

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume	№ / No.
23	2
2023	

ТЕМА НОМЕРА

**От традиционных биологических
к высокотехнологичным лекарственным
препаратам: вопросы разработки и применения**

www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

Инновационное направление в лечении жизнеугрожающих и социально-значимых заболеваний различной этиологии наряду с традиционными биологическими лекарственными препаратами (иммунобиологическими, биотехнологическими, пробиотиками, бактериофагами, а также полученными из плазмы крови) — это терапия высокотехнологичными лекарственными препаратами.

Перспективное направление в настоящее время в области иммунотерапии онкологических заболеваний — помимо таргетной терапии препаратами моноклональных антител (в том числе биспецифических) к антигенам, экспрессируемым на опухолевых клетках, и использования механизма блокирования иммунных контрольных точек (CTLA-4 и PD-1) — это применение препаратов на основе клеток человека, которые могут оказывать целенаправленное иммуноопосредованное действие на опухоли. К таким высокотехнологичным лекарственным препаратам для иммунотерапии относятся, например, генетически модифицированные Т-клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы к определенным поверхностным маркерам опухолевых клеток (CAR-T), а также дендритно-клеточные вакцины. В настоящее время в мире разрешены к медицинскому применению шесть

препаратов на основе химерных антигенных рецепторов, в Российской Федерации — только один (Kymriah®).

Внедрение в медицинскую практику генотерапевтических лекарственных препаратов, предназначенных для лечения тяжелых генетических заболеваний, это, как правило, сложный, продолжительный процесс. В России в 2022 г. получили государственную регистрацию два лекарственных препарата данной группы импортного производства на основе аденоассоциированных вирусных векторов.

Совершенствование процессов государственной регистрации, производства, методик контроля качества как традиционных, так и высокотехнологичных биологических лекарственных препаратов, их оценки в рамках проводимых доклинических и клинических исследований остается актуальной задачей, прежде всего с учетом особенности состава таких препаратов — наличия действующего вещества, произведенного или выделенного из биологических источников, обладающих широким диапазоном переменных свойств, характерных для живых систем.

Номер журнала посвящен рассмотрению некоторых нормативно-правовых норм государственной регистрации, разработке методик контроля качества, оптимизации условий производства, особенностей проведения доклинических и клинических исследований отдельных групп биологических лекарственных препаратов.

С уважением,
главный редактор

МЕРКУЛОВ Вадим Анатольевич

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

**ТОМ 23, № 2,
АПРЕЛЬ – ИЮНЬ 2023**

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

Учредитель:

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

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, включен в «Белый список» научных журналов. Журнал принимает статьи по следующим научным специальностям: биотехнология, молекулярная биология, вирусология, микробиология, аллергология и иммунология.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 1,182.

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

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

**VOLUME 23, NO. 2,
APRIL–JUNE 2023**

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

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)

The journal is included in the White list of Russian scientific journals and in the List of peer-reviewed scientific publications that the State Commission for Academic Degrees and Titles recommends for publishing the main scientific results of theses for Candidate of Science and Doctor of Science degrees. Articles submitted to the journal should cover the following fields of research: biotechnology, molecular biology, virology, microbiology, allergology and immunology.

The journal's two-year RISC impact factor is 1,182.

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

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

На обложке: «3D-изображение ДНК стволовой клетки» (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX114797800/>)

Cover image: 3D illustration of stem cell DNA, a licensed image from the Photogenica image bank (<https://photogenica.ru/zoom/PHX114797800/>)

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 «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)

Хаитов 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., академик 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., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, 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, ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, Россия)

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва, Россия)

Миронов 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)

Токарев Николай Константинович, д-р мед. наук, проф., ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (Санкт-Петербург, 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 и издатель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Шеф-редактор

Федотова Ольга Федоровна
+7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)

Fedotovaof@expmed.ru

Ответственный редактор

тематического выпуска

Меркулов Вадим Анатольевич,
д-р мед. наук, проф.

