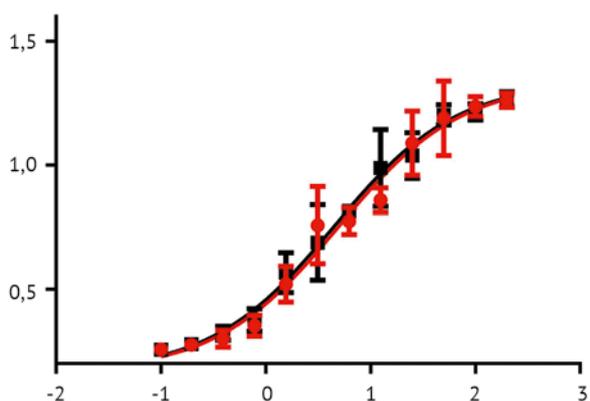
При работе с клетками WISH следует иметь в виду, что по указанной в паспорте информации эта линия клеток неоднородна по составу и при неблагоприятных условиях может перерождаться в фибробластоподобные клетки. В силу этого обстоятельства манипуляции с данной клеточной линией требуют особого внимания: следует не допускать достижения высоких концентраций клеток в монослое и своевременно их пересевать. Однако при правильном использовании эта культура позволяет получать очень



Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,9943	0,9956
$EC_{50}$	16,62	15,76

**Рис. 5.** Вид сигмоидной кривой при определении специфической активности препарата Инфибета® на культуре клеток Vero в комбинации с вирусом EMCV. ● стандартный образец (RS); ■ испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 5.** Sigmoid curve for determination of Infibeta® specific activity in Vero cell culture combined with EMCV. ● reference standard (RS); ■ Infibeta® test sample. Y-axis—difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis—decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ —half maximal effective concentration;  $R^2$ —coefficient of determination.



Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,9485	0,9623
$EC_{50}$	4,936	4,446

**Рис. 6.** Вид сигмоидной кривой при определении специфической активности препарата Инфибета® на культуре клеток MDBK в комбинации с вирусом EMCV. ● стандартный образец (RS); ■ испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образца, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 6.** Sigmoid curve for determination of Infibeta® specific activity in MDBK cell culture combined with EMCV. ● reference standard (RS); ■ Infibeta® test sample. Y-axis—difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis—decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ —half maximal effective concentration;  $R^2$ —coefficient of determination.

четкие и воспроизводимые данные, наклон кривой зависимости величины оптической плотности от концентрации интерферона обеспечивает правильный расчет  $EC_{50}$ .

Итак, сравнительное изучение особенностей определения специфической активности препарата Инфибета® в различных культурах клеток показало, что все испытанные комбинации клетка/вирус пригодны для определения указанного показателя. Однако с учетом особенностей изученных вариантов можно заключить, что наилучшие результаты получены с использованием клеток A-549, WISH в сочетании с вирусом EMCV.

#### **Определение валидационных характеристик методики**

Согласно современным требованиям регуляторных документов локального и международного законодательства, в том числе Государственной фармакопеи Российской Федерации<sup>3</sup> и Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)<sup>4</sup>, для подтверждения пригодности и адекватности метода для целевого применения обязательным этапом при фармацевтической разработке продукта является валидация.

При определении специфической активности *in vitro* оценивают следующие характеристики: специфичность, точность, линейность, прецизионность, устойчивость (робастность). В валидационных испытаниях использовали следующие пары клетка/вирус: WISH/EMCV, A-549/EMCV, Vero/EMCV.

#### **Специфичность**

Для определения специфичности методики проведено сравнительное определение специфической активности препарата Инфибета® и белка другого класса (unknown protein, UP) с использованием двух клеточных линий (рис. 7). Количественный результат получен только для препарата ИФН бета, что подтверждает специфичность методики.

#### **Точность**

Правильность (точность) аналитического метода – степень, с которой сходятся результаты испытаний и истинные значения. В целях установления правильности и диапазона примене-

ния биологического метода испытуемые образцы для валидации могут быть получены путем серии разведений МСО с целью оценки линейности зависимости между известной и установленной относительной активностью.

Измеряли  $EC_{50}$  в смещенных диапазонах концентраций  $X$  (60, 80, 100, 125, 140, 200%) в трех независимых исследованиях для каждого тестируемого диапазона. Активность ( $A$ , %) в каждом эксперименте вычисляли по формуле (2):

$$A = EC_{50}(100\%) / EC_{50}(X\%) \times 100\%, \quad (2)$$

где  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.

Точность определения активности ( $R$ , %) вычисляли по формуле (3):

$$R = A_{X \text{ полученное}} / A_{X \text{ теоретическое}} \times 100\%, \quad (3)$$

где  $A_{X \text{ полученное}}$  – активность препарата, полученная экспериментально,  $A_{X \text{ теоретическое}}$  – активность препарата теоретическая.

Установлены следующие критерии приемлемости: значение  $R$  для испытуемого раствора 100% должно составлять 85–115%, для испытуемых растворов 80 и 125% – 80–125% (табл. 3).

Полученные значения  $R$  удовлетворяют установленным критериям приемлемости, что подтверждает заданную точность методики.

#### **Сходимость**

Для определения сходимости проводили 6 параллельных анализов одним аналитиком в одних и тех же условиях. Предварительно оценивали однородность выборки с использованием дисперсионного анализа (табл. 4).

Так как рассчитанные параметры (табл. 4) подтверждают однородность полученных результатов, все значения выборки можно использовать для вычисления относительного стандартного отклонения. Рассчитанное по экспериментальным результатам значение  $RSD = 7,48\%$  удовлетворяет критерию приемлемости (не более 15%). Методика дает удовлетворительную сходимость результатов.

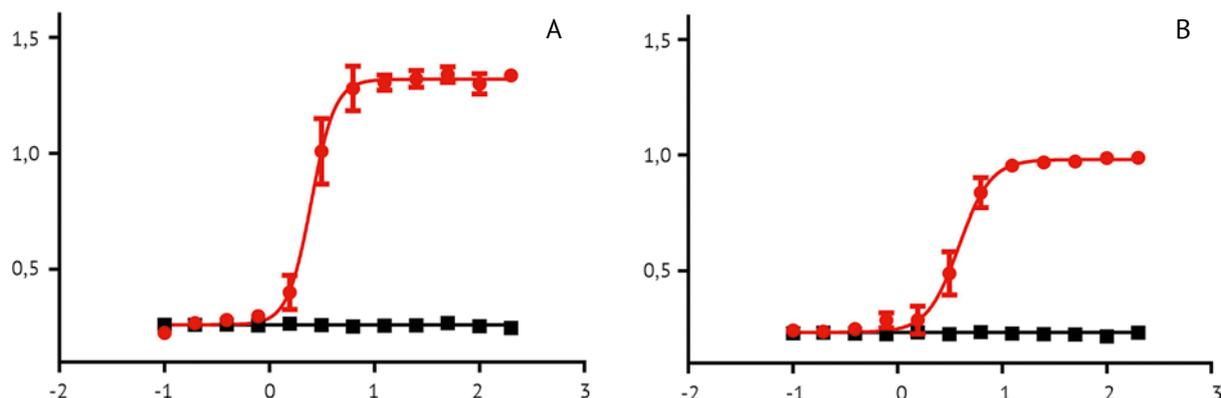
В исследовании использованы клетки одного пассажа и вирусный материал одной серии (табл. 5).

#### **Воспроизводимость**

Для оценки внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) методики проведено определение специфической активности

<sup>3</sup> Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

<sup>4</sup> ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry; 2005.



**Рис. 7.** Результаты определения специфичности методики на двух культурах клеток: А-549 (А) и WISH (В). ● – испытуемый образец Инфибета®; ■ – неизвестный белок. Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм концентрации образца, [МЕ/мл].

**Fig. 7.** Assessment of the test procedure specificity in two cell cultures: A-549 (A) and WISH (B). ● – Infibeta® test sample; ■ – unknown protein (UP). Y-axis – difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis – decimal logarithm of the test sample concentration, [IU/mL].

в испытуемом образце (100%) двумя аналитиками (по 3 независимых исследования каждым) с использованием трех серий Инфибета® в одинаковых условиях (на одной суспензии клеток А-549 и на одной серии вирусного материала) (табл. 6).

Значение *RSD* для серии измерений каждого аналитика не превышает 15%. Значимые отличия между средними значениями специфической активности, полученными двумя аналитиками, не выявлены (при уровне значимости  $P = 0,95$ ).

Полученные результаты удовлетворяют критерию приемлемости, что подтверждает установленный уровень внутрилабораторной прецизионности методики.

Проведена также оценка межлабораторной прецизионности по результатам, полученным в двух независимых лабораториях разными аналитиками на разном оборудовании и в разные дни (табл. 7, рис. 8, 9). С этой целью одни и те же серии препарата Инфибета® были проанализированы в трех повторностях с использованием СО, аттестованного относительно МСО, в каждой из лабораторий. На основании полученных результатов рассчитаны величины стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения.

Согласно методическим рекомендациям по проведению межлабораторных сличительных испытаний<sup>5</sup> расчет проводили по Z-индексу по следующей формуле (4):

$$Z = (x - X) / \sigma, \quad (4)$$

где  $x$  – результат лаборатории;  $X$  – среднее значение между результатами, полученными в разных лабораториях;  $\sigma$  – стандартное отклонение, рассчитанное по результатам оценки воспроизводимости методики.

При  $|Z| \leq 2$  результат признается положительным по критерию 3, при  $2 < |Z| < 3$  – сомнительным, при  $|Z| \geq 3$  – отрицательным.

Полученный результат (табл. 8) удовлетворяет критериям приемлемости.

#### Линейность

Линейность методики устанавливается по наличию линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

Тест на линейность проводили в выбранном интервале 60–140% (от 4,8 до 11,2 млн МЕ/мл). Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. Результаты приведены на рисунке 10.

Линейная зависимость наблюдается в диапазоне 60–140% от номинальной активности (8 млн МЕ/мл). В полученном уравнении линейной зависимости  $y = kx + b$  значение коэффициента  $k$  должно быть равно  $1,0 \pm 0,2$ , а значение коэффициента детерминации  $R^2$  должно быть не менее 0,95.

<sup>5</sup> ГОСТ Р 50779.60-2017 Статистические методы при проверке квалификации посредством межлабораторных испытаний.

**Таблица 3.** Значения параметров, характеризующих точность валидируемой методики  
**Table 3.** Values characterising the accuracy of the validated test procedure

Значение специфической активности <i>Specific activity, %</i>	Теоретическое значение X <i>Theoretical value X</i>					
	60	80	100	125	140	200
Экспериментальное значение X, % <i>Experimental value X, %</i>	60,4	67,2	105,7	131	147,8	207,7
	57,3	92,9	105,5	108,4	130,4	188,2
	59,4	79,8	115,9	111,4	145,4	-
	51,8	73,7	108,5	114,9	135,2	
	60,4	80,5	91,9	130,1	142,5	
	61,3	80,2	109,3	131,3	-	
	50,7	85,5	93,5	143,7		
	-	88,2	115,4	131,5		
		-	110,6	122,0		
			108,4	122,5		
100,2	124,8					
$\bar{X}$ , %	57,3	81,00	105,9	124,69	140,26	
<i>SD</i>	4,35	8,10	7,87	10,35	7,26	13,79
<i>RSD</i>	7,58	10,01	7,43	8,30	5,18	6,97
Точность экспериментальная R, % <i>Experimental accuracy value R, %</i>	100,66	84	105,7	104,8	105,57	103,85
	95,5	116,13	105,5	86,72	93,14	94,1
	99	99,75	115,9	89,12	103,86	-
	86,33	92,13	108,5	91,92	96,57	
	100,67	100,63	91,9	104,08	101,79	
	102,17	100,25	109,3	105,04	-	
	84,5	106,88	93,5	114,96		
	-	110,25	115,4	105,2		
		-	110,6	97,6		
			108,4	98		
100,2	99,84					
Среднее значение R, % <i>Mean R, %</i>	95,55	101,25	105,9	99,75	100,19	
Среднее значение R, % для всех измерений <i>Mean R for all values, %</i>	100,27					

Примечание. *SD* – стандартное отклонение, *RSD* – относительное стандартное отклонение. «-» – не определяли.  
 Note. *SD*—standard deviation, *RSD*—relative standard deviation. – not determined.

Таблица 4. Значения параметров, характеризующих однородность выборки

Table 4. Values characterising the sample homogeneity

Характеристики выборки Sample characteristics	
$R = X_{\max} - X_{\min} = 115,9 - 91,9 = 24,0$	
$ x1 - x2  =  115,9 - 109,3  = 6,6$	$ x5 - x6  =  105,1 - 91,9  = 13,2$
$CR_{\text{найденное1}} =  x1 - x2  / R = 6,6 / 24,0 = 0,275$ $CR_{\text{determination1}} =  x1 - x2  / R = 6,6 / 24,0 = 0,275$	$CR_{\text{найденное2}} =  x5 - x6  / R = 13,2 / 24,0 = 0,55$ $CR_{\text{determination2}} =  x5 - x6  / R = 13,2 / 24,0 = 0,55$
$CR_{\text{крит}}(P=0,95) = 0,56$ $CR_{\text{critical}}(P=0,95) = 0,56$	
$CR_{\text{найденное1}} < CR_{\text{крит}}(P=0,95)$ $CR_{\text{determination1}} < CR_{\text{critical}}(P=0,95)$	$CR_{\text{найденное2}} < CR_{\text{крит}}(P=0,95)$ $CR_{\text{determination2}} < CR_{\text{critical}}(P=0,95)$

Примечание. X – значение параметра, R – размах, CR – критический диапазон для уровня вероятности 95%.

Note. X–value of the parameter, R–range, CR–critical range for the 95% probability level.

Таблица 5. Значения параметров, характеризующих сходимость валидируемой методики

Table 5. Values characterising the repeatability of the validated test procedure

Значение специфической активности, % (6 повторов) Specific activity, % (6 replicates)						Среднее значение специфической активности, % Mean specific activity, %	Коэффициент вариации (CV), % Coefficient of variation (CV), %	Стандартное отклонение (SD) Standard deviation (SD)
115,9	109,3	108,5	105,7	105,1	91,9	106,1	7,48	7,94

Как видно из представленных данных, наблюдается линейная зависимость экспериментальных значений специфической активности от расчетных значений. Значение  $R^2 = 0,9963$ . Уравнение полученной линейной функции имеет следующий вид:  $y = 0,9877x + 1,8037$ .

Полученные данные удовлетворяют критериям приемлемости, линейность методики подтверждена в диапазоне 60–140%.

#### Робастность

Робастность методики оценивали путем сравнения результатов испытаний при использовании вирусного материала разных серий. Оценку проводили по вариабельности значений  $EC_{50}$  для одной серии препарата Инфибета® и двух серий вирусного материала, вариабельность оценивали по RSD (табл. 9).

Как видно из представленных результатов, величина RSD для двух серий вирусной суспензии составляет не более 25%. Результаты соответствуют критериям приемлемости, робастность методики подтверждена.

#### Выводы

Сравнительное изучение особенностей определения специфической активности препарата Инфибета® в различных культурах клеток показало, что все испытанные комбинации клетка/вирус пригодны для определения указанного показателя. С учетом особенностей изученных вариантов для валидации методики использовали следующие пары клетка/вирус: WISH/EMCV, A-549/EMCV, Vero/EMCV.

В результате проведения испытаний определены валидационные характеристики методики: специфичность, прецизионность, линейность, робастность.

Показано, что методика позволяет измерять специфическую активность ИФН бета в диапазоне от 4,8 до 11,2 млн МЕ/мл с точностью, удовлетворяющей критериям приемлемости, что гарантирует получение достоверных результатов анализа. Подтверждена устойчивость, а также внутри- и межлабораторная воспроизводимость методики.

**Таблица 6.** Значения параметров, характеризующих внутрилабораторную прецизионность валидируемой методики  
**Table 6.** Values characterising the intermediate precision of the validated test procedure

Наименование образца <i>Sample</i>	Аналитик <i>Operator</i>	Клеточная линия A-549 <i>Cell line A-549</i>							По двум аналитикам <i>Two operators</i>		
		EC <sub>50</sub> CO <i>EC<sub>50</sub> RS</i>	EC <sub>50</sub> Инфибета® <i>EC<sub>50</sub> Infibeta®</i>	№ планшета <i>Plate No.</i>	A, %	SD	среднее значение специфической активности, % <i>mean specific activity, %</i>	RSD, %	среднее значение специфической активности, % <i>mean specific activity, %</i>	SD	RSD, %
Инфибета®1 <i>Infibeta®1</i>	Аналитик 1 <i>Operator 1</i>	11,91	11,3	1	105,4	3,6	109,6	3,3	107,15	14,04	13,10
		11,79	13,21	2	112,0						
		12,25	13,63	3	111,3						
	Аналитик 2 <i>Operator 2</i>	12,13	9,825	4	81,0	21,5	104,7	20,5			
		16,29	20,02	5	122,9						
		12,69	14	6	110,3						
Инфибета®2 <i>Infibeta® 2</i>	Аналитик 1 <i>Operator 1</i>	10,45	11,52	7	110,2	5,3	113,3	4,7	106,92	8,79	8,22
		10,79	11,89	8	110,2						
		10,53	12,57	9	119,4						
	Аналитик 2 <i>Operator 2</i>	12,22	12,98	10	106,2	6,7	100,6	6,6			
		11,11	11,36	11	102,3						
		8,699	8,111	12	93,2						
Инфибета®3 <i>Infibeta® 3</i>	Аналитик 1 <i>Operator 1</i>	12,08	12,73	13	105,4	13,6	105,6	12,8	108,08	11,34	10,50
		6,635	7,919	14	119,4						
		10,45	9,636	15	92,2						
	Аналитик 2 <i>Operator 2</i>	10,57	12,93	16	122,3	10,9	110,5	9,9			
		8,814	9,562	17	108,5						
		11,13	11,21	18	100,7						

Примечание. EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация, SD – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, A – активность испытуемых образцов, CO – стандартный образец.