Научные редакторы

Гуасова Надежда Вадимовна,
канд. биол. наук

Лебединская Елена Владимировна,
канд. биол. наук

Редактор перевода

Балтина Любовь Александровна

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

Исполнитель

ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва,
ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография

ООО «Издательство «Триада»: 170034,
Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514

Тираж

150 экз. Цена свободная

Подписано в печать

23.06.2023

Дата выхода в свет

28.06.2023

Подписной индекс

в каталоге «Пресса России» – 57941,
в каталоге агентства «Урал-Пресс» –
57941

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

© Составление. Оформление.
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
2023

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера

**От традиционных биологических к высокотехнологичным ле-
карственным препаратам: вопросы разработки и применения**

Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов, О.В. Меркулова
**Генная терапия нейродегенеративных заболеваний:
достижения, разработки, проблемы внедрения
в клиническую практику127**

Т.Л. Нехаева, А.А. Камалетдинова, М.Ф. Лутфуллин,
Т.В. Табанская
**Современные подходы к оценке качества, проведению
доклинических и клинических исследований
дендритно-клеточных вакцин в онкологии148**

М.Ю. Дроков, Т.В. Гапонова, Т.Ю. Губенко, О.С. Караваева,
М.А. Теляшов, А.С. Антимонов, В.В. Зубков, Е.Н. Паровичникова
**Организационно-методические проблемы
производства CAR-T в Российской Федерации162**

В.В. Смирнов, О.А. Петухова, А.В. Филатов, Д.А. Кудлай,
М.Р. Хаитов
**Исследование фармакокинетики биотехнологических
препаратов на примере моноклональных антител173**

Д.С. Давыдов, Р.Л. Парфенюк, З.В. Дурманова, В.А. Меркулов,
А.А. Мовсесянц
**Особенности государственной регистрации и обеспечения
качества лекарственных препаратов бактериофагов
в Российской Федерации181**

А.С. Минеро, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова
**Обзор методов определения соединений углеводной
природы в биологических лекарственных препаратах194**

Е.В. Зубарева, М.Б. Дегтерев, М.Ю. Неронова, М.А. Смолов,
Р.Р. Шукуров
**Разработка и валидация методики пептидного картирования
инновационного препарата ингибитора С1 эстеразы203**

И.А. Корнаков, З.Р. Хасаншина, Д.А. Сеничкина, А.А. Филипенко,
И.С. Лунев, Р.В. Драй
**Оптимизация условий индукции синтеза проинсулина
аспарт в клетках бактериального штамма-продуцента219**

И.В. Касина, С.А. Алексеева, Т.И. Немировская
**Оценка возможности применения иммунохроматографического
метода для экспертизы качества вакцины чумной живой
и аллергена туляремиального (Тулярина) по показателю
«Подлинность»231**

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., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

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

Executive Secretary

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., Academician 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., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, 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. (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)

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 and publisher

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

Guest editor for the special issue

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof.

Science Editor

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

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

Translation Editor

Liubov A. Baltina

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

Contract publisher

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

Printing office

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

Print run

150 copies. Free price

Passed for printing

23 June 2023

Date of publication

28 June 2023

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941

Ural-Press agency catalogue: 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, 2023

CONTENTS

Issue topic

**From traditional biologicals to advanced therapy medicinal
products: development and application issues**

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

**Gene therapy of neurodegenerative diseases: achievements,
developments, and clinical implementation challenges** 127

T.L. Nekhaeva, A.A. Kamaletdinova, M.F. Lutfullin,
T.V. Tabanskaya

**Current approaches to quality assessment,
non-clinical and clinical studies of dendritic cell vaccines
in oncology** 148

M.Y. Drovkov, T.V. Gaponova, T.Y. Gubenko, O.S. Karavaeva,
M.A. Telyashov, A.S. Antimonov, V.V. Zubkov, E.N. Parovichnikova

**Organisational and methodological challenges of CAR-T
manufacturing in the Russian Federation** 162

V.V. Smirnov, O.A. Petukhova, A.V. Filatov, D.A. Kudlay,
M.R. Khaitov

**Studying the pharmacokinetics of biotechnological medicinal
products on the example of monoclonal antibodies** 173

D.S. Davydov, R.L. Parfenyuk, Z.V. Durmanova, V.A. Merkulov,
A.A. Movsesyants

**Characteristic aspects of marketing authorisation and quality
assurance of bacteriophage medicinal products in the Russian
Federation** 181