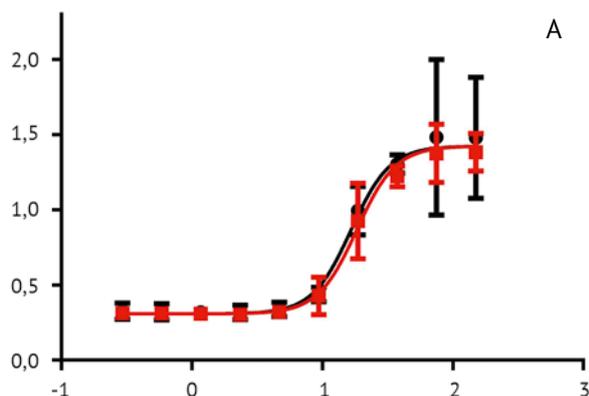
Note. EC<sub>50</sub> –half maximal effective concentration, SD–standard deviation, RSD–relative standard deviation, A–activity, RS–reference standard.

**Таблица 7.** Значения параметров, характеризующих межлабораторную прецизионность валидируемой методики  
**Table 7.** Values characterising the reproducibility of the validated test procedure

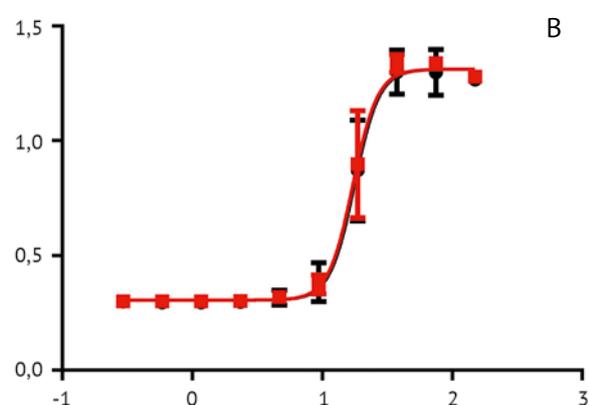
Наименование образца <i>Sample</i>	Значение специфической активности в индивидуальных планшетах, % <i>Specific activity in individual plates, %</i>	SD, %	Среднее значение специфической активности, % <i>Mean specific activity, %</i>	RSD, %
Инфибета®, измерение в АО «ГЕНЕРИУМ» <i>Infibeta® analysed by Generium</i>	105,6	3,99	102,1	3,91
	103,0			
	97,7			
Инфибета®, измерение в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России <i>Infibeta® analysed by FSBI "SCEEMP"</i>	110,5	6,6	104,9	6,3
	97,6			
	106,6			

Примечание. SD – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение.

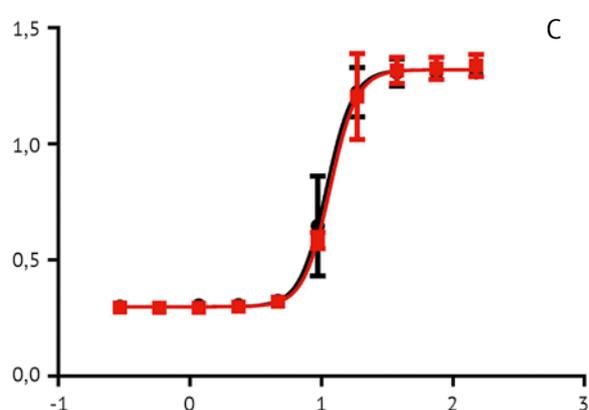
Note. SD–standard deviation, RSD–relative standard deviation.



Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,8642	0,9461
$EC_{50}$	16,60	18,34



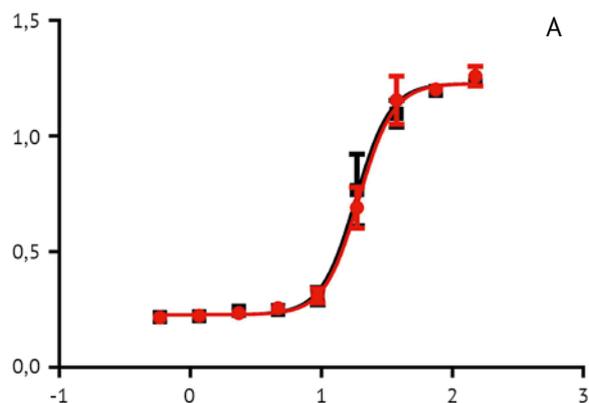
Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,9687	0,9759
$EC_{50}$	17,66	17,23



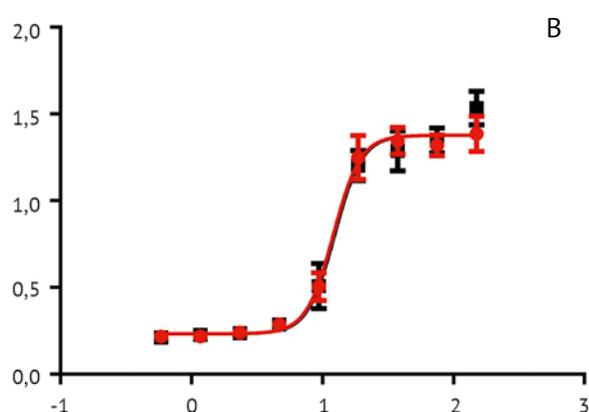
Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,9776	0,9849
$EC_{50}$	10,95	11,67

**Рис. 8.** Результаты испытаний, полученные в лаборатории ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, для расчета межлабораторной прецизионности валидируемой методики (А, В, С). Противовирусная активность интерферона бета биологическим методом определена в системе WISH/EMCV. ● стандартный образец (RS); ■ испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [ME/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация;  $R^2$  – коэффициент детерминации.

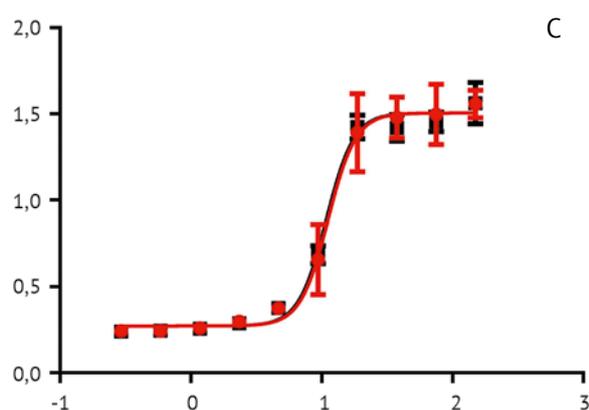
**Fig. 8.** Test results obtained by the FSBI "SCEEMP" for calculation of reproducibility of the validated test procedure (A, B, C). The antiviral activity of interferon beta was determined by the biological test method in the WISH/EMCV system. ● reference standard (RS); ■ Infibeta® test sample. Y-axis – difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis – decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$  – half maximal effective concentration;  $R^2$  – coefficient of determination.



Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,9890	0,9840
$EC_{50}$	19,36	18,32



Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,9840	0,9719
$EC_{50}$	12,11	12,39



Parameter	RS	Infibeta®
$R^2$	0,9643	0,9860
$EC_{50}$	11,20	10,87

**Рис. 9.** Результаты испытаний, полученные в лаборатории АО «ГЕНЕРИУМ», для расчета межлабораторной прецизионности валидируемой методики (А, В, С). Противовирусная активность интерферона бета биологическим методом определена в системе WISH/EMCV. ● стандартный образец (RS); ■ испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация;  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 9.** Test results obtained by Generium for calculation of reproducibility of the validated test procedure (A, B, C). The antiviral activity of interferon beta was determined by the biological test method in the WISH/EMCV system. ● reference standard (RS); ■ Infibeta® test sample. Y-axis—difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis—decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ —half maximal effective concentration;  $R^2$ —coefficient of determination.

Таблица 8. Расчет показателя Z-индекса

Table 8. Calculation of the Z-index

Образец Sample	Специфическая активность, % (измерение в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) Specific activity, % (analysed by FSBI "SCEEMP")	Специфическая актив- ность, % (измерение в АО «ГЕНЕРИУМ») Specific activity, % (analysed by Generium)	Среднее значение специфической активности, % Mean specific activity, %	$\sigma$ , %	Расчетное значение Z-индекса Z-index
СО при измере- нии относительно МСО RS measured relative to the IRS	104,9	102,1	103,5	13,1	0,2

Примечание. СО – стандартный образец, МСО – международный стандартный образец.

Note. RS—reference standard, IRS – international reference standard.

Таблица 9. Значения параметров, характеризующих робастность валидируемой методики

Table 9. Values characterising the robustness of the validated test procedure

Образец Sample	Экспериментальное значение специфической активности, % Experimental value of specific activity, %	
	вирусный материал серии 0819 viral material batch 0819	вирусный материал серии 0619 viral material batch 0619
1	116,7	98,6
2	106,2	104,8
3	88,8	111,6
4	107,9	114,6
Среднее, % Mean, %	104,9	107,4
SD	11,68	7,16
RSD, %	11,13	7,00
Среднее, % Mean, %	106,15	
SD	9,07	
RSD, %	8,54	

Примечание. SD – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. SD—standard deviation, RSD—relative standard deviation.

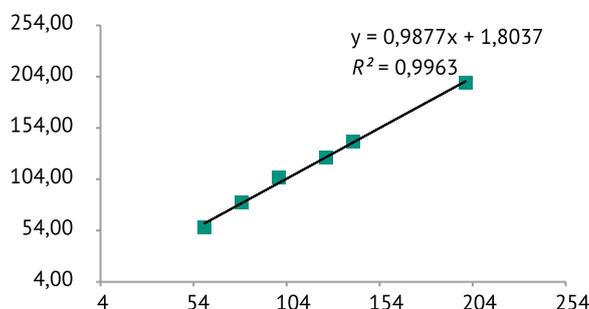


Рис. 10. Определение линейности валидируемой методики. График зависимости измеренной от ожидаемой величины активности протестированных растворов в диапазоне 60–140% с применением линейного тренда. Ось Y – ожидаемое значение специфической активности, %. Ось X – измеренное значение специфической активности, %.

Fig. 10. Determination of the linearity of the validated test procedure. The plot of the measured and the expected activities of the test solutions in the range of 60–140% using a linear trend. Y-axis—expected value of specific activity, %. X-axis—measured specific activity, %.

## Литература/References

1. Ульянова ОВ, Куташев ВА, Дутова ТИ. Рассеянный склероз — актуальная неврологическая проблема XXI века. *Молодой ученый*. 2016;15(119):558–67. [Ulyanova OV, Kutashev VA, Dutova TI. Multiple sclerosis is an actual neurological problem of the XXI century. *Molodoy uchenyy = The Young Scientist*. 2016,15(119):558–67 (In Russ.)]
2. Мирошникова ВВ, Саранов АА, Аракелян АС, Рыбак ВА. Современная терапия рассеянного склероза. *Лекарственный вестник*. 2013;7(49):20–34. [Miroshnikova VV, Saranov AA, Arakelyan AS, Rybak VA. Modern therapy of multiple sclerosis. *Lekarstvennyj vestnik = Pharmaceutical Bulletin*. 2013;7(49):20–34 (In Russ.)]
3. Jakimovski D, Kolb C, Ramanathan M, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B. Interferon- $\beta$  for multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(11):a032003. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032003>
4. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- $\beta$  in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011;25(6):491–502. <https://doi.org/10.2165/11591110-000000000-00000>
5. Kremenchtzky M, Morrow S, Rush C. The safety and efficacy of IFN-beta products for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Drug Saf*. 2007;6(3):279–88. <https://doi.org/10.1517/14740338.6.3.279>
6. Борец ОГ, Говорухина НФ, Зверев КВ, Бойко АН. Сравнительный анализ результатов применения в повседневной клинической практике для лечения рассеянного склероза препаратов  $\beta$ -интерферон-1а 30 мкг для внутримышечного введения и  $\beta$ -интерферон-1а 44 мкг для подкожных инъекций. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуски. 2016;116(2–2):63–7. [Borets OG, Govorukhina NF, Zverev KV, Boiko AN. A comparison analysis of the use of intravenous  $\beta$ -interferon-1a 30 mcg and subcutaneous  $\beta$ -interferon-1a 44 mcg in routine clinical practice of treatment in patients with multiple sclerosis. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2016;116:2(2):63–7 (In Russ.)]
7. Попова ЕВ, Бойко АН, Васильев АВ, Давыдовская МВ, Завалишин ИА, Котов СВ и др. Результаты сравнительного клинического исследования российского биоаналога — интерферона-1b (инфибета). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012;112(5):56–61. [Popova EV, Boiko AN, Vasil'ev AV, Davydovskaia MV, Zavalishin IA, Kotov SV, et al. Results of a comparative clinical trial of the Russian — interferon-1b bioanalogue (infibeta). *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2012;112(5):56–61 (In Russ.)]
8. Хабиров ФА, Хайбуллин ТИ, Гранатов ЕВ, Шакирзянова СР, Бабичева НН, Кочергина ОС и др. Результаты открытого сравнительного ретроспективного исследования особенностей рассеянного склероза на фоне терапии препаратом инфибета и другими биоаналогами интерферонов бета и глатирамера ацетатом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(3):18–26. [Khabirov FA, Khaibullin TI, Granatov EV, Shakirzianova SR, Babicheva NN, Kochergina OS, et al. The results of an open comparative retrospective trial of the course of multiple sclerosis during treatment with infibeta and other interferon-beta bioanalogues and glatiramer acetate. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2018;118(3):18–26 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17116/jnevro20181183118-26>
9. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1–6. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1)
10. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1–17. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1)
11. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159–67. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>

**Вклад авторов.** Ю.Н. Лебедева — проведение экспериментальных исследований по оценке межлабораторной воспроизводимости, оформление и интерпретация результатов; Н.А. Литвинова — проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка и систематизация результатов, написание сопроводительного текста к экспериментальным данным; Т.Н. Лобанова — анализ и интерпретация результатов, написание и оформление текста рукописи, редактирование и переработка рукописи; Р.Р. Шукуров — обсуждение и анализ полученных результатов; Р.А. Хамитов — разработка дизайна исследования и окончательное утверждение версии рукописи для публикации; Л.А. Гайдерова — обобщение результатов и редактирование рукописи.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава Рос-

**Authors' contributions.** Yu.N. Lebedeva—conducting experiments to assess the test procedure's reproducibility, interpretation of the results, preparation of the graphic material; N.A. Litvinova—conducting experimental research, statistical processing and systematisation of the results, preparation of legends for the graphic material; T.N. Lobanova—analysis and interpretation of the results, writing, revision, and editing of the paper; R.R. Shukurov—discussion and analysis of the results; R.A. Khamitov—elaboration of the study design and final approval of the paper for publication; L.A. Gaiderova—analysis of the results and editing of the paper.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

сии № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Conflict of interest.** R.A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

---

## Об авторах / Authors

**Лебедева Юлия Николаевна.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>

[LebedevaUN@expmed.ru](mailto:LebedevaUN@expmed.ru)

**Литвинова Наталия Алексеевна,** канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9729-3281>

[litvinova@ibcgenerium.ru](mailto:litvinova@ibcgenerium.ru)

**Лобанова Татьяна Николаевна,** канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8972-4851>

[Tlobanova@expmed.ru](mailto:Tlobanova@expmed.ru)

**Шукуров Рахим Рахманкулович,** канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

[Shukurov@ibcgenerium.ru](mailto:Shukurov@ibcgenerium.ru)

**Хамитов Равиль Авгатович,** д-р. мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

[Khamitov@ibcgenerium.ru](mailto:Khamitov@ibcgenerium.ru)

**Гайдерова Лидия Александровна,** канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

[Gaiderova@expmed.ru](mailto:Gaiderova@expmed.ru)

**Yulia N. Lebedeva.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>

[LebedevaUN@expmed.ru](mailto:LebedevaUN@expmed.ru)

**Nataliya A. Litvinova,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9729-3281>

[litvinova@ibcgenerium.ru](mailto:litvinova@ibcgenerium.ru)

**Tatiana N. Lobanova,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8972-4851>

[Tlobanova@expmed.ru](mailto:Tlobanova@expmed.ru)

**Rakhim R. Shukurov,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

[Shukurov@ibcgenerium.ru](mailto:Shukurov@ibcgenerium.ru)

**Ravil A. Khamitov,** Dr. Sci. (Med.), Professor. OR-

CID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

[Khamitov@ibcgenerium.ru](mailto:Khamitov@ibcgenerium.ru)

**Lidiya A. Gaiderova,** Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

[Gaiderova@expmed.ru](mailto:Gaiderova@expmed.ru)