A.S. Minero, O.B. Rounova, O.B. Ustinnikova

**Quantification methods for carbohydrate compounds
in biologicals: a review** 194

E.V. Zubareva, M.B. Degterev, M.Yu. Neronova, M.A. Smolov,
R.R. Shukurov

**Development and validation of a peptide-mapping procedure
for a novel C1 esterase inhibitor** 203

I.A. Kornakov, Z.R. Khasanshina, D.A. Senichkina, A.A. Filipenko,
I.S. Lunev, R.V. Drai

**Optimisation of induction conditions for a bacterial strain
producing proinsulin aspart** 219

I.V. Kasina, S.A. Alekseeva, T.I. Nemirovskaya

**Evaluation of the applicability of immunochromatography
to the identification of live plague vaccines and the tularaemia
allergen (Tularin)** 231



Генная терапия нейродегенеративных заболеваний: достижения, разработки, проблемы внедрения в клиническую практику

Е.В. Мельникова^{1,✉}, В.А. Меркулов^{1,2}, О.В. Меркулова¹

¹ 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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Мельникова Екатерина Валерьевна; melnikovaev@expmed.ru

Резюме

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) являются одними из перспективных объектов для разработки препаратов генной терапии, в первую очередь ввиду возможной причины их возникновения (нарушение работы гена или генов), отсутствия эффективной терапии, негативного влияния на качество жизни как самого пациента, так и его окружения.

Цель работы — анализ направлений и проблем разработки, проведения доклинических и клинических исследований препаратов генной терапии для лечения нейродегенеративных заболеваний, а также изучение зарубежного опыта экспертной оценки регистрационного досье препарата Zolgensma®, получившего условную государственную регистрацию. Анализ проводимых исследований продуктов генной терапии в области НДЗ показал, что основными проблемами являются: в исследованиях на животных — выбор модели заболевания, способа введения, подбор мишени для эффективной генной терапии при заболеваниях, затрагивающих работу нескольких генов; на этапе клинических исследований (КИ) — выбор группы сравнения, разработка критериев отбора пациентов для участия в КИ с учетом наличия генетической мутации, которая является показанием к проведению генной терапии, исключения из КИ пациентов при наличии у них антител к продукту генной терапии, выбор и обоснование безопасной терапевтической дозы вследствие единственного шанса у пациента на введение препарата генной терапии, сложность оценки клинической пользы по экспрессии трансгена в организме у человека вследствие недоступности тканей мозга для анализа. Прорывом последних лет является вывод на мировой фармацевтический рынок препарата генной терапии Zolgensma® (Novartis) для лечения детей со спинальной мышечной атрофией 1 типа. В статье проанализирован опыт экспертной оценки регистрационного досье препарата Zolgensma®, который может быть использован разработчиками в ходе вывода на рынок Евразийского экономического союза лекарственных препаратов по механизму условной регистрации, подразумевающей, что польза от немедленного доступа пациентов к препаратам будет превышать риски, связанные с неполными данными об их характеристиках.

Ключевые слова: генная терапия; нейродегенеративные заболевания; спинальная мышечная атрофия; аденоассоциированный вирус; Zolgensma®; качество; доклинические исследования; клинические исследования

Для цитирования: Мельникова Е.В., Меркулов В.А., Меркулова О.В. Генная терапия нейродегенеративных заболеваний: достижения, разработки, проблемы внедрения в клиническую практику. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):127–147. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-433>

Gene therapy of neurodegenerative diseases: achievements, developments, and clinical implementation challenges

E.V. Melnikova^{1,✉}, V.A. Merkulov^{1,2}, O.V. Merkulova¹

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

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

✉ Ekaterina V. Melnikova; melnikovaev@expmed.ru

Abstract

Neurodegenerative diseases (NDDs) are promising objects for the development of gene therapy products, primarily, due to the possible cause of these diseases (disruption of a gene or several genes), lack of effective therapy, and negative impact on the quality of life of both patients and their families and friends.

The aim of the study was to identify trends and challenges in the development and preclinical and clinical studies of gene therapy products for NDDs and to analyse the international experience of expert assessment of the dossier for Zolgensma®, which received a conditional marketing authorisation.