Поступила 16.03.2021

После доработки 16.11.2021

Принята к публикации 11.03.2022

Received 16 March 2021

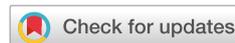
Revised 16 November 2021

Accepted 11 March 2022

УДК 604.4

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>

Научная статья | Scientific article



## Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин-генерирующего фермента

С.С. Тимонова , К.А. Смолова, Д.Т. Зарипова, М.С. Пантюшенко, М.А. Королева, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ

АО «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

 Тимонова Софья Сергеевна; [timonova1993@yandex.ru](mailto:timonova1993@yandex.ru)

### Резюме

Мукополисахаридоз VI типа (синдром Марото–Лами) – орфанное генетическое заболевание, которое связано с дефицитом лизосомального фермента арилсульфатазы В. Актуальность исследования связана с необходимостью разработки высокопродуктивной клеточной линии-продуцента рекомбинантного фермента арилсульфатазы В. Наиболее перспективным подходом представляется создание клеточных линий-продуцентов, коэкспрессирующих целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент на основе клеточной линии CHO. При этом большое практическое значение имеет возможность культивирования клеточных линий-продуцентов в виде суспензии, без использования сыворотки или других компонентов животного происхождения. **Цель работы:** разработка высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантного фермента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин-генерирующего фермента. **Материалы и методы:** использовали суспензионную клеточную линию CHO. Трансфекцию клеток CHO проводили методом электропорации с использованием системы MaxCyte STX. Моноклональные клеточные линии получали с использованием системы Cell Metric. Концентрацию арилсульфатазы В в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа. Образцы культуральной жидкости анализировали с применением электрофореза в полиакриламидном геле и вестерн-блота. Уровень мРНК измеряли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты:** получены клеточные линии-продуценты, коэкспрессирующие целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент. Достигнуто увеличение выхода активного целевого фермента арилсульфатазы В с 2 до 100 мг/л за счет подбора оптимального соотношения плазмид во время трансфекции. Наибольший выход целевого фермента арилсульфатазы В наблюдался при соотношении плазмид, кодирующих гены арилсульфатазы В и формилглицин-генерирующего фермента, равном 90:10 (%). **Выводы:** разработаны высокопродуктивные клеточные линии-продуценты рекомбинантного фермента арилсульфатазы В, коэкспрессирующие целевой и вспомогательный ферменты. Коэкспрессия арилсульфатазы В и формилглицин-генерирующего фермента приводит к улучшению ростовых и продукционных характеристик клеточной линии, что, по-видимому, обусловлено модификацией активного центра целевого фермента арилсульфатазы В. Полученные результаты позволят решить проблему низкого выхода фермента, характерную для препаратов подобного класса.

**Ключевые слова:** культура клеток CHO; арилсульфатаза В; галсульфаза; ген *ARSB*; лизосомальный фермент; сульфатаза; мукополисахаридоз VI типа; формилглицин-генерирующий фермент

© С.С. Тимонова, К.А. Смолова, Д.Т. Зарипова, М.С. Пантюшенко, М.А. Королева, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ, 2022

**Для цитирования:** Тимонова С.С., Смолова К.А., Зарипова Д.Т., Пантюшенко М.С., Королева М.А., Анисимов Р.Л., Хамитов Р.А., Пискунов А.А., Бадэ В.Н. Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин-генерирующего фермента. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):80–93. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>

---

## Increasing productivity of arylsulfatase B-producing cell line by coexpression of formylglycine-generating enzyme

S.S. Timonova ✉, K.A. Smolova, D.T. Zaripova, M.S. Pantyushenko, M.A. Koroleva, R.L. Anisimov, R.A. Khamitov, A.A. Piskunov, V.N. Bade

JSC "GENERIUM", 14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Sofia S. Timonova; [timonova1993@yandex.ru](mailto:timonova1993@yandex.ru)

---

### Abstract

Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux–Lamy syndrome) is an orphan genetic disease caused by deficiency of the lysosomal enzyme arylsulfatase B (ASB). The need to develop a highly productive cell line for the production of recombinant ASB, is behind the concept and relevance of this study. The most promising approach seems to be the development of CHO producer cell lines coexpressing the target ASB enzyme and an auxiliary formylglycine-generating enzyme (FGE). At the same time, it is important from a practical perspective to have the possibility of cultivating producer cell lines as suspensions free of serum or other components of animal origin. **The aim of the study** was to develop highly productive cell lines for the production of recombinant ASB by coexpression of the auxiliary FGE. **Materials and methods:** a suspension CHO cell line was used in the study. CHO cells were transfected by electroporation using the MaxCyte STX system. Monoclonal cell lines were obtained with the help of the Cell Metric system. Enzyme-linked immunosorbent assay was used for determination of ASB concentration in the culture fluid. Culture fluid samples were analysed using polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting. The mRNA level was measured by real-time polymerase chain reaction. **Results:** producer cell lines coexpressing the target ASB enzyme and auxiliary FGE were obtained. An increase in the yield of the active target ASB enzyme from 2 to 100 mg/L was achieved by selecting the optimal ratio of plasmids during transfection. The highest yield of the target ASB enzyme was achieved at the 90:10 ratio (%) of plasmids encoding the ASB and FGE genes, respectively. **Conclusions:** the authors developed highly productive cell lines for the production of recombinant ASB, which coexpress the target and auxiliary enzymes. The coexpression of ASB and FGE improves the growth and production characteristics of the cell line, probably due to the modification of the ASB active site. The obtained results will help resolve the problem of low enzyme yield, which is typical of this class of medicines.

---

**Key words:** CHO cell line; arylsulfatase B; galsulfase; *ARSB* gene; lysosomal enzyme; sulfatase; mucopolysaccharidosis type VI; formylglycine-generating enzyme

**For citation:** Timonova S.S., Smolova K.A., Zaripova D.T., Pantyushenko M.S., Koroleva M.A., Anisimov R.L., Khamitov R.A., Piskunov A.A., Bade V.N. Increasing productivity of arylsulfatase B-producing cell line by coexpression of formylglycine-generating enzyme. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):80–93. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>

---

## Введение

Мукополисахаридоз (МПС) представляет собой группу из 11 типов орфанных генетических заболеваний, каждый тип МПС характеризуется мутацией определенного гена, кодирующего тот или иной лизосомальный фермент, дисфункция которого влияет на один из этапов деградации гликозаминогликанов (ГАГ) в клетке<sup>1</sup> [1–3], что приводит к постепенному накоплению нерасщепленных продуктов метаболизма в тканях и органах [4].

МПС VI типа передается по аутосомно-рецессивному типу наследования и вызван мутациями в гене *ARSB*, который кодирует лизосомальный фермент N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу (арилсульфатаза В, галсульфаза, ASB, EC 3.1.6.12), что приводит к снижению/отсутствию активности фермента [5]. Заболевание проявляется грубыми чертами лица, задержкой роста, выраженными деформациями костей и суставов, нарушениями нервной системы и другими симптомами [6]. Для больных МПС VI типа рекомендована заместительная ферментная терапия препаратом Наглазим (BioMarin, США) [7–9], который представляет собой рекомбинантный лизосомальный фермент галсульфазу.

Большинство известных арилсульфатаз [10, 11], в том числе и ASB [12], претерпевают уникальную посттрансляционную модификацию в активном центре [13, 14], приводящую к трансформации каталитического остатка цистеина (Cys) до остатка α-формилглицин-(fGly) [15–17], что необходимо для проявления сульфатазной активности фермента. В организме активный фермент ASB катализирует отщепление сульфатных групп молекул ГАГ [18]: дерматансульфатов и гепарансульфатов [19, 20].

Образование fGly в активном центре ASB катализируется формилглицин-генерирующим ферментом<sup>2</sup> (FGE, EC 1.8.3.7) [21, 22]. Белок FGE локализуется в эндоплазматическом ретикулуме, где взаимодействует с вновь синтезированными сульфатазами и катализирует превращение Cys в fGly в активном центре фермента [23–25].

В результате предварительных работ, проведенных авторами, были получены клеточные линии-продуценты на основе суспензионной линии клеток CHO с уровнем выхода рекомбинантного фермента ASB 1–2 мг/л.

Цель работы — разработка высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантного фермента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилгли-

цин-генерирующего фермента. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи: получение суспензионной моноклональной клеточной линии-продуцента ASB путем трансфекции клеток линии CHO плазмидой, несущей ген фермента ASB, с последующим получением клонов с помощью системы клеточной визуализации Cell Metric; получение суспензионной клеточной линии-продуцента, экспрессирующей оба фермента ASB и FGE (продуцент ASB+FGE), путем проведения дополнительной трансфекции линии-продуцента ASB плазмидой с геном, кодирующим вспомогательный белок FGE; оценка ростовых характеристик и продуктивности клеточных линий-продуцентов; оценка экспрессии гена ASB по уровню мРНК в клетках полученных линий-продуцентов; подбор оптимального соотношения плазмид, кодирующих целевой и вспомогательный ферменты, при получении высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов ASB+FGE (минипулы-продуценты ASB+FGE).

## Материалы и методы

### Материалы

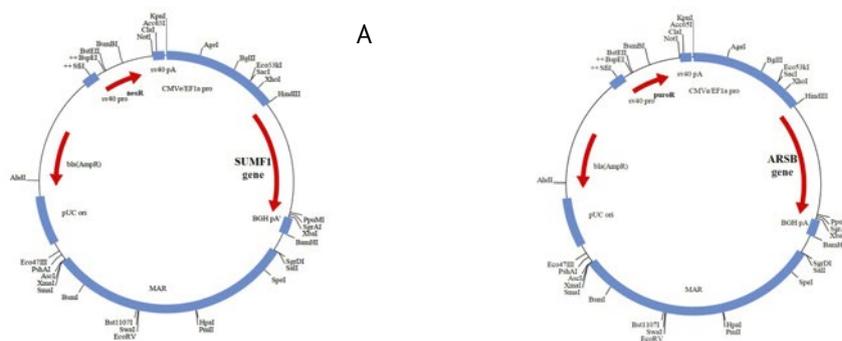
Культура клеток яичников китайского хомячка (CHO) (получена из коллекции клеточных культур НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика); среда для культивирования BalanCD Growth A (BCD) (FujiFilm, США); набор для экстракции РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия); буфер для электропорации MaxCyte (HyClone, США); поликлональные крысиные антитела против арилсульфатазы В (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); детектирующие крысиные антитела против арилсульфатазы В, конъюгированные с пероксидазой хрена (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); в качестве маркера молекулярной массы белков использовали Prestained Protein Ladder, 10–180 kDa (Thermo Scientific, США); среда для замораживания клеток Vambanker (Wako Chemicals, США); 4-метилумбеллиферил-сульфат-калиевой соли (Sigma, Япония); 4-метилумбеллиферон (Sigma, Япония).

### Методы

**Экспрессионные векторы с генами, кодирующими арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент.** Синтетические кодон-оптимизированные последовательности генов ферментов ASB и FGE (кодирующая нуклеотидная последовательность с фланкирующими сайтами рестрикции) были клонированы

<sup>1</sup> <https://www.genome.jp/entry/K01135>

<sup>2</sup> <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8NBK3>



**Рис. 1.** Реконбинантные экспрессионные векторы, кодирующие последовательности ASB (A) и FGE (B) человека. ARSB gene – ген фермента арилсульфатазы B; SUMF1 gene – ген формилглицин-генерирующего фермента; BGH pA – сигнал полиаденилирования соматотропина быка; MAR – стабилизирующая эухроматин последовательность; pUC ori – начало репликации; bla (AmpR) – бета-лактамаза, ген устойчивости к ампициллину; sv40pro – ранний промотор вируса SV40; sv40 pA – сайт полиаденилирования SV40; puroR – ген устойчивости к антибиотику пурамицину; NeoR – ген устойчивости к антибиотику неомицину; CMVe/EF1a pro – гибридный промотор, состоящий из энхансера вируса CMV и промотора транскрипции гена фактора элонгации.

**Fig. 1.** Recombinant expression vectors encoding human ASB (A) and FGE (B) sequences. ARSB gene—gene encoding the arylsulfatase B enzyme; SUMF1 gene—gene encoding the formylglycine-generating enzyme; BGH pA—bovine growth hormone polyadenylation signal; MAR—euchromatin stabilising sequence; pUC ori—the origin of replication; bla (AmpR)—beta-lactamase, ampicillin resistance gene; sv40pro—early promoter of the SV40 virus; sv40 pA—SV40 polyadenylation signal; puroR—puromycin resistance gene; neoR—neomycin resistance gene; CMVe/EF1a pro—hybrid promoter consisting of the CMV enhancer and the transcription promoter of the elongation factor gene.

для экспрессии в клетках CHO в экспрессионные векторы с разными селективными маркерами (рис. 1). Экспрессия генов находилась под контролем гибридного CMVe/EF1alpha промотора.

**Суспензионное культивирование клеток линии CHO.** Клетки линии CHO были адаптированы к суспензионному культивированию в среде, не содержащей сыворотку или другие компоненты животного происхождения. Клетки линии CHO культивировали в среде BCD при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности более 75% в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония).

**Расчет ростовых характеристик клеточных культур.** Плотность жизнеспособных клеток (VCD, viable cell density), жизнеспособность культуры клеток определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, США). Кумулятивную клеточную плотность (CCD) [26, 27] вычисляли по формуле (1):

$$CCD_2 = 0,5 \times (VCD_0 + VCD_1) \times \frac{T}{24} + CCD_1, (1)$$

где CCD<sub>2</sub> – кумулятивная клеточная плотность в день отбора пробы (×10<sup>6</sup> клеток×сут/мл); CCD<sub>1</sub> – кумулятивная клеточная плотность предыдущего дня отбора пробы (×10<sup>6</sup> клеток×сут/мл); T – время (ч), прошедшее между настоящей и предыдущей точкой отбора пробы в процессе культивирования; VCD<sub>0</sub> – начальная плотность жизнеспособных клеток (×10<sup>6</sup> клеток/мл); VCD<sub>1</sub> – конечная плотность жизнеспособных клеток (×10<sup>6</sup> клеток/мл).

Удельную продуктивность клеточных культур (Q<sub>p</sub>), выраженную в пг/(клетка×сут), вычисляли по формуле (2):

$$Q_p = \frac{(p_1 - p_0) / (VCD_0 + VCD_1) \times 0,5}{\text{Сутки}}, (2)$$

где p<sub>1</sub> – продуктивность в день пересева (мг/л); p<sub>0</sub> – продуктивность в нулевой день (в нашем случае начальное значение равно нулю); VCD<sub>0</sub> – начальная плотность жизнеспособных клеток (в нашем случае начальная плотность равна 0,3×10<sup>6</sup> клеток/мл); VCD<sub>1</sub> – конечная плотность жизнеспособных клеток в день пересева (×10<sup>6</sup> клеток/мл). Сутки – число суток культивирования. Уровень продуктивности клеточных культур устанавливали, определяя концентрацию ASB (мг/л) в культуральной жидкости методом ИФА.

**Трансфекция клеток линии CHO методом электропорации.** Клетки линии CHO были трансфицированы плазмидой, несущей ген фермента ASB, или двумя плазмидами, кодирующими гены ферментов ASB и FGE (рис. 1). За сутки до трансфекции клетки засеивали с плотностью 1,0×10<sup>6</sup> клеток/мл для достижения логарифмической фазы роста. Перед трансфекцией определяли плотность клеток и жизнеспособность культуры клеток, после чего отбирали 2,0×10<sup>8</sup> клеток, промывали с помощью стерильного фосфатно-буферного раствора (PBS) и осаждали центрифугированием при 180 g в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали

в 1 мл буфера для электропорации. В клеточную суспензию вносили плазмидную ДНК (20 мкг) и проводили электропорацию клеток в камерах ОС-100 с использованием системы для трансфекции MaxCyte STX (MaxCyte, США) [28]. В случае котрансфекции клеток линии CHO плазмидами, кодирующими гены ферментов ASB и FGE, плазмиды вносили в соотношениях, равных 50:50; 66,6:33,3; 90:10 (%).

**Получение минипулов.** Трансфицированные клетки высевали в концентрации  $5,0 \times 10^4$  клеток/мл в плоскостонные 96-луночные планшеты по 100 мкл/луночку в среде BCD с селективными антибиотиками (5 мг/л пурамицина и/или 500 мг/л неомидина). Всего для высевания трансфицированных клеток было использовано тридцать планшетов. Гетерогенные клеточные линии, продуцирующие целевой фермент (минипулы), культивировали в стационарных условиях в течение 18 суток при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 70%. Затем проводили скрининг по продуктивности минипулов из 96-луночных планшетов, после чего минипулы с самой высокой продуктивностью переводили в больший объем 6-луночных планшетов. Далее проводили скрининг минипулов из 6-луночных планшетов, после чего переводили минипулы с максимальной продуктивностью в колбы для адаптации роста.

**Криоконсервация клеток.** После подсчета и определения жизнеспособности культур клеток суспензию клеток осаждали центрифугированием при 180 g в течение 5 минут, супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли бессывороточную среду для замораживания клеток Vambanker (Wako Chemicals, США). Клетки минипулов и/или клонов замораживали по  $1,0 \times 10^7$  клеток/мл.

**Иммуноферментный анализ.** Для определения концентрации рекомбинантного фермента ASB в культуральной жидкости (продуктивность, мг/л) проводили непрямой неконкурентный гетерогенный иммуноферментный анализ (ИФА)<sup>3</sup> в 96-луночных планшетах Medi-sorb Microplates (Nunc, Дания). Для селективной сорбции ASB из культуральной жидкости использовали поликлональные крысиные антитела anti-ASB (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), 5 мг/л. В качестве детектирующих антител использовали крысиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена anti-ASB-HRP (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), 5 мг/л. В качестве стандарта использовали препарат рекомбинантной галсульфазы Наглазим (BioMarin, США). Измерения проводи-

ли на спектрофотометре Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, США).

**Получение клонов-продуцентов арилсульфатазы В.** Минипул, экспрессирующий ASB, был клонирован методом предельного разведения в среде BCD в 96-луночные планшеты с концентрацией 5 клеток/мл. Планшеты с растущими клонами клеток инкубировали в стационарных условиях в течение 10 суток при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 70% влажности. Для отслеживания роста клонов клеток использовали высококонтрастную систему клеточной визуализации Cell Metric (Solentim, Великобритания).

**Периодическое культивирование клеток.** Культивирование культур клеток проводили в биореакторе TubeSpin Bioreactor 50 (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария). Посевная концентрация клеток составляла  $0,3 \times 10^6$  клеток/мл, в качестве питательной среды использовали 25 мл BCD. Культивирование клеток проводили в условиях 5% CO<sub>2</sub> и 37 °С при 200 об/мин на шейкере-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC Kuhner (Kuhner, Германия). Процесс культивирования останавливали на 6 или 7 сутки, когда жизнеспособность продуцентов снижалась.

**Измерение активности арилсульфатазы В.** В основе метода оценки активности ASB лежит способность фермента отщеплять сульфатные остатки от молекулы субстрата – 4-метилумбеллиферил-сульфата-калиевой соли (Sigma, Япония). В результате реакции образуется флуоресцирующий продукт – 4-метилумбеллиферон. Уровень флуоресценции продукта реакции и стандартного раствора 4-метилумбеллиферона (Sigma, Япония) измеряли при 365/460 нм с помощью фотометра Synergy HTX (BioTek, США). Единицей активности ASB считали количество фермента, способного катализировать расщепление 1 мкмоль субстрата 4-метилумбеллиферил-сульфата-калиевой соли при 37 °С, pH 4,9–5,1, в течение 1 мин. Активность ASB в испытуемых образцах (А), выраженную в ЕД/мл, вычисляли по формуле (3):

$$A = \frac{(F_{\text{обр}} - F_{\text{сравн}}) \times 1 \times D}{30 \times 0,05 \times 1000}, \quad (3)$$

где  $F_{\text{обр}}$  – количество 4-метилумбеллиферона, образованное в реакционной смеси с испытуемыми образцами, вычисленное относительно калибровочного графика (нмоль);  $F_{\text{сравн}}$  – количество 4-метилумбеллиферона, образованное в реакционной смеси с раствором сравнения, вычисленное относительно калибровочного

<sup>3</sup> Alhaji M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>

**Таблица 1.** Пары праймеров и их последовательности, используемые для анализа ПЦР в реальном времени  
**Table 1.** Primer pairs and sequences used for real-time PCR analysis

Праймер <i>Primer</i>	Последовательность <i>Sequence</i>
ARSB for	GCCCTGATCACCAACCAC
ARSB rev	GGGCTTCAGGTACTCCTC
Fkbp1a for	CTCTCGGGACAGAAACAAGC
Fkbp1a rev	GACCTACACTCATCTGGGCTAC
Tmed2 for	GCCACATGGATGGGACATAC
Tmed2 rev	TGATGAGCTTCTGTCTCCATGTC

графика (нмоль);  $D$  – фактор разведения испытуемых образцов; 30 – время реакции (мин); 0,05 – объем разведенного испытуемого образца, внесенного в лунку (мл); 1000 – коэффициент пересчета единиц измерения.

**Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.** Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени использовали для оценки экспрессии гена ASB. РНК экстрагировали из  $10 \times 10^6$  клеток CHO с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя. Далее из выделенной мРНК методом обратной транскрипции получали кДНК с использованием системы синтеза SuperScript® IV (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя, используя случайные гексамеры в качестве праймеров. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler (Bio-rad, США) с использованием реакционной смеси qPCR mix-HS HighROX (Евроген, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Все значения были нормированы на уровни генов домашнего хозяйства Fkbp1a и Tmed2 с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [29]. Данные ПЦР в реальном времени анализировали с помощью программы QBase+<sup>4</sup>. Пары праймеров и их последовательности, используемые для анализа ПЦР в реальном времени, указаны в таблице 1.

**Приготовление лизатов клеток минипулов.** Суспензию клеток ( $2 \times 10^6$  клеток/мл) осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 минут, супернатант удаляли, осадок клеток промывали в 1,0 мл PBS. После промывки клетки осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 минут, супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в 100 мкл денатурирующего буфера, содержащего додецилсульфат натрия

и 2-меркаптоэтанол, после чего прогревали в течение 5 минут при 95 °C.

**Приготовление проб культуральной жидкости для электрофореза.** Культуральную жидкость отделяли от суспензии клеток центрифугированием при 500 g в течение 5 минут, после чего каждый образец разводили в денатурирующем буфере с 2-меркаптоэтанолом и нагревали 5 минут при 95 °C. Образцы подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Для визуализации белков в гель добавляли трихлорэтанол [30]. В качестве маркера молекулярной массы белков использовали Prestained Protein Ladder, 10–180 kDa (Thermo Scientific, США).

**Вестерн-блот.** После проведения электрофореза осуществляли перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану инкубировали в блокировочном растворе 2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США) и переносили в раствор крысиных поликлональных антител к ASB (1:2000, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) в течение 1 часа. Далее мембрану отмывали в PBS с добавлением Твина 20 (PBS-T) и переносили в раствор кроличьих антител P-RAQ Iss (1:5000, ИМ-ТЕК, Россия) в течение 1 часа. После инкубации мембрану отмывали в PBS-T и наносили проявочный раствор ECL Western Blotting (Bio-rad, США). Сигнал детектировали при помощи системы ChemiDoc XRS+Molecular Imager и программного обеспечения Image Lab, Version 3.0 (Bio-rad, США). В случае окрашивания лизатов использовали следующую пару антител, детектирующих вспомогательный FGE: поликлональные кроличьи антитела (Abcam, Великобритания) и ослиные антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GE Healthcare Life Sciences, США).

<sup>4</sup> <https://www.qbaseplus.com>

**Хроматографическая очистка арилсульфатазы В.** Хроматографическую очистку ASB проводили с использованием системы AKTA avant (GE Healthcare). Для этого культуральную жидкость, содержащую целевой белок, сорбировали на колонку Tricorn 10/50 объемом 4 мл (Cytiva, Австрия) с аффинно связывающим гликозилированные белки конканавалином А (ConA sepharose, Cytiva, Швеция), после чего промывали десятикратным объемом промывочного буфера (20 мМ HEPES; 0,5 М хлорид натрия; 1 мМ хлорид кальция; 1 мМ хлорид марганца; pH 7,1). Белок элюировали раствором, содержащим 20 мМ HEPES; 0,3 М метил- $\alpha$ -D-маннопиранозид; pH 7,1. Вторую стадию очистки проводили с использованием металл-хелатного сорбента IMAC sepharose FF (Cytiva, Швеция), предварительно насыщенного ионами двухвалентной меди. Колонку HiTrap, объем 1 мл (Cytiva, Австрия), уравнивали стартовым буфером (20 мМ натрий-фосфатный буферный раствор; 0,5 М хлорид натрия; pH 7,0) после чего наносили элюат с предыдущей стадии (объем 24 мл). Связанный белок промывали десятикратным объемом стартового буфера и затем элюировали буфером, содержащим 150 мМ имидазола (pH 6,0). Для третьей, финальной стадии очистки применялся катионообменный сорбент SP sepharose (Cytiva, Швеция). При нанесении элюат с предыдущей стадии (объем 5 мл) добавляли буфером (10 мМ натрий-ацетатный буферный раствор; pH 4,5) в три раза и наносили на уравновешенную (20 мМ натрий-ацетатный буферный раствор; pH 4,5) колонку (HiTrap, объем 1 мл). Целевую фракцию белка элюировали в линейном градиенте хлорид-ионов (10 мМ натрий-фосфатный буферный раствор; 0,5 М хлорид натрия; pH 5,8). Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм, используя в качестве коэффициента удельный показатель поглощения раствора целевого белка с концентрацией 1 мг/мл, равный 1,97. Выход белка составил 80 и 90% на второй и третьей стадиях очистки соответственно.

**Статистическая обработка результатов** была выполнена с использованием программы Graph Pad Prism 6. Применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA тест) или *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD); обозначали достоверность отличий: \*  $p_{\text{values}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$  или ns – нет статистической разницы.

## Результаты и обсуждение

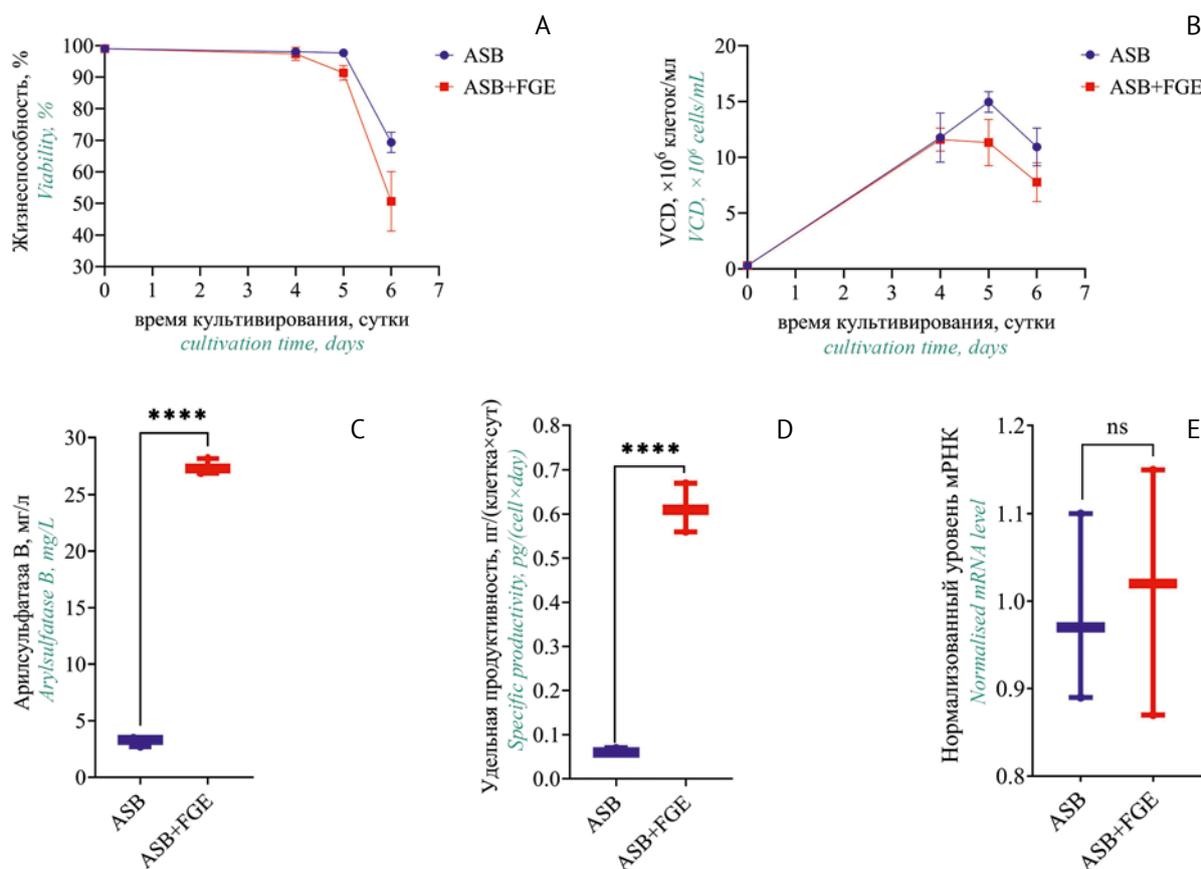
### **Увеличение продуктивности клона-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин-генерирующего фермента**

Клетки линии CHO трансфицировали плазмидой, несущей ген фермента ASB, с дальнейшим получением суспензионной моноклональной клеточной линии-продуцента ASB с использованием системы Cell Metric. Для изучения влияния FGE на экспрессию и активность ASB, была проведена трансфекция клона-продуцента ASB плазмидой, несущей ген вспомогательного фермента FGE, который участвует в посттрансляционной модификации активного центра ASB. Полученную клеточную линию, экспрессирующую оба фермента ASB+FGE (продуцент ASB+FGE), сравнивали с исходным клоном-продуцентом ASB.

В ходе сравнительного культивирования наблюдали значительное увеличение выхода фермента и удельной продуктивности клеточной линии, экспрессирующей оба фермента ASB+FGE, по сравнению с исходным клоном-продуцентом, экспрессирующим только фермент ASB (рис. 2С, 2D). Продуктивность исходного клона-продуцента ASB составила 3–5 мг/л, а продуктивность продуцента, коэкспрессирующего ASB+FGE, – 25 мг/л (рис. 2С). Существенных различий ростовых характеристик у данных клеточных линий не наблюдали (рис. 2А, 2В).

Наличие экспрессии экзогенного FGE у продуцента, экспрессирующего ферменты ASB+FGE, было подтверждено результатами вестерн-блот анализа клеточных лизатов, поскольку известно, что фермент FGE локализован в эндоплазматическом ретикулуме [21], где участвует в посттрансляционной модификации активного центра ASB (рис. 3С, 3D). Было показано, что уровень экзогенного FGE в клетках продуцента, коэкспрессирующего ASB+FGE, значительно выше (наличие видимого сигнала рис. 3D, дорожки 5–7), чем в клетках исходного клона-продуцента ASB (ниже предела детекции на рис. 3D, дорожки 2–4). Специфическое окрашивание экзогенного FGE у клона-продуцента ASB+FGE подтверждает тот факт, что коэкспрессия двух ферментов приводит к повышению выхода целевого белка ASB (рис. 3А, 3В, дорожки 5–7).

Для оценки влияния экспрессии экзогенного FGE на уровень мРНК гена ASB была проведена количественная ПЦР в реальном времени. В результате было показано, что уровни мРНК гена ASB у клеток исходного клона-продуцента ASB и клеток продуцента, коэкспрессирующе-



**Рис. 2.** Характеристики клона-производителя ASB после котрансфекции плазмидой с геном, кодирующим вспомогательный белок FGE. А – жизнеспособность клеток (%); В – плотность жизнеспособных клеток, VCD ( $\times 10^6$  клеток/мл); С – продуктивность (мг/л); D – удельная продуктивность клеток (пг/(клетка $\times$ сут)); E – нормализованный уровень мРНК. Обозначения на рисунке: ASB – клон-производитель ASB; ASB+FGE – производитель, коэкспрессирующий ферменты ASB и FGE.  $p_{\text{values}}$  рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB (\*  $p_{\text{values}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$ ; ns – нет статистической разницы).