According to the analysis of the ongoing studies of gene therapy products for NDDs, the following major challenges arise at preclinical and clinical stages. For animal studies, a particular challenge is to select a disease model, a route of administration, and a target for effective gene therapy for polygenic disorders. For clinical trials, problematic aspects are the selection of a control group, the development of inclusion criteria for patients with a genetic variant that is an indication for a gene therapy product and exclusion criteria for patients with antibodies to this gene therapy product, the selection and justification of a safe therapeutic dose since a gene therapy product can be administered to a patient only once, and the complexity of assessing clinical benefits of transgene expression in the human body due to the inaccessibility of brain tissue for analysis. Recent years have witnessed a breakthrough in gene therapy with the introduction of Zolgensma® (Novartis) to the world pharmaceutical market to treat children with spinal muscular atrophy type 1. The article analyses the experience of expert assessment of the marketing authorisation dossier for Zolgensma®, which can be used by drug developers bringing new medicines to the market of the Eurasian Economic Union under conditional marketing authorisation, which implies that the benefits of immediate patient access to these medicines will exceed the risks associated with incomplete data on their characteristics.

Key words: gene therapy; neurodegenerative diseases; spinal muscular atrophy; adeno-associated viruses; Zolgensma®; quality; preclinical studies; clinical studies

For citation: Melnikova E.V., Merkulov V.A., Merkulova O.V. Gene therapy of neurodegenerative diseases: achievements, developments, and clinical implementation challenges. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):127–147. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-433>

Введение

Современный уровень развития генетических технологий, а также изученные механизмы возникновения, патогенеза и течения многих тяжелых жизнеугрожающих заболеваний, для лечения которых отсутствуют лекарственные препараты (ЛП) или методы лечения, в настоящее время позволяют вести разработку и создание инновационных препаратов генной терапии (ГТ) [1, 2].

Кроме того, в последнее время генетические технологии находятся под пристальным вниманием со стороны Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), органов государственной власти и экспертных организаций многих стран мира, в том числе и в России. Так, в соответствии с указом Президента Российской Федерации от 28.11.2018 № 680 «О развитии генетических технологий в Российской Федерации»¹ в апреле 2019 г. Правительством Российской Федерации была утверждена Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на период 2019–2027 гг., в соответствии с которой к 2027 г. планируется создать и изучить в доклинических исследованиях 20 генотерапевтических ЛП².

Одним из направлений создания препаратов ГТ, позволяющих проводить коррекцию экспрессии генов, ответственных за развитие заболеваний, являются нейродегенеративные заболевания (НДЗ), включающие врожденные генетические и возраст-зависимые заболевания, для которых характерна медленно прогрессирующая гибель определенных групп нервных клеток, приводящая к дегенерации структуры и функций центральной или периферической нервной системы [3, 4]. НДЗ характеризуются процессом необратимой гибели нейронов в определенных структурах центральной (ЦНС) или периферической нервной системы и сопровождаются прогрессирующими неврологическими нарушениями, включая двигательные (например, при спинальной мышечной атрофии (СМА), латеральном амиотрофическом склерозе (ЛАС), болезни Хантингтона (БХ), болезни Паркинсона (БП), рассеянном склерозе (РС) и спиноцереbellарной атаксии), а также когнитивными расстройствами вплоть до развития деменции (болезнь Альцгеймера (БА), со-

судистая деменция, лобно-височная деменция, деменция с тельцами Леви и др.) [5].

За последние несколько десятилетий достаточно широко изучались патогенетические механизмы НДЗ, включая идентификацию новых терапевтических мишеней. НДЗ затрагивают различные структуры ЦНС и разные типы нервных клеток. Необратимой дегенерации подвергаются холинергические нейроны спинного мозга и ствола головного мозга при ЛАС и СМА, дофаминергические нейроны черного вещества (substantia nigra) при БП, ГАМК-ергические нейроны базальных ганглиев при БХ, гиппокампальные нейроны головного мозга при БА. Сохранение функций нейронов, вовлеченных в патологический процесс, и восстановление утраченных межклеточных связей в нервной ткани могут существенно повысить качество и продолжительность жизни пациентов [1].

Локализация поражений при НДЗ (преимущественно ЦНС и спинной мозг) создает сложность для действия большинства традиционных терапевтических агентов, которые не могут преодолеть гематоэнцефалический барьер, что подтверждает актуальность разработки генотерапевтических ЛП для терапии НДЗ на основе вирусных векторов, способных доставить в места поражения трансгены, экспрессирующие терапевтические белки, антитела, последовательности для редактирования генов, микроРНК и малые интерферирующие РНК (siRNA) [6–8].

В настоящее время только один препарат ГТ НДЗ разрешен к применению в мире – Zolgensma® (onasemnogene abeparvovec), производства компании Novartis, который предназначен для лечения СМА 1 типа у детей в возрасте младше двух лет с биаллельной мутацией гена выживаемости моторных нейронов 1 (*SMN1*) путем однократного внутривенного введения функциональной копии гена *SMN* человека, что обеспечивает устойчивый синтез белка *SMN* и последующую остановку прогрессирования заболевания.

Препарат Zolgensma® имеет государственную регистрацию в США (2019, в рамках ускоренной процедуры оценки)³, условную регистрацию в Европейском союзе (2020, в рамках ускоренной процедуры оценки механизма приоритетной медицины PRIME (PRiority MEdicines))⁴,

¹ Указ Президента Российской Федерации от 28.11.2018 № 680 «О развитии генетических технологий в Российской Федерации».

² Постановление Правительства Российской Федерации от 22.04.2019 № 479 «Об утверждении научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы».

³ Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>

⁴ Zolgensma. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zolgensma>

Японии (2020, в рамках ускоренной процедуры оценки механизма SAKIGAKE) и России (2021)⁵.

Цель работы — анализ направлений и проблем разработки, проведения доклинических и клинических исследований препаратов ГТ для лечения НДЗ, а также изучение зарубежного опыта экспертной оценки регистрационного досье препарата Zolgensma®, получившего условную государственную регистрацию.

Механизм условной регистрации ЛП является новым для Российской Федерации, он стал доступен с марта 2022 г. в рамках нормативно-правовой базы ЕАЭС⁶.

Вирусные векторы для генной терапии нейродегенеративных заболеваний

Перспективность разрабатываемых препаратов ГТ основана на двух факторах: способности воздействовать на этиологию заболевания и степени достижения постоянного эффекта. Однократное введение препарата с продолжительным эффектом особенно привлекательно при заболеваниях, поражающих ЦНС, потому что, в отличие от других органов, где эффективные терапевтические концентрации препарата могут быть достигнуты при многократном введении, большинство периферически вводимых агентов не могут преодолеть гематоэнцефалический барьер или, преодолев его, обладают слабым эффектом [9].

Безопасная, эффективная и селективная доставка препаратов ГТ в ЦНС остается проблемой. Хотя стратегии невирусной доставки, основанные на применении наночастиц и рибонуклеопротеиновых комплексов, изучаются до сих пор, их применимость к доставке терапевтических агентов в ЦНС остается неопределенной ввиду возможной цитотоксичности, неспецифического связывания и быстрой элиминации из организма [10].

Использование в качестве вирусного вектора для доставки целевых генов в ЦНС лентивируса сопряжено с повышенным риском инсерционного мутагенеза и генотоксичностью; аденовирусные векторы для ГТ НДЗ реже используются в связи с недостаточно продолжительной экспрессией трансгена для сохранения терапевтического

эффекта, повышенной вероятностью возникновения иммунного ответа у человека, необходимостью наличия специфических клеточных рецепторов и в большинстве случаев требуемого повторного введения препарата ГТ [6, 10].

В нейробиологии одними из наиболее перспективных векторов для доставки целевых генов являются рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (ААВ) благодаря своим непатогенным свойствам, низкой иммуногенности, тропности к большинству клеток и тканей, высокой эффективности трансдукции и продолжительной экспрессии [11]. Основной их недостаток — небольшая емкость вектора (до 5 тыс. пар оснований). В отличие от митотически активных клеток, в которых введенные ААВ постепенно элиминируются, так как не могут эффективно интегрироваться в геном клеток хозяина, экспрессия ААВ может сохраняться в течение десятилетий в постмитотических клетках, таких как нейроны [12].

Для повышения тропности ААВ к различным тканям и клеткам ЦНС, включая олигодендроциты, астроциты и нейроны, в целях изучения в доклинических исследованиях (ДКИ) на различных видах животных препаратов ГТ, разрабатываются различные ААВ-капсиды. Оптимизированные ААВ демонстрируют повышение экспрессии трансгена и терапевтической безопасности при изучении на экспериментальных моделях таких НДЗ, как БА, БХ, БП [13–20].

Для лечения СМА в настоящее время используется, например, вектор ААВ-9, обладающий тропизмом к клеткам печени, легких, скелетных мышц, ЦНС, сердца и поджелудочной железы. Данная терапия в настоящее время считается относительно безопасной⁷.