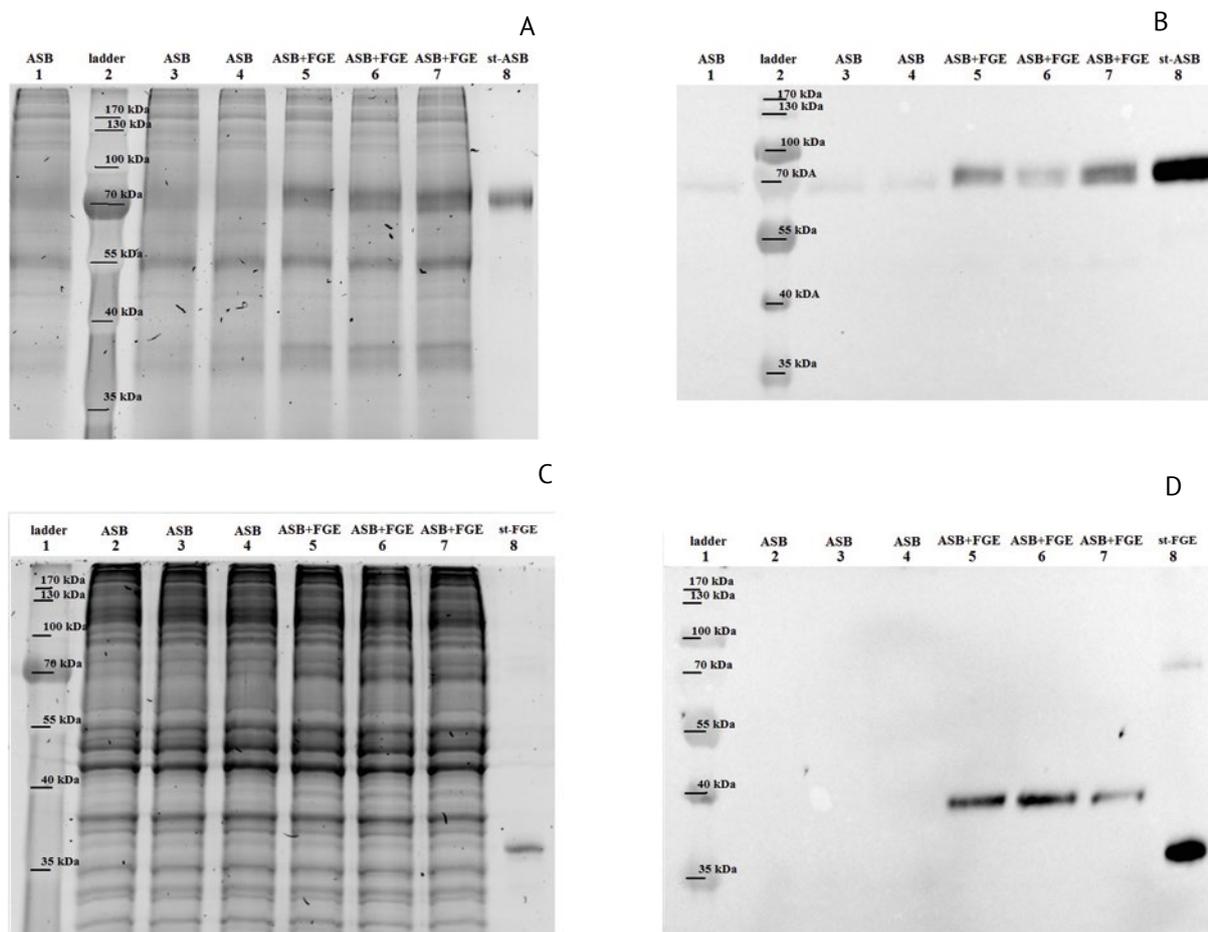
**Fig. 2.** Characteristics of the ASB-producing clone after cotransfection with a plasmid carrying the gene encoding the auxiliary FGE protein. A–cell viability (%); B–viable cell density, VCD ( $\times 10^6$  cells/mL); C–productivity (mg/L); D–specific productivity (pg/(cell $\times$ day)); E–normalised mRNA level. Symbols used in the figure: ASB–ASB-producing clone; ASB+FGE–producer coexpressing ASB and FGE enzymes.  $p_{\text{values}}$  were calculated by one-way ANOVA using the ASB group as control (\*  $p_{\text{values}} < 0.05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0.01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.0001$ , ns–no statistical difference).

го ASB+FGE, не различаются (рис 2E). При этом, как было показано ранее, уровень экспрессии секретируемого целевого фермента ASB в культуральную жидкость у этих клеточных линий отличается значительно (рис. 2C).

По совокупности полученных экспериментальных данных можно предположить следующий механизм увеличения продуктивности линии-производителя ASB за счет коэкспрессии вспомогательного белка FGE. В случае клона-производителя ASB, трансфицированного только одной плазмидой, кодирующей ген фермента ASB, в клеточной линии CHO наблюдается низкий уровень экспрессии эндогенного фермента FGE, из-за чего в клетках не может быть достигнут достаточный уровень посттрансляционной модификации фермента ASB, что при-

водит к неправильному фолдингу, низкой стабильности и частичному протеолизу фермента и, как следствие, низкому уровню его секреции клетками. В случае клона-производителя ASB, дополнительно трансфицированного плазмидой, кодирующей ген вспомогательного фермента FGE, по-видимому, происходит на достаточном уровне модификация активного центра целевого фермента ASB, катализируемая вспомогательным ферментом FGE, что обеспечивает правильный фолдинг, стабильную конфигурацию, функциональную активность ASB и способствует высокому уровню секреции фермента в культуральную жидкость.

Таким образом, с помощью коэкспрессии вспомогательного белка FGE, участвующего в посттрансляционной модификации активного



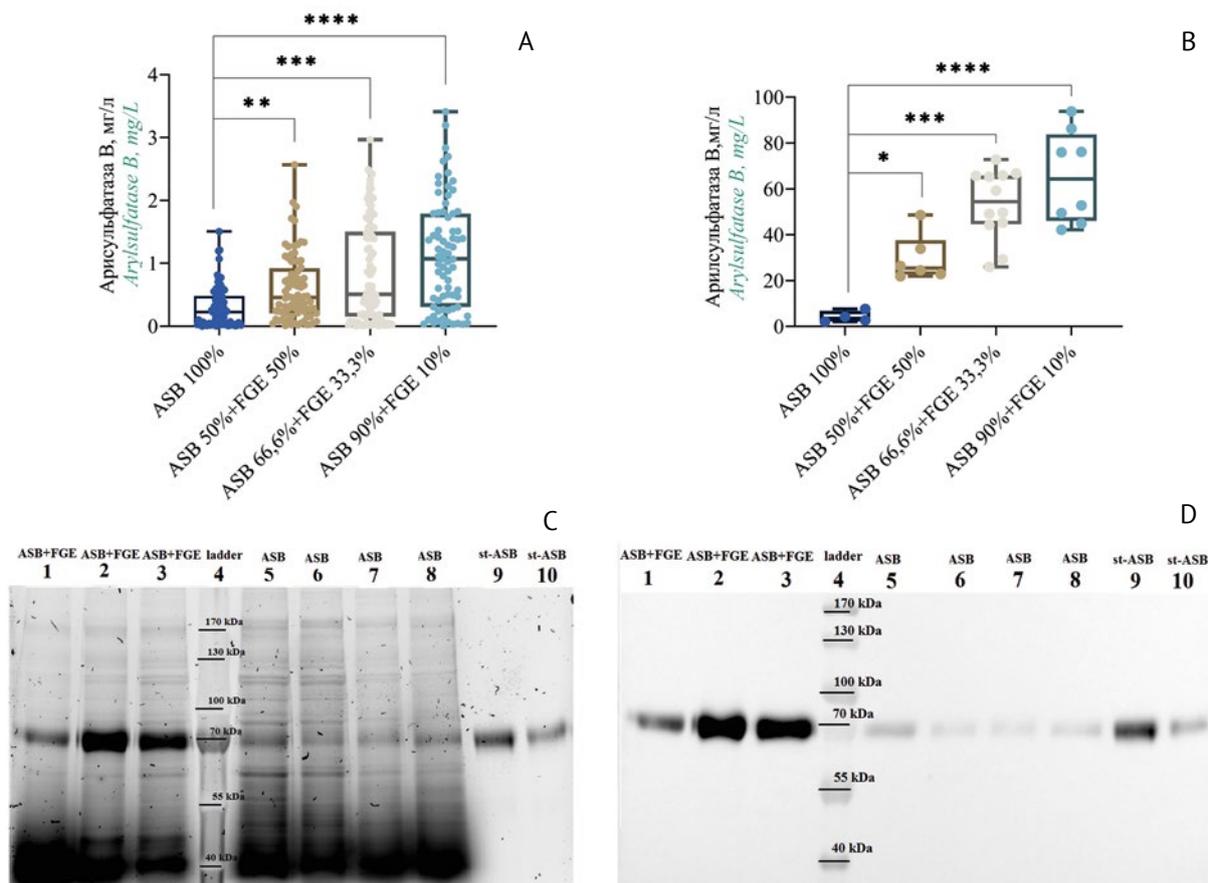
**Рис. 3.** Электрофореграмма и вестерн-блот анализ клон-продуцента ASB после котрансфекции плазмидой с геном, кодирующим вспомогательный белок FGE. А – электрофореграмма образцов культуральной жидкости (20 мкл/дорожка); В – вестерн-блот анализ образцов культуральной жидкости (антитела anti-ASB); С – электрофореграмма образцов лизатов ( $2 \times 10^5$  клеток/дорожка); I – вестерн-блот анализ образцов лизатов (антитела к FGE); D – вестерн-блот анализ образцов лизатов (антитела anti-FGE). Обозначения на рисунке: ASB – клон-продуцент ASB; ASB+FGE – продуцент, коэкспрессирующий ферменты ASB и FGE; st-FGE – рекомбинантный FGE; st-ASB – рекомбинантный ASB (Наглазим); ladder – маркер молекулярной массы белков (10–180 kDa); количество повторностей образцов,  $n = 3$ .  $p_{\text{values}}$  рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB (\*  $p_{\text{values}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$ ; ns – нет статистической разницы).

**Fig. 3.** Electropherogram and Western blot analysis of the ASB-producing clone after cotransfection with a plasmid carrying the gene encoding the auxiliary FGE protein. A—electropherogram of cell culture fluid samples (20  $\mu\text{L}$ /lane); B—Western blot analysis of cell culture fluid samples (anti-ASB antibodies); C—electropherogram of lysate samples ( $2 \times 10^5$  cells/lane); D—Western blot analysis of lysate samples (anti-FGE antibodies). Symbols used in the figure: ASB—ASB-producing clone; ASB+FGE—producer co-expressing ASB and FGE enzymes; st-FGE—recombinant FGE; st-ASB—recombinant ASB (Naglazyme); ladder—protein molecular weight marker (10–180 kDa); the number of replicate samples,  $n = 3$ .  $p_{\text{values}}$  were calculated by one-way ANOVA using the ASB group as control (\*  $p_{\text{values}} < 0.05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0.01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.0001$ , ns—no statistical difference).

**Таблица 2.** Соотношение плазмид при котрансфекции клеток линии CHO

**Table 2.** Plasmid ratios used for cotransfection of CHO cells

Вариант трансфекции <i>Transfection options</i>	Плазмиды, кодирующие гены ферментов ASB и FGE (соотношение плазмид, %) <i>Plasmids encoding ASB and FGE enzyme genes (plasmid ratio)</i>
1	ASB (100)
2	ASB+FGE (50:50)
3	ASB+FGE (66,6:33,3)
4	ASB+FGE (90:10)



**Рис. 4.** Выход целевого белка минипулов-продуцентов ASB в зависимости от разного соотношения при трансфекции плазмид с генами, кодирующими ферменты ASB и FGE. А – продуктивность при скрининге образцов культуральной жидкости минипулов-продуцентов из 96-луночных планшетов (мг/л); В – продуктивность при скрининге образцов культуральной жидкости минипулов-продуцентов в условиях периодического культивирования в биореакторе в течение 6 дней (мг/л); С – электрофорез образцов культуральной жидкости; D – вестерн-блот анализ образцов культуральной жидкости (антитела anti-ASB). Обозначения на рисунке: ASB – минипулы-продуценты ASB; ASB+FGE – минипулы-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB и FGE; st-ASB – рекомбинантный ASB (Наглазим); ladder – маркер молекулярной массы белков (10–180 кДа); количество повторностей образцов,  $n = 3$ . Данные  $p_{\text{value}}$  рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB 100% (\*  $p_{\text{values}} < 0,05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0,01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$ ). Точками обозначены отдельные минипулы.

**Fig. 4.** The target protein yield of ASB-producing minipools depending on different ratios used for transfection of plasmids carrying genes encoding ASB and FGE enzymes. A—productivity according to screening of culture fluid samples of producer minipools from 96-well plates (mg/L); B—productivity according to screening of culture fluid samples of producer minipools following batch cultivation in a bioreactor for 6 days (mg/L); C—electropherogram of culture fluid samples; D—Western blot analysis of cell culture fluids samples (anti-ASB antibodies). Symbols used in the figure: ASB—ASB-producing minipools; ASB+FGE—producer minipools coexpressing ASB and FGE enzymes; st-ASB—recombinant ASB (Naglazyme); ladder—protein molecular weight marker (10–180 kDa); the number of replicate samples,  $n = 3$ .  $p_{\text{values}}$  were calculated by one-way ANOVA using the 100% ASB group as control (\*  $p_{\text{values}} < 0.05$ , \*\*  $p_{\text{values}} < 0.01$ , \*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.001$ , \*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.0001$ ). Individual minipools are marked with dots.

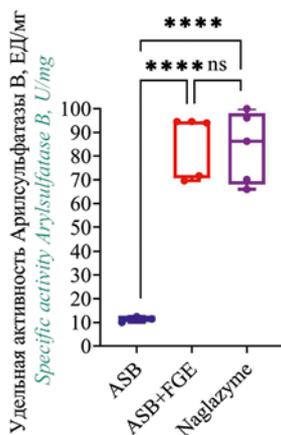
центра ASB, удалось увеличить выход целевого фермента ASB с 2,5 до 27 мг/л.

**Получение высокопродуктивной клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет подбора соотношения при трансфекции плазмид с генами, кодирующими целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент**

Для получения высокопродуктивных клеточных линий проводили котрансфекцию роди-

тельской клеточной линии CHO при различных соотношениях плазмид с генами, кодирующими целевой фермент ASB и вспомогательный фермент FGE. В первом варианте (контроль) использовали одну плазмиду с целевым геном фермента ASB. В других вариантах котрансфекцию проводили с использованием разных соотношений двух плазмид, кодирующих гены ферментов ASB и FGE (табл. 2).

После селекции в среде с антибиотиком проводили последовательный скрининг по продук-



**Рис. 5.** Удельная активность фермента арилсульфатазы В, ЕД/мг. Обозначения на рисунке: ASB – минипулы-продуценты ASB; ASB+FGE – минипулы-продуценты, коэкспрессирующие ферменты ASB и FGE; Naglazyme – рекомбинантный фермент галсульфазы (Наглазим). Данные  $p$ value рассчитывали с помощью теста one-way ANOVA, используя в качестве контроля группу ASB 100% (\*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0,0001$ , ns – нет статистической разницы). Точками обозначены отдельные минипулы.

**Fig. 5.** Specific activity of the arylsulfatase B enzyme, U/mg. Symbols used in the figure: ASB—ASB-producing minipools; ASB+FGE—producer minipools coexpressing ASB and FGE enzymes; Naglazyme—recombinant galsulfase enzyme.  $p$ values were calculated by one-way ANOVA using the 100% ASB group as control (\*\*\*\*  $p_{\text{values}} < 0.0001$ , ns—no statistical difference). Individual minipools are marked with dots.

тивности минипулов из 96-луночных и 6-луночных планшетов. В итоге было отобрано 5–10 минипулов с наибольшей продуктивностью из каждого варианта трансфекции (табл. 2). Уже на стадии скрининга минипулов из 96-луночных планшетов было отмечено повышение продуктивности фермента ASB минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB+FGE, по сравнению с минипулами-продуцентами ASB (рис. 3А,  $p_{\text{values}} < 0,0001$ ).

Проводили периодическое культивирование минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB+FGE, и минипулов-продуцентов ASB в течение 6 суток для оценки роста и продуктивности. Минипулы-продуценты, экспрессирующие только ASB, имели продуктивность до 10 мг/л. Минипулы-продуценты, коэкспрессирующие ASB+FGE, имели продуктивность до 100 мг/л (рис. 3В).

Наиболее значительное увеличение выхода целевого фермента ASB наблюдали у минипулов, полученных при оптимальном соотношении плазмид, кодирующих ферменты ASB и FGE (%), равном 90:10 (табл. 2, рис. 4А, 4В).

Наблюдалось повышение продуктивности минипулов-продуцентов, коэкспрессирующих ASB+FGE (рис. 4С, 4D, дорожки 1–3), по сравнению с минипулами, экспрессирующими только ASB (рис. 4С, 4D, дорожки 5–8), что коррелирует с показанным в вестерн-блот анализе повышенным уровнем экспрессии ASB в клетках продуцентов, полученных при введении экзогенной копии гена FGE.

Молекулярная масса полученного рекомбинантного фермента ASB и его удельная активность (рис. 5) сопоставима с рекомбинантным белком

коммерчески доступного препарата Наглазим (BioMarin, США) (рис. 4С, 4D, дорожки 9–10).

## Выводы

1. В результате проведенных исследований на основе клеточной линии CHO получены высокопродуктивные клеточные линии-продуценты рекомбинантного фермента арилсульфатазы В, коэкспрессирующие целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин-генерирующий фермент.
2. Увеличение выхода активного целевого фермента арилсульфатазы В с 5 до 100 мг/л достигнуто за счет подбора при трансфекции оптимального соотношения плазмид, кодирующих целевой и вспомогательный ферменты. Наибольший выход арилсульфатазы В наблюдался при соотношении плазмид, кодирующих гены ферментов ASB и FGE, равном 90:10 (%).
3. Улучшение продукционных свойств клеточной линии при коэкспрессии арилсульфатазы В и формилглицин-генерирующего фермента обусловлено, по-видимому, модификацией активного центра целевого фермента арилсульфатазы В, катализируемой вспомогательным формилглицин-генерирующим ферментом, что обеспечивает правильный фолдинг, стабильную конфигурацию и функциональную активность арилсульфатазы В.
4. Полученные результаты позволяют решить проблему низкого выхода рекомбинантной лизосомальной сульфатазы, что является характерной проблемой при производстве препаратов данного класса.

5. Полученные клеточные линии-продуценты могут быть использованы в дальнейшей разработке лекарственного препарата на основе

рекомбинантной арилсульфатазы В для ферментозаместительной терапии мукополисахаридоза VI типа.