Разработка и контроль качества препаратов для генной терапии нейродегенеративных заболеваний

Общие принципы контроля качества для производства, тестирования и выпуска продуктов ГТ для лечения НДЗ, а также проведения доклинических и клинических исследований преимущественно такие же, как и для других продуктов

⁵ Государственный реестр лекарственных средств. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=57a4c3e1-4577-4435-b3b0-5dfbfc3ff2ec&t=

⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 17.03.2022 № 36 «О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01431480/err_18032022_36

⁷ Assessment report, Zolgensma (EMA/200482/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf
Summary Basis for Regulatory Action. Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

ГТ⁸. Что касается качества, то особое внимание должно быть уделено критическим показателям (главным образом, активности, подлинности, чистоте, количественному содержанию), критериям их приемлемости, вариабельности характеристик получаемых партий препаратов, сопоставимости качества получаемых продуктов при внесении изменений в производственный процесс.

Кроме того, в настоящее время некоторыми регуляторными органами в мире предпринимаются попытки разработать отдельные требования для препаратов ГТ, предназначенных для лечения НДЗ. В частности, с начала 2021 г. на официальном сайте FDA представлен проект руководства по генной терапии НДЗ человека⁹. Согласно этому проекту руководства некоторые аспекты разработки препаратов ГТ НДЗ, такие как проблемы, связанные со способом введения и объемом вводимого продукта, устройством для доставки и размером исследуемой популяции пациентов, могут потребовать дополнительных исследований, а также корректировки программы контроля качества.

Как правило, критические показатели качества (КПК) исследуемого ЛП оцениваются на каждом этапе фармацевтической разработки, а данные о характеристиках нескольких партий ЛП сопоставляются с результатами клинического применения. Результаты ранних стадий клинических исследований (КИ) НДЗ на небольшом объеме исследуемой популяции, в дополнение к оценке безопасности, могут также служить предварительными доказательствами эффективности. Таким образом, КПК продукта и критические параметры производственного процесса (КПП) должны быть оценены и сопоставлены с результатами ранних стадий КИ. При разработке препаратов ГТ для лечения НДЗ также необходимо учитывать применение нерутинных способов введения (в некоторых случаях, в головной и спинной мозг) и небольшие объемы

вводимого препарата, что требует особого внимания к составу (рецептуре) готового препарата.

Стратегия определения активности ЛП ГТ для лечения НДЗ может основываться на матрице оценки нескольких характеристик препарата, учитывающих различные механизмы его действия¹⁰.

Доклинические исследования препаратов для генной терапии

Дизайн доклинических исследований. ДКИ, адаптированные к препарату ГТ, и КИ ранних стадий должны позволить спрогнозировать характеристику профиля отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения препарата для предполагаемой популяции пациентов. Общие цели программы ДКИ препарата ГТ включают¹¹:

- определение диапазона биологически активных доз;
- рекомендации по начальной клинической дозе, графику эскалации дозы и режиму дозирования;
- выбор пути/режима введения и установление его безопасности;
- установление критериев включения пациентов;
- определение потенциальной токсичности и физиологических параметров для мониторинга эффективности и безопасности конкретного исследуемого препарата в КИ.

Программа ДКИ препаратов ГТ для лечения НДЗ включает стандартные подходы и исследования препаратов ГТ на основе вирусных векторов с оценкой биораспределения, выведения вектора и экспрессируемого продукта, эффективности трансдукции и экспрессии целевого гена, токсикологические и другие исследования.

Модели для доклинических исследований нейродегенеративных заболеваний. В качестве модельных животных с НДЗ и для подтверждения концепции часто используются крысы

⁸ Cellular and Gene Therapy Guidances. FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/biologics-guidances/cellular-gene-therapy-guidances>

Human regulatory. Multidisciplinary: gene therapy. EMA. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/multidisciplinary/multidisciplinary-gene-therapy>

⁹ Human Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. Guidance for Industry. FDA; 2021. <https://www.fda.gov/media/144886/download>

¹⁰ Там же.