## Литература/References

1. Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and degradation of glycans of the extracellular matrix: sulfated glycosaminoglycans, hyaluronan, and matriglycan. In: Barchi JJ, ed. *Comprehensive Glycoscience*. 2nd ed. Elsevier B.V.; 2021. P. 29–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819475-1.00018-3>
2. Matalon R, Matalon KM, Radhakrishnan GL. Chapter 35. The mucopolysaccharidoses. In: Rosenberg RN, Pascual JM, eds. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*. 5th ed. Elsevier Inc.; 2015. P. 347–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410529-4.00031-0>
3. Pastores GM. *Lysosomal Storage Disorders: Principles and Practice*. World Scientific; 2009. <https://doi.org/10.1142/7250>
4. Mehta A, Winchester B, eds. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118514672>
5. Remondino RG, Tello CA, Noel M, Wilson AF, Galarretto E, Bersusky E, Piantoni L. Clinical manifestations and surgical management of spinal lesions in patients with mucopolysaccharidosis: a report of 52 cases. *Spine Deform*. 2019;7(2):298–303. <https://doi.org/10.1016/j.jspd.2018.07.005>
6. Vollebregt AAM, Hoogeveen-Westerveld M, Kroos MA, Oussoren E, Plug I, Ruijter GJ, et al. Genotype–phenotype relationship in mucopolysaccharidosis II: predictive power of IDS variants for the neuronopathic phenotype. *Dev Med Child Neurol*. 2017;59(10):1063–70. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13467>
7. Burrow TA, Leslie ND. Review of the use of idursulfase in the treatment of mucopolysaccharidosis II. *Biologics*. 2008;2(2):311–20.
8. Harmatza P, Hendriks CJ, Lampe C, McGill JJ, Parini R, Leão-Teles E, et al. The effect of galsulfase enzyme replacement therapy on the growth of patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Mol Genet Metab*. 2017;122(1-2):107–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.03.008>
9. Harmatz P, Giugliani R, D Schwartz IV, Guffon N, Teles EL, Miranda MCS, et al. MPS VI Study Group. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab*. 2008;94(4):469–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.04.001>
10. Wiegmann EM, Westendorf E, Kalus I, Pringle TH, Lübke T, Dierks T. Arylsulfatase K, a novel lysosomal sulfatase. *J Biol Chem*. 2013;288(42):30019–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499541>
11. Ghosh D. Three-dimensional structures of sulfatases. *Methods Enzymol*. 2005;400:273–93. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)00016-9)
12. Ruijter J, de Ru MH, Wagemans T, Ijlst L, Lund AM, Orchard PJ, et al. Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III. *Mol Genet Metab*. 2012;107(4):705–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.024>
13. Reed MJ, Purohit A, Woo LWL, Newman SP, Potter BVL. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev*. 2005;26(2):171–202. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0003>
14. Peng J, Alam S, Radhakrishnan K, Mariappan M, Rudolph MG, May C, et al. Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction. *FEBS J*. 2015;282(17):3262–74. <https://doi.org/10.1111/febs.13347>
15. Appel MJ, Bertozzi CR. Formylglycine, a post-translationally generated residue with unique catalytic capabilities and biotechnology applications. *ACS Chem Biol*. 2015;10(1):72–84. <https://doi.org/10.1021/cb500897w>
16. Dierks T, Miech C, Hummerjohann J, Schmidt B, Kertesz MA, von Figura K. Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25560–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25560>
17. Dierksa T, Schlotawa L, Frese M-A, Radhakrishnan K, von Figura K, Schmidt B. Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann–Pick C1 disease – lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(4):710–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.015>
18. Diez-Roux G, Ballabio A. Sulfatases and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:355–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162334>
19. Demydchuk M, Hill CH, Zhou A, Bunkóczi G, Stein PE, Marchesanet D, et al. Insights into Hunter syndrome from the structure of iduronate-2-sulfatase. *Nat Commun*. 2017;8:15786. <https://doi.org/10.1038/ncomms15786>
20. Ulmer JE, Vilén EM, Namburi RB, Benjdia A, Benteau J, Malleron A, et al. Characterization of glycosaminoglycan (GAG) sulfatases from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* reveals the first GAG-specific bacterial endosulfatase. *J Biol Chem*. 2014;289(35):24289–303. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573303>
21. Dierks T, Dickmanns A, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Mariappan M, Figura K, et al. Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell*. 2005;121(4):541–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.001>

22. Dickmanns A, Schmidt B, Rudolph MG, Mariappan M, Dierks T, Figura K, Ficner R. Crystal structure of human pFGE, the paralog of the Calpha-formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem*. 2005;280(15):15180–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414317200>
23. Mariappan M, Preusser-Kunze A, Balleininger M, Eisele N, Schmidt B, Gande SL, et al. Expression, localization, structural, and functional characterization of pFGE, the paralog of the C $\alpha$ -formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem*. 2005;280(15):15173–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413698200>
24. Sardiello M, Annunziata I, Roma G, Ballabio A. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum Mol Genet*. 2005;14(21):3203–17. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi351>
25. Peng J, Alam S, Radhakrishnan K, Mariappan M, Rudolph MG, May C, et al. Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction. *FEBS J*. 2015;282(17):3262–74. <https://doi.org/10.1111/febs.13347>
26. Тимонова СС, Павелко ВИ, Кирик ИА, Бадэ ВН, Малыгина ТО, Хамитов РА, Пискунов АА. Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе CHO. *Биотехнология*. 2019;35(4):65–72. [Timonova SS, Pavelko VI, Kirik IA, Bade VN, Malygina TO, Khamitov RA, Piskunov AA. Principle of express selection of leading producing clones of monoclonal antibodies in the development of stable CHO-based cell lines. *Biotechnologiya = Biotechnology*. 2019;35(4):65–72 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72>
27. Muralidharan-Chari V, Wurz Z, Doyle F, Henry M, Diendorfer A, Tenenbaum SA, et al. PTSelect™: a post-transcriptional technology that enables rapid establishment of stable CHO cell lines and surveillance of clonal variation. *J Biotechnol*. 2021;325:360–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.09.025>
28. Steger K, Brady J, Wang W, Duskin M, Donato K, Peshwa M. CHO-S antibody titers >1 gram/liter using flow electroporation-mediated transient gene expression followed by rapid migration to high-yield stable cell lines. *J Biomol Screen*. 2015;20(4):545–51. <https://doi.org/10.1177/1087057114563494>
29. Brown AJ, Gibson S, Hatton D, James DC. Transcriptome-based identification of the optimal reference CHO genes for normalisation of qPCR data. *Biotechnol J*. 2018;13(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201700259>
30. Chopra A, Willmore WG, Biggar KK. Protein quantification and visualization via ultraviolet-dependent labeling with 2,2,2-trichloroethanol. *Sci Rep*. 2019;9(1):13923. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50385-9>

**Вклад авторов.** С.С. Тимонова – идея экспериментов, получение клеточных линий-продуцентов арилсульфатазы В, проведение исследования, анализ данных, написание текста статьи; К.А. Смолова – разработка методики очистки и выделения фермента; Д.Т. Зарипова – измерение мРНК; М.С. Пантюшенко – разработка метода измерения активности фермента; М.А. Королева – измерение активности фермента; Р.Л. Анисимов – дизайн генов ARBS и SUMF1, планирование и анализ работ по молекулярной биологии; Р.А. Хамитов – определение основного направления исследования, утверждение окончательной версии статьи; А.А. Пискунов – идея и планирование исследования, анализ данных; В.Н. Бадэ – идея и планирование исследования, анализ данных.

**Благодарности.** Данное исследование выполнено в рамках разработки биотехнологического препарата против мукополисахаридоза VI типа в АО «ГЕНЕРИУМ». Авторы выражают признательность коллегам, которые оказывали помощь в выполнении исследования, сотрудникам отдела молекулярной и клеточной биологии. Авторы также выражают особую благодарность менеджеру проекта, начальнику отдела молекулярной диагностики Н.А. Литвиновой.

**Конфликт интересов.** Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Authors' contributions.** S.S. Timonova—elaborated and planned the experiments, developed arylsulfatase B-producing cell lines, performed data analysis, wrote the manuscript; K.A. Smolova—developed the method for enzyme purification and isolation; D.T. Zaripova—performed measurement of mRNA; M.S. Pantyushenko—developed the method for enzymatic activity measurement; M.A. Koroleva—performed enzyme activity measurement; R.L. Anisimov—designed ARSB and SUMF1 genes, planned molecular biology experiments and analysed their results; R.A. Khamitov—supervised the project, approved the final version of the paper; A.A. Piskunov—contributed to the design and planning of the research, performed data analysis; V.N. Bade—contributed to the design and planning of the research, performed data analysis.

**Acknowledgements.** This study was carried out as part of the project for the development of a biotechnological product against mucopolysaccharidosis type VI at JSC “GENERIUM”. The authors are grateful to their colleagues from the Department of Molecular and Cellular Biology who helped them with this study. The authors also express special thanks to N.A. Litvinova, Head of the project, Head of the Molecular Diagnostics Department.

**Conflict of interest.** R.A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

## Об авторах / Authors

**Тимонова Софья Сергеевна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>  
[timonova1993@yandex.ru](mailto:timonova1993@yandex.ru)

**Смолова Ксения Александровна**, канд. хим. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>  
[Smolova@ibcgenerium.ru](mailto:Smolova@ibcgenerium.ru)

**Зарипова Доля Тагировна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6104-3352>  
[Zaripova@ibcgenerium.ru](mailto:Zaripova@ibcgenerium.ru)

**Пантюшенко Марина Семеновна**, канд. биол. наук.  
[Pantyushenko@ibcgenerium.ru](mailto:Pantyushenko@ibcgenerium.ru)

**Королева Мария Александровна**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5721-0557>  
[Kakoroleva@ibcgenerium.ru](mailto:Kakoroleva@ibcgenerium.ru)

**Анисимов Роман Львович**, канд. биол. наук.  
[Anisimov@ibcgenerium.ru](mailto:Anisimov@ibcgenerium.ru)

**Хамитов Равиль Авгатович**, д-р мед. наук, проф.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>  
[Khamitov@ibcgenerium.ru](mailto:Khamitov@ibcgenerium.ru)

**Пискунов Александр Александрович**, канд. биол. наук.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>  
[Piskunov@ibcgenerium.ru](mailto:Piskunov@ibcgenerium.ru)

**Бадэ Вероника Николаевна**, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>  
[Bade@ibcgenerium.ru](mailto:Bade@ibcgenerium.ru)

*Поступила 24.08.2021*

*После доработки 01.03.2022*

*Принята к публикации 11.03.2022*

**Sofia S. Timonova**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2733-7458>  
[timonova1993@yandex.ru](mailto:timonova1993@yandex.ru)

**Kseniya A. Smolova**, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>  
[Smolova@ibcgenerium.ru](mailto:Smolova@ibcgenerium.ru)

**Doliya T. Zaripova**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6104-3352>  
[Zaripova@ibcgenerium.ru](mailto:Zaripova@ibcgenerium.ru)

**Marina S. Pantyushenko**, Cand. Sci. (Biol.).  
[Pantyushenko@ibcgenerium.ru](mailto:Pantyushenko@ibcgenerium.ru)

**Mariya A. Koroleva**. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5721-0557>  
[Kakoroleva@ibcgenerium.ru](mailto:Kakoroleva@ibcgenerium.ru)

**Roman L. Anisimov**, Cand. Sci. (Biol.).  
[Anisimov@ibcgenerium.ru](mailto:Anisimov@ibcgenerium.ru)

**Ravil A. Khamitov**, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>  
[Khamitov@ibcgenerium.ru](mailto:Khamitov@ibcgenerium.ru)

**Aleksandr A. Piskunov**, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-5419>  
[Piskunov@ibcgenerium.ru](mailto:Piskunov@ibcgenerium.ru)

**Veronika N. Bade**, Cand. Sci. (Biol.) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>  
[Bade@ibcgenerium.ru](mailto:Bade@ibcgenerium.ru)

*Received 24 August 2021*

*Revised 1 March 2022*

*Accepted 11 March 2022*



## Использование малых объемов аналитических проб при определении невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом

А.А. Воропаев , О.В. Фадейкина, Д.С. Давыдов, А.А. Мовсесянц

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

✉ Воропаев Андрей Андреевич; [voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

### Резюме

Счетно-фотометрический метод определения невидимых механических включений, описанный в Государственной фармакопее Российской Федерации, предусматривает формирование из образцов лекарственных препаратов пробы объемом не менее 25 мл, необходимой для проведения четырех измерений, каждое объемом 5 мл. Для препаратов, выпускаемых, например, в готовых к использованию преднаполненных шприцах объемом 0,2–0,3 мл, метод требует объединения большого количества первичных упаковок, что экономически затратно. Для дорогостоящих препаратов актуальным является использование малых объемов аналитических проб при проведении испытаний счетно-фотометрическим методом. Применяющиеся на практике счетчики частиц позволяют проводить анализ лекарственных препаратов в объемах от 0,1 мл, но это требует оценки точности методики. **Цель работы:** оценить точность определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб. **Материалы и методы:** в работе использовали счетчик частиц HIAC 9703+; стандартные образцы счетной концентрации, содержащие  $0,998 \times 10^6$  частиц/мл и 3800 частиц/мл; суспензии стандартных латексных частиц с заданным размером (20 мкм). **Результаты:** оценена точность методики определения количества невидимых частиц счетно-фотометрическим методом при использовании малых аналитических проб объемом от 0,1 до 5,0 мл: правильность составила 96–100%; повторяемость – 0,8–1,8%; коэффициенты корреляции линейной зависимости расчетного количества частиц от теоретического значения – более 0,999. Проведение измерений с аналитической пробой объемом 0,1 мл нецелесообразно из-за недостаточной точности результатов. Относительное стандартное отклонение результатов измерений количества невидимых частиц, получаемых при использовании аналитических проб объемом от 0,2 до 5,0 мл, не превышает относительной погрешности результатов измерений счетчика частиц. При проведении испытания с использованием малых аналитических проб (0,2–1,0 мл) рекомендуется использовать шприц-пробоотборник объемом 1 мл. Показана необходимость предварительной установки объема преаналитической пробы (не менее 0,1 мл). Сравнительные испытания биологических лекарственных препаратов белковой природы (7 наименований) при использовании стандартной (5,0 мл) и малой (0,5 мл) аналитических проб продемонстрировали сопоставимые результаты. **Выводы:** анализ результатов проведенных исследований свидетельствует о возможности использования счетно-фотометрического метода с малыми объемами аналитических проб.

**Ключевые слова:** счетно-фотометрический метод; невидимые механические включения; биологические лекарственные препараты

**Для цитирования:** Воропаев А.А., Фадейкина О.В., Давыдов Д.С., Мовсесянц А.А. Использование малых объемов аналитических проб при определении невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):94–104. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-94-104>

## The use of small volumes of test samples in subvisible particle testing by the light obscuration method

A.A. Voropaev ✉, O.V. Fadeikina, D.S. Davydov, A.A. Movsesyants

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

✉ Andrey A. Voropaev; [voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

### Abstract

The light obscuration method described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation for subvisible particle testing, provides for preparation of a pooled sample with a minimum volume of 25 mL to be used in four measurements, each with 5.0 mL of the test sample. In the case of, for example, ready-to-use 0.2–0.3 mL pre-filled syringes, the method requires pooling the contents of a large number of products, which is economically costly. The use of small volumes of test samples in measurements by the light obscuration method is especially relevant for expensive medicines. Current particle counters allow for testing of 0.1 mL samples, but this requires assessment of the procedure's accuracy. **The aim of the study** was to assess the accuracy of subvisible particle testing by the light obscuration method for small volumes of test samples. **Materials and methods:** we used an HIAC 9703+ liquid particle counter; particle count reference standards containing  $0.998 \times 10^6$  particles/mL and 3800 particles/mL; suspensions of standard latex particles with a known size (20  $\mu\text{m}$ ). **Results:** the study assessed the accuracy of subvisible particle determination by the light obscuration method for small test samples of 0.1–0.5 mL: trueness was 96–100%; repeatability was 0.8–1.8%; linear correlation coefficients for the calculated versus theoretical number of particles were more than 0.999. The use of 0.1 mL test samples is impractical because of insufficient accuracy of the test results. The relative standard deviation of subvisible particle measurements obtained with 0.2–5.0 mL test samples did not exceed the measurement error of the instrument. The use of small test samples (0.2–1.0 mL) requires the use of a 1 mL sampling syringe. The study demonstrated the need for determination of the pre-run volume (not less than 0.1 mL). Comparative testing of standard (5.0 mL) and small (0.5 mL) samples of protein-based biological products showed comparable results. **Conclusions:** the study demonstrated that the light obscuration method could be used for small volumes of test samples.

**Key words:** light obscuration method; subvisible particulate matter; biological products

**For citation:** Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Davydov D.S., Movsesyants A.A. The use of small volumes of test samples in subvisible particle testing by the light obscuration method. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):94–104. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-94-104>

### Введение

Определение невидимых невооруженным глазом механических включений является одним из критических показателей качества для парентеральных лекарственных препара-

тов. Согласно базе данных FDA Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts 23 из 59 (39%) отзывов и изъятий лекарственных препаратов с рынка США и предупреждений об их безопасности в период с 2018 по 2020 г. были

связаны с загрязнением данных препаратов посторонними частицами<sup>1</sup>. Такие частицы могут иметь внешнее происхождение, не связанное с самим препаратом (пыль, волосы, пыльца и др.); внутреннее происхождение, связанное с производством препарата (частицы первичной упаковки, металлические частицы конвейера и др.); или могут быть собственными частицами препарата, что характерно для белковых препаратов, способных к образованию агрегатов, например моноклональных антител [1, 2].

Методика определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом предусматривает проведение четырех измерений, каждое объемом по 5,0 мл, с общим объемом пробы не менее 25 мл. Для препаратов, выпускаемых в дозированных формах малого объема, например в готовых к использованию преднаполненных шприцах объемом 0,2 или 0,3 мл, методика требует объединения большого количества упаковок (например, 125 упаковок для дозировки 0,2 мл и 84 упаковки для препаратов дозировкой по 0,3 мл), что является чрезвычайно экономически затратным для дорогостоящих препаратов. В 2012 г. Фармакопейная Конвенция США (USP) опубликовала монографию <787> «Невидимые механические включения в инъекционных лекарственных препаратах белковой природы»<sup>2</sup>, в которой описывалось измерение невидимых частиц счетно-фотометрическим методом, но в существенно меньших объемах. В данной монографии предлагается проводить подсчет частиц в четырех аналитических пробах объемом от 0,2 до 5,0 мл на выбор пользователя в зависимости от объема первичной упаковки. 1 августа 2014 г. монография <787> USP вступила в силу на территории США. Российская<sup>3</sup> и Европейская фармакопеи<sup>4</sup> пока не допускают использование уменьшенных объемов аналитической пробы, тем не менее европейские исследователи поддерживают использование малых объемов аналитических проб [3].

Цель работы – оценить точность определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб.

## Материалы и методы

### Материалы

- вода очищенная, полученная на установке Milli-Q Integral 10 (Millipore Corp., Франция);
- стандартные образцы счетной концентрации: суспензия латексных частиц для проверки концентрации (серия 7497044F; Beckman Coulter Life Sciences, США, концентрация  $0,998 \times 10^6$  частиц/мл  $\pm 10\%$ ); PHARM-TROL™ Particle Count Control (серия 227847, Thermo Scientific™, США, концентрация 3800 частиц/мл  $\pm 15\%$ );
- суспензия стандартных латексных частиц NIST (National Institute of Standards and Technology) Coulter® CC Size Standard с заданным размером 20 мкм (серия 477062K; Beckman Coulter Life Sciences, США).  
Биологические лекарственные препараты:
- Иммуновенин, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения (серия У111, АО «НПО «Микроген», Россия);
- Плазбумин-20, раствор для инфузий 20% (серия P1EC6AY001, «Грифолз Терапьютикс Инк», США);
- Коэйт-ДВИ, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения (серия B2NAB00053, «Грифолз Терапьютикс Инк», США);
- Интерферон бета-1b, раствор для подкожного введения (серия V740421S, ЗАО «БИОКАД», Россия);
- Хайгарда, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения (серии P100255524, P100255084, «СиЭсЭл Беринг ГмбХ», Германия);
- Тебериф, раствор для подкожного введения (серия V200220S, ЗАО «БИОКАД», Россия).

### Методы

**Метод счетно-фотометрический.** Испытания проводили на счетчике частиц в жидкости HIAC 9703+ (Beckman Coulter Life Sciences, США), с программным обеспечением PharmSpec. Объем аналитической пробы 0,2–5,0 мл. Количество измерений 4, при этом не принимали в расчет результаты определения для первой пробы и рассчитывали среднее число частиц в испытуемом образце<sup>5</sup>. Критерий приемлемости результатов:

<sup>1</sup> <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts>

<sup>2</sup> USP 41–NF 36 <787> Subvisible particulate matter in therapeutic protein injections.

<sup>3</sup> Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>4</sup> 2.9.19. Particulate contamination: sub-visible particles. European Pharmacopoeia 10th ed.

<sup>5</sup> Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

относительная погрешность не должна превышать  $\pm 30\%$ <sup>6</sup>, коэффициент корреляции линейной зависимости должен быть не менее 0,99<sup>7</sup>.

**Весовой метод определения точности дозирования пробы.** Воду очищенную наливали в стакан и взвешивали с точностью до 0,0001 г на весах аналитических ВР-2215 (ООО «Сартогосм», Россия). После этого отбирали одну аналитическую пробу счетчиком частиц HIAC 9703+ и проводили повторное взвешивание. Повторяли данную процедуру пять раз. По разности масс определяли массу одной дозы и рассчитывали точность дозирования счетчика частиц.

**Подготовка суспензии стандартного образца счетной концентрации.** Тщательно перемешивали суспензию стандартных латексных частиц (Beckman Coulter Life Sciences, США) в течение 15 с на вортексе. Ожидали 10 минут для оседания пены. После этого переносили 200 мкл суспензии в лабораторный стакан, добавляли 20 мл воды очищенной и перемешивали на магнитной мешалке счетчика HIAC 9703+ при 350 об/мин. Концентрация частиц в подготовленной суспензии согласно паспорту составляет  $0,998 \times 10^3$  частиц/мл с погрешностью 10%.

**Подготовка суспензии стандартных латексных частиц NIST.** В лабораторный стакан с 800 мл воды очищенной добавляли суспензию стандартных латексных частиц по каплям при постоянном перемешивании на магнитной мешалке счетчика HIAC 9703+ при 350 об/мин. При этом измеряли количество частиц в 1 мл, доводя концентрацию частиц до верхнего предела измерения счетчика. После этого суспензию перемешивали в течение 10 минут и переносили 400 мл в другой стакан, содержащий 400 мл воды очищенной, для получения двукратного разведения. Снова перемешивали в течение 10 мин и проводили следующее двукратное разведение. Таким способом готовили пять разведений исходной суспензии (суспензии 1–5) и использовали их для оценки линейности методики и влияния преаналитического объема на точность измерений.

**Статистическая обработка результатов.** Рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение ( $S$ ), относительное стандартное отклонение ( $RSD$ ), коэффициент корреляции ( $r$ ) с помощью программы Excel [4]. Статистическую значимость различий групп данных оценивали

с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку характеристик точности (правильность, повторяемость, линейность) методики с малыми пробами проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик<sup>8</sup>.

## Результаты и обсуждение

**Факторы, влияющие на результаты определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб**

**Влияние шприца-пробоотборника.** Возможные комплектации счетчика частиц в жидкости HIAC 9703+ включают шприцы-пробоотборники объемом 1, 10 и 25 мл. В данной работе использовали шприц-пробоотборник объемом 10 мл, являющийся стандартным для проведения испытаний по фармакопейным методикам, и шприц-пробоотборник объемом 1 мл для испытания образцов с малым объемом. Программное обеспечение счетчика частиц позволяет провести испытания любым объемом вне зависимости от установленного шприца-пробоотборника. Для оценки точности измерений в зависимости от шприца-пробоотборника проводили подсчет количества частиц с разными аналитическими пробами в подготовленной модельной смеси стандартного образца счетной концентрации частиц. Использовался шприц-пробоотборник объемом 10 мл. Итоговый результат рассчитывали на 1,0 мл образца. Результаты представлены на рисунке 1.

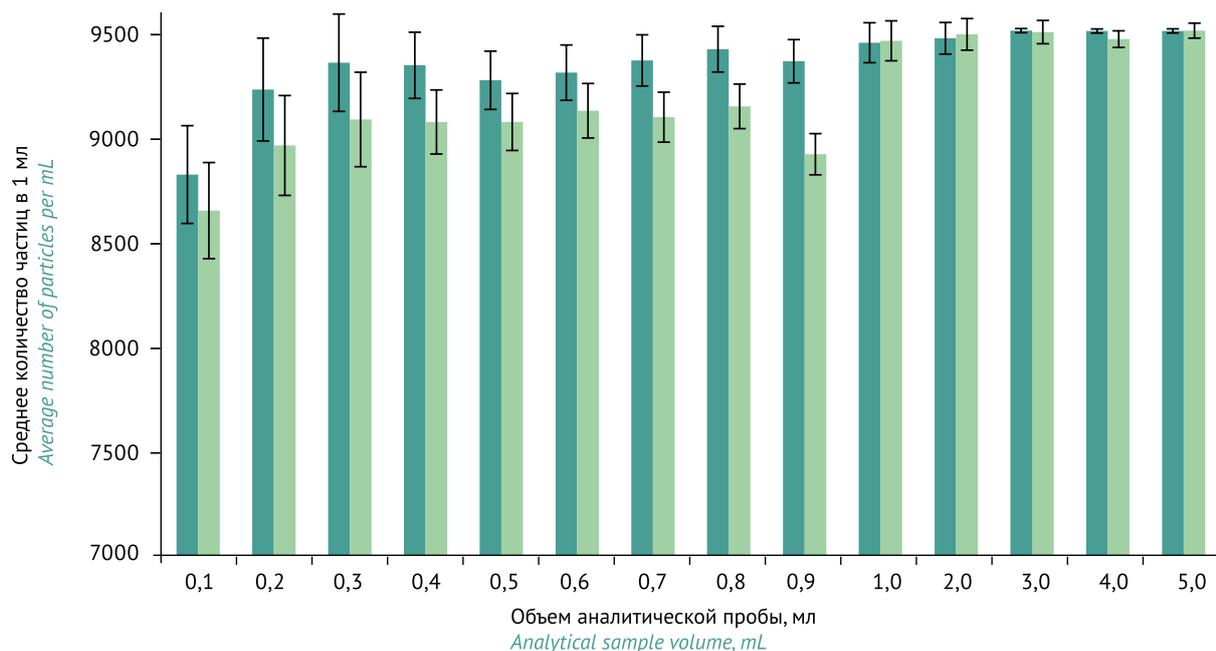
При объеме аналитической пробы от 1,0 до 5,0 мл правильность измерений находится в интервале 99,5–100,0%. Наилучший результат зафиксирован для аналитической пробы 5,0 мл. Повторяемость результатов ( $RSD$ ) составила 0,4–1,0%. При измерении аналитической пробой менее 1,0 мл точность результата заметно уменьшилась: отличие среднего значения измеренного количества частиц от паспортного значения достигало 10% и находилось в интервале 90,9–93,8% при высокой повторяемости 1,1–2,7%.

При замене шприца-пробоотборника объемом 10 мл на шприц объемом 1 мл правильность измерений аналитических проб малых объемов (от 0,2 до 0,9 мл) существенно возрастала: до 97–100%.

<sup>6</sup> Методика поверки МП 242-2221-2018 Государственная система обеспечения единства измерений. Счетчики частиц в жидкости HIAC 9703.

<sup>7</sup> Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

<sup>8</sup> Там же.



**Рис. 1.** Влияние объема шприца-пробоотборника на точность измерения количества частиц. Светло-зеленым цветом обозначены результаты, полученные при использовании шприца-пробоотборника объемом 10 мл. Темно-зеленым цветом обозначены результаты, полученные при использовании шприца-пробоотборника объемом 10 мл (аналитических пробы объемом 1,0–5,0 мл) и шприца-пробоотборника объемом 1 мл (аналитических пробы объемом 0,1–0,9 мл).

**Fig. 1.** Effect of the sampling syringe volume on the accuracy of the particle count measurement. The light green colour shows the results obtained with a 10 mL syringe. The dark green colour shows the results obtained with a 10 mL syringe (for 1.0–5.0 mL test samples) and a 1 mL syringe (for 0.1–0.9 mL test samples).

Правильность при использовании аналитической пробы объемом 0,1 мл составила 93%.

Различия результатов измерений при использовании разных шприцов-пробоотборников можно объяснить недостаточной точностью дозирования пробы. Точность дозирования определяли весовым методом, проводя взвешивание пробы до и после отбора дозы. По разности масс определяли массу одной дозы и рассчитывали точность дозирования счетчика частиц. В расчетах массы пробы использовали значение плотности воды при 20 °С, равное 998,2067 кг/м<sup>3</sup> [5]. Используя полученные значения, рассчитывали правильность дозирования пробы счетчиком частиц разными шприцами-пробоотборниками. Результаты оценки средней массы дозы в зависимости от объема используемого шприца-пробоотборника приведены в таблице 1.

Как следует из данных, представленных в таблице 1, точность дозирования шприца-пробоотборника объемом 1 мл составляет не менее 99,7%. В то время как точность дозирования тех же аналитических проб шприцом-пробоотборником объемом 10 мл значительно меньше: от 86,2 до 97,8%.

Таким образом, при проведении испытаний с малыми аналитическими пробами (менее 1,0 мл) следует использовать шприц-пробоот-

борник объемом 1 мл, а для аналитических проб от 1,0 до 5,0 мл – стандартный шприц-пробоотборник объемом 10 мл. Аналитическую пробу, равную 0,1 мл, использовать нецелесообразно из-за недостаточной точности.

#### **Влияние объема преаналитической пробы.**

Преаналитическая проба отбирается счетчиком частиц между отдельными аналитическими пробами прибором для стабилизации скорости потока жидкости до подсчета частиц. Слишком большой объем преаналитической пробы увеличивает общий объем пробы, поэтому необходимо определить минимальный объем преаналитической пробы, при котором сохраняется необходимая точность измерений. Для определения минимального объема преаналитической пробы использовали суспензии стандартных латексных частиц NIST размером 20 мкм в концентрации около 500 частиц в 1 мл. Результаты оценки влияния объема преаналитической пробы представлены на рисунке 2.

Дисперсионный анализ (ANOVA) результатов показал, что различия между группами с объемом преаналитической пробы от 0,1 до 0,4 мл статистически не значимы:

$$F_{\text{эксп}} = 1,009 < F_{\text{крит}} (df=3;0,05) = 2,683.$$

При анализе групп данных, включающих результаты измерений без установки объема преа-

**Таблица 1.** Результаты оценки правильности дозирования пробы шприцами-пробоотборниками разного объема  
**Table 1.** Evaluation of the sampling accuracy of syringes with different volumes

Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>	Объем шприца-пробоотборника 1 мл <i>1 mL sampling syringe</i>		Объем шприца-пробоотборника 10 мл <i>10 mL sampling syringe</i>	
	средняя масса пробы, г <i>average sample mass, g</i>	правильность, процент от рассчитанной массы пробы, % <i>accuracy, percentage of the calculated mass of the sample, %</i>	средняя масса пробы, г <i>average sample mass, g</i>	правильность, процент от рассчитанной массы пробы, % <i>accuracy, percentage of the calculated mass of the sample, %</i>
0,200	0,200	100,1	0,172	86,2
0,300	0,299	99,9	0,264	88,3
0,400	0,399	100,0	0,371	93,0
0,600	0,598	99,9	0,576	96,2
0,800	0,797	99,8	0,781	97,8
1,000	0,995	99,7	0,977	97,9

налитической пробы (0,0 мл), появляются статистически значимые отличия:

$$F_{\text{эксп}} = 3,498 > F_{\text{крит}}(df=4;0,05) = 2,434.$$

Следовательно, проведение испытания без предварительной установки преаналитической пробы может привести к получению некорректного результата.

Таким образом, при проведении испытания по показателю «Механические включения (невидимые)» счетно-фотометрическим методом при использовании малых объемов аналитических проб в настройках прибора необходимо предусматривать обязательную установку преаналитической пробы объемом от 0,1 до 0,4 мл.

**Оценка характеристик точности методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб**

Показатели правильности и повторяемости методики оценивали с использованием стандартного образца счетной концентрации PHARM-TROL™ Particle Count Control. Правильность определения концентрации частиц оценивали двумя способами. В первом случае рассчитывали процент от номинального (согласно паспорту) количества частиц в стандартном образце счетной концентрации. Во втором случае рассчитывали процент от количества частиц, определенного при анализе с аналитической пробой объемом 5,0 мл, так как данный объем является стандартным при реализации действующей фармакопейной методики. Повторяемость оценивали как относительное стандартное отклонение (*RSD*) результатов определения коли-

чества частиц. Результаты приведены в таблицах 2 и 3.

Из приведенных в таблице 2 данных следует, что для пробы объемом 0,2 мл значение показателей правильности является наименьшим (97 и 96%) среди исследуемых аналитических проб. А величина *RSD*, равная 1,8%, характеризующая меру разброса результатов измерения количества частиц, является максимальной.

Оценку линейности проводили с использованием стандартных латексных частиц NIST. Результаты приведены в таблице 3.

Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что максимальное отклонение результатов определения количества частиц при использовании малых объемов аналитических проб (2,0; 1,0; 0,5; 0,2 мл) не превышает 8% (для суспензии 4). Минимальное значение показателя правильности составило 92,1% (для суспензии 4), т.е. относительное отклонение от среднего количества частиц, измеренного с использованием аналитической пробы объемом 0,2 мл, не превышает 7,9%. Результаты регрессионного анализа, проведенного по методу наименьших квадратов с линейной моделью  $y = bx + a$ , и коэффициент корреляции  $r$  представлены в таблице 4. Для каждой аналитической пробы коэффициент корреляции  $r > 0,999$ , а угловые коэффициенты линейной зависимости  $b$  сопоставимы между собой.

Оценка характеристик точности методики с использованием малых объемов аналитической пробы показала, что возможно проведение испытаний с использованием любого из объемов от 0,2 до 5,0 мл, так как все результаты с использованием малых объемов аналитических проб

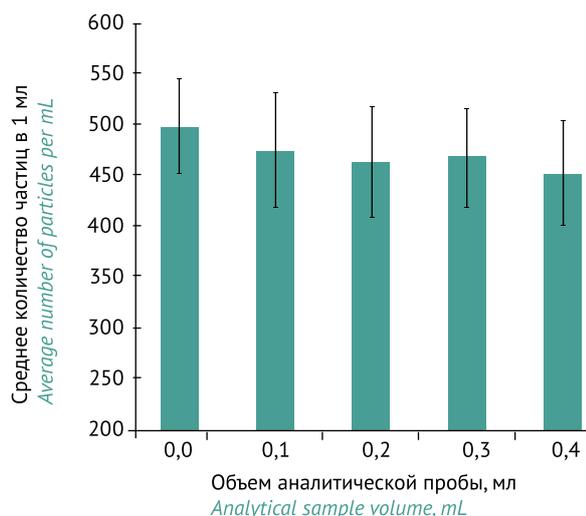


Рис. 2. Влияние объема преаналитической пробы на точность измерений количества частиц.

Fig. 2. Effect of the pre-run volume on the measurement accuracy.

удовлетворяют предъявляемому критерию приемлемости измерения количества частиц.

**Описание методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб.**

Содержимое не менее 10 первичных упаковок лекарственных средств объединяют в одну пробу. В настройках прибора устанавливают объем преаналитической пробы, равный

0,1 мл. При использовании аналитической пробы объемом менее 1,0 мл необходимо заменить шприц-пробоотборник объемом 10 мл на шприц-пробоотборник для малого объема. Определяют число частиц размером, равным или превышающим 10 и 25 мкм. Проводят четыре измерения с объемом аналитической пробы от 0,2 до 5,0 мл (в зависимости от объема первичной упаковки). Результаты первого измерения не учитывают и рассчитывают среднее количество частиц в одной емкости.

Таблица 2. Результаты оценки правильности и повторяемости методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб

Table 2. Assessment of the trueness and repeatability of subvisible particle determination by the light obscuration method with small test samples

Характеристика <i>Characteristic</i>	Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>				
	5,0	2,0	1,0	0,5	0,2
Среднее количество частиц в 1 мл ± стандартное отклонение <i>Average number of particles per mL ± standard deviation</i>	3836±16	3788±32	3762±32	3741±54	3691±65
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	0,4	0,8	1,2	1,4	1,8
Правильность, процент от номинального количества частиц в стандартном образце счетной концентрации, % <i>Trueness, percentage of the nominal number of particles in the particle count reference standard, %</i>	101	100	99	98	97
Правильность, процент от количества частиц, определенных с объемом аналитической пробы 5,0 мл, % <i>Trueness, percentage of the calculated number of particles in the 5.0 mL test sample, %</i>	100	99	98	98	96

Примечание. RSD, % – относительное стандартное отклонение.  
Note. RSD, % – relative standard deviation.

**Таблица 3.** Результаты оценки линейности методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб**Table 3.** Assessment of the linearity of subvisible particle determination by the light obscuration method with small test samples

Характеристика <i>Characteristic</i>	Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>				
	5,0	2,0	1,0	0,5	0,2
<b>Суспензия 1</b> <i>Suspension 1</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	8596	8694	8663	8563	8385
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	109	35	47	170	177
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	1,3	0,4	0,5	2,0	2,1
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100	101	101	97	98
<b>Суспензия 2</b> <i>Suspension 2</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	4447	4422	4388	4305	4257
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	45	430	16	36	63
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	1,0	1,0	0,4	0,8	1,5
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100	99,4	98,7	96,8	95,7
<b>Суспензия 3</b> <i>Suspension 3</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	2143	2111	2099	2082	2081
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	29	23	27	36	8
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	1,4	1,1	1,3	1,8	0,4
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100	98,5	98,0	97,2	97,1
<b>Суспензия 4</b> <i>Suspension 4</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	1048	1049	1022	1017	965
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	10	10	27	20	43
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	0,9	0,9	2,6	1,9	4,5
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100,0	100,1	97,5	97,0	92,1

Продолжение таблицы 3  
Table 3 (continued)

Характеристика <i>Characteristic</i>	Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>				
	5,0	2,0	1,0	0,5	0,2
<b>Суспензия 5</b> <i>Suspension 5</i>					
Среднее значение количества частиц, шт./мл <i>Average number of particles, pcs/mL</i>	518	510	529	516	543
Стандартное отклонение, мкг/мл <i>Standard deviation, µg/mL</i>	6	10	10	22	33
Повторяемость (RSD), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	1,2	2,0	1,8	4,2	6,5
Правильность, % <i>Trueness, %</i>	100,0	98,5	100,6	100,3	97,1

*Примечание.* RSD, % – относительное стандартное отклонение. Правильность рассчитана как процент от количества частиц, определенного с объемом аналитической пробы 5,0 мл.

*Note.* RSD, % – relative standard deviation. Trueness was determined as a percentage of the calculated number of particles in the 5.0 mL test sample.

**Таблица 4.** Результаты регрессионного анализа оценки линейности методики определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб

**Table 4.** Regression analysis of the linearity of subvisible particle determination by the light obscuration method with small test samples

Параметры линейной зависимости <i>Linear dependence parameters</i>	Объем аналитической пробы, мл <i>Test sample volume, mL</i>				
	5,0	2,0	1,0	0,5	0,2
Множественный коэффициент корреляции <i>r</i> <i>Multiple correlation coefficient r</i>	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Угловой коэффициент линейной зависимости <i>b</i> <i>Slope of the linear function b</i>	1,017	1,030	1,033	1,007	1,015
Свободный член линейной зависимости <i>a</i> <i>Y-intercept of the linear function a</i>	-0,041	-35,58	-54,04	-29,83	-71,44

#### **Испытания биологических лекарственных препаратов с использованием малых объемов аналитических проб при определении невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом**

Методика определения невидимых механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб была применена для испытания по показателю «Механические включения (невидимые)» биологических лекарственных препаратов белковой природы (7 наименований). Для проведения испытаний в сравнении со стандартным объемом аналитической пробы (5,0 мл) был выбран один малый объем аналитической пробы, равный 0,5 мл. Результаты приведены в таблице 5.

Сравнительные испытания по определению невидимых механических включений счетно-

фотометрическим методом стандартной методикой с объемом пробы 5,0 мл и методикой с использованием малого объема пробы 0,5 мл показали сопоставимые результаты для всех препаратов.

#### **Выводы**

1. Показана принципиальная возможность использования малых объемов аналитических проб при проведении испытаний счетно-фотометрическим методом по показателю «Невидимые механические включения» биологических парентеральных препаратов.
2. Оценено влияние объема шприца-пробоотборника на точность измерений количества частиц. Рекомендуется при проведении испытания по определению невидимых механических включений с использованием аналитических проб малых объемов (0,2–1,0 мл) применять шприц-пробоотборник объемом 1 мл.

**Таблица 5.** Результаты определения количества частиц в биологических лекарственных препаратах с использованием стандартного объема аналитической пробы (5,0 мл) и малого объема (0,5 мл)

**Table 5.** Number of particles in standard (5.0 mL) and small (0.5 mL) samples of biological products

Название <i>Name</i>	Объем пробы 5,0 мл <i>5.0 mL sample</i>		Объем пробы 0,5 мл <i>0.5 mL sample</i>	
	среднее количество частиц более <i>average number of particles larger than</i>		среднее количество частиц более <i>average number of particles larger than</i>	
	10 мкм <i>10 μm</i>	25 мкм <i>25 μm</i>	10 мкм <i>10 μm</i>	25 мкм <i>25 μm</i>
Иммуновенин <i>Immunovenin</i>	2198	124	2136	113
Плазбумин-20 <i>Plasbumin-20</i>	86	3	87	3
Козйт-ДВИ <i>Koate-DVI</i>	132	5	118	4
Интерферон бета-1b <i>Interferon beta-1b</i>	23	0,3	16	0,3
Хайгарда, 2000 МЕ <i>Haegarda, 2000 ME</i>	1255	65	1075	42
Хайгарда, 3000 МЕ <i>Haegarda, 2000 ME</i>	373	13	324	17
Тебериф <i>Teberif</i>	408	3	367	1

3. Оценено влияние объема преаналитической пробы на точность измерений. Данный объем должен составлять 0,1–0,4 мл.
4. Относительное стандартное отклонение результатов определения количества невидимых частиц, получаемых при использовании аналитических проб объемом от 0,2 до 5,0 мл, не превышает относительной погрешности результатов измерений счетчика частиц. Проведение измерений аналитической пробой объемом 0,1 мл нецелесообразно из-за невысокой точности результатов. Характеристики точности методики определения невидимых

механических включений счетно-фотометрическим методом с использованием малых объемов аналитических проб: правильность в сравнении со стандартным образцом счетной концентрации составила 96–100%. Относительное стандартное отклонение повторяемости – 0,8–1,8%. Коэффициенты корреляции линейной зависимости расчетного количества частиц от теоретического значения – более 0,999, вне зависимости от объема аналитической пробы. Установленные характеристики удовлетворяют принятым критериям приемлемости.

## Литература/References

1. Новик ЕС, Доренская АВ, Борисова НА, Гунар ОВ. Невидимые механические включения в инъекционных лекарственных препаратах белковой природы. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(4):50–7. [Novik ES, Dorenskaya AV, Borisova NA, Gunar OV. Subvible particulate matter in therapeutic analysis in therapeutic protein injections. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):50–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-4-50-57>
2. Guo S, Yu C, Guo X, Jia Z, Yu X, Yang Y, et al. Subvisible particle analysis of 17 monoclonal antibodies approved in China using flow imaging and light obscuration. *J Pharm Sci*. 2021;S0022–3549(21)00491–3. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.09.021>
3. Hawe A, Schaubhut F, Geidobler R, Wiggenghorn M, Friess W, Rast M, et al. Pharmaceutical feasibility of sub-visible particle analysis in parenterals with reduced volume light obscuration methods. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85(3 Pt B):1084–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.02.004>
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.; Практика; 1998 [Glantz S. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
5. Tanaka M, Girard G, Davis R, Peuto A, Bignell N. Recommended table for the density of water between 0 °C and 40 °C based on recent experimental reports. *Metrologia*. 2001;38(4):301. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/38/4/3>

**Вклад авторов.** **А.А. Воропаев** — идея, дизайн исследования, экспериментальная работа с набором суспензий стандартных латексных частиц, обобщение экспериментальных данных, написание текста; **О.В. Фадейкина** — концепция, уточнение дизайна исследований, экспериментальная работа со стандартным образцом счетной концентрации, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов, редактирование текста рукописи; **Д.С. Давыдов** — разработка дизайна исследования, консультативная помощь в анализе результатов, редактирование текста рукописи; анализ и интерпретация результатов; **А.А. Мовсесянц** — консультативная помощь в анализе результатов и окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** А.А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Authors' contributions.** **A.A. Voropaev**—elaboration of the study idea, concept, and design, experimental work with suspensions of standard latex particles, preparation of the summary of the experimental data; writing of the text; **O.V. Fadeikina**—elaboration of the study idea, refinement of the study design, experimental work with the particle count reference standard, analysis, interpretation, and statistical processing of the results, writing of the text; **D.S. Davydov**—elaboration of the study design, providing consultations on the analysis of the study results, editing of the text, analysis and interpretation of the results; **A.A. Movsesyants**—providing consultations on the analysis of the study results, approval of the final version of the paper for publication.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Conflict of interest.** A.A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

## Об авторах / Authors

**Воропаев Андрей Андреевич.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>  
[voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

**Фадейкина Ольга Васильевна,** канд. биол. наук.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8473-7442>  
[Fadeikina@expmed.ru](mailto:Fadeikina@expmed.ru)

**Давыдов Дмитрий Сергеевич,** канд. биол. наук.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>  
[Davidov@expmed.ru](mailto:Davidov@expmed.ru)

**Мовсесянц Арташес Авакович,** д-р мед. наук, проф.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>  
[Movsesyants@expmed.ru](mailto:Movsesyants@expmed.ru)

Поступила 03.11.2021

После доработки 11.01.2022

Принята к публикации 11.03.2022

**Andrey A. Voropaev.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>  
[voropaev@expmed.ru](mailto:voropaev@expmed.ru)

**Olga V. Fadeikina,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8473-7442>  
[Fadeikina@expmed.ru](mailto:Fadeikina@expmed.ru)

**Dmitry S. Davydov,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>  
[Davidov@expmed.ru](mailto:Davidov@expmed.ru)

**Artashes A. Movsesyants,** Dr. Sci. (Med.), Professor.  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>  
[Movsesyants@expmed.ru](mailto:Movsesyants@expmed.ru)

Received 3 November 2021

Revised 11 January 2022

Accepted 11 March 2022

## Равиль Авгатович Хамитов (к 65-летию со дня рождения)

## Ravil Avgatovich Khamitov (on the 65th Anniversary)



Равиль Авгатович Хамитов, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, родился 28 января 1957 года в г. Архангельске в семье военнослужащего.

В 1980 году с отличием окончил Военно-медицинскую академию им. С.М. Кирова по специальности «Лечебно-профилактическое дело» и был направлен для прохождения службы в «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации – «Вирусологический центр».

Равиль Авгатович занимал научные должности от младшего научного сотрудника до начальника научно-исследовательского управления. Военную службу закончил в 2008 году в звании полковника медицинской службы. В том же году окончил Российскую академию государственной службы при Президенте Российской Федерации по специальности «Государственное и муниципальное управление». Равиль Авгатович работал заместителем директора по стратегическому развитию в Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов, одновременно исполняя обязанности директора по науке в ООО «ФАРМАПАРК».

С 2014 года по настоящее время Р.А. Хамитов работает в АО «ГЕНЕРИУМ» (Владимирская обл., Петушинский район, п. Вольгинский) в должности вице-президента по исследованиям и разработкам.

В 1986 году Р.А. Хамитов защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата наук, в 1997 году – на соискание ученой степени доктора медицинских наук.

В настоящее время Р.А. Хамитов возглавляет большой коллектив ученых, выполняющих весь комплекс работ по созданию клеток-продуцентов терапевтических рекомбинантных белков, разработке лабораторных и опытно-промышленных технологий их производства, разработке и валидации аналитических методов, проведению доклинических и клинических исследований, регистрации лекарственных препаратов как в России, так и за рубежом. Под его научным руководством создаются лекарственные препараты для лечения основных нозологий, включающих орфанные, неврологические, офтальмологические, эндокринные и опухолевые заболевания.

Р.А. Хамитовым активно разрабатывается новая научная концепция повышения устойчивости и эффективности интенсивных технологий производства рекомбинантных белков путем оптимизации технологического пространства разработки процессов, обеспечивающих их успешное масштабирование и заданное качество терапевтических белков. В результате проведенных исследований удалось создать универсальную клеточную биотехнологическую платформу, которая необходима для производства целого спектра новых «сложных» рекомбинантных терапевтических белков. Внедрение в практику и производство данного класса

лекарственных препаратов позволяет достичь реального импортозамещения и тем самым повысить фармакологическую безопасность нашей страны. В кратчайшие сроки в АО «ГЕНЕРИУМ» была разработана промышленная технология производства вакцины Спутник V против новой коронавирусной инфекции и налажен ее выпуск, обеспечивающий потребности здравоохранения как для России, так и ряда других стран.

По результатам проведенных исследований под руководством Р.А. Хамитова были получены регистрационные удостоверения и на предприятии АО «ГЕНЕРИУМ» организован промышленный выпуск следующих лекарственных препаратов: Ревелиза® – фибринолитическое средство для лечения острого инфаркта миокарда, тромбоэмболии легочной артерии и острого ишемического инсульта; Глуразим® – препарат для ферментозаместительной терапии пациентов с болезнью Гоше первого типа; Элизария® – лекарственный препарат для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии и атипичного гемолитико-уремического синдрома; Тигераза® – рекомбинантная человеческая дезоксирибонуклеаза I для лечения больных муковисцидозом; Генолар® – препарат для лечения атопической бронхиальной астмы и хронической идиопатической крапивницы.

Р.А. Хамитовым лично и в соавторстве опубликовано более 230 научных работ, получено 19 патентов на изобретения Российской Федерации.

Под научным руководством Р.А. Хамитова подготовлены и успешно защищены 12 диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и 2 диссертации на соискание ученой степени доктора наук.

Равиль Авгатович – член коллегии экспертов Биомедицинского кластера инновационного Фонда «Сколково» с 2013 года; член Диссертационного совета Д 217.013.01 по молекулярной биологии при НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИгенетика»; член редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»; постоянный член Программного комитета Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»; аттестованный Росздравнадзором России эксперт в сфере обращения лекарственных средств по вопросам их соответствия установленным требованиям.

С 2015 по 2018 год Р.А. Хамитов входил в состав Рабочей группы экспертов Минобрнауки России по рассмотрению научных предложений в рамках мероприятий «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств» и «Разработка новых образовательных программ и образовательных модулей для профильных высших и средних специальных учебных заведений» Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

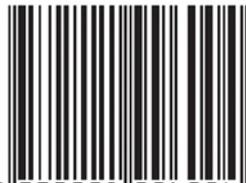
Р.А. Хамитов награжден орденом Почета за разработку новых средств медицинской защиты (2005), лауреат премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники (2012), заслуженный деятель науки Российской Федерации (2020). Минпромторгом России Р.А. Хамитову присвоено звание «Почетный химик» (2020).

Искренне поздравляем Рафиля Авгатовича с юбилеем! Желаем здоровья, творческих успехов, реализации намеченных планов и благополучия!





ISSN 2221-996X



9 772221 996004