¹¹ 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

Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products (EMA/CHMP/GTWP/125459/2006). EMA; 2008. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-studies-required-first-clinical-use-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf

Preclinical Assessment of Investigational Cellular and Gene Therapy Products. Guidance for Industry. FDA; 2013. <https://www.fda.gov/media/87564/download>

или мыши (например, трансгенные или нокаутные модели). Однако из-за значимых анатомических различий в центральной и периферической нервной системах между грызунами и человеком применение животных с более крупным мозгом или позвоночником, таких как минипиги или нечеловекообразные приматы, может предоставить дополнительную информацию о безопасности и помочь в экстраполяции дозы для применения человеку. Включение более крупных животных позволяет также оценить способ введения, если используются хирургические процедуры и/или медицинские изделия.

Функциональные конечные точки для исследований, подтверждающих концепцию, на моделях НДЗ животных часто требуют нейрорепродуктивного тестирования для демонстрации их активности после введения исследуемого препарата ГТ, для чего требуется надлежащая подготовка персонала, соответствующие средства контроля и использование четко определенных систем (шкал) оценки.

Ранее для создания модели НДЗ на животных применялись различные химические соединения (стрептозотозин, скополамин, колхицины, тяжелые металлы и другие), однако такие модели не предполагали постепенного прогрессирования патологии после однократного введения [21]. Совершенствование молекулярно-биологических методов привело к созданию трансгенных животных с НДЗ: ряд линий трансгенных мышей (PDAPP, Tg2576, App23, JNLP3, ApoE и др.) был разработан специально для изучения БА — у них наблюдаются такие гистологические проявления, как появление сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубочков. Также существуют трансгенные модели БП и БХ на животных. Однако такие модели не идеальны: они дороги и не позволяют наблюдать постепенное развитие заболевания [22, 23].

Модели БА на мышах для исследования ГТ НДЗ основаны на экспрессии одного из дефектных генов человека, например генов предшественников β -амилоидного белка и пресенилина [24, 25]. У трансгенных мышей отложение аберрантного белка сопровождается дегенерацией нервных клеток головного мозга и нарушениями памяти, как у человека.

При БП у гомозиготных мышей, экспрессирующих дефектный ген α -синуклеина человека (A53T, аланин замещен на треонин в позиции 53), развиваются двигательные расстройства, приводящие к параличу скелетных мышц и, как следствие, к смертельному исходу [26].

При моделировании бокового амиотрофического склероза (БАС) чаще всего используются

трансгенные мыши G93A-SOD1, экспрессирующие мутантный ген белка супероксиддисмутазы 1 — SOD1 (G93A, глицин замещен на аланин в позиции 93), которые характеризуются прогрессирующей дегенерацией мотонейронов. Причины гибели нейронов при наиболее частой (спорадической) форме заболевания неизвестны, но часть случаев семейной формы заболевания обусловлена доминантными мутациями гена SOD1 (21q22.1-q22.2), кодирующего Cu/Zn-супероксиддисмутазу. Гомозиготные G93A-SOD1 мыши на фоне прогрессирования паралича скелетных мышц умирают в возрасте 4–5 месяцев. Линия мышей G93A-SOD1 широко используется в экспериментах по исследованию генотерапевтических конструкций для лечения БАС на основе AAB с системой редактирования генома CRISPR-Cas. Так, было показано, что при введении мышам G93A-SOD1 генотерапевтических конструкций на основе AAB с системой редактирования генома CRISPR-Cas, выключающих работу мутантного гена SOD1, увеличивается выживаемость двигательных нейронов спинного мозга и улучшается двигательная функция и продолжительность жизни мышей; замедляется прогрессирование заболевания у животных; наблюдается снижение скорости мышечной атрофии и снижение мышечной денервации, улучшение нервно-мышечной функции и уменьшение иммунореактивных включений SOD1 у мышей на терминальной стадии заболевания [27–29].

При БХ мутантный ген (HTT) белка хантингтина содержит увеличенное число повторов CAG-кодонов, и при экспрессии этого гена синтезируется белок, полиглутаминовый трек которого содержит более 40 остатков глутамина при нормальной длине в 20–25 остатков. В качестве модели заболевания используется линия трансгенных мышей R6/2, у которых мутированный ген HTT содержит более 150 повторов CAG кодонов и кодирует аберрантный белок с увеличенным полиглутаминовым треком [30]. В работе F.K. Ekmep с соавт. [31] показано, что введение трансгенным мышам HDR6/2 генотерапевтических конструкций на основе AAB-1 с системой редактирования генома CRISPR-Cas, выключающих работу гена HTT, приводит к снижению количества белка mHTT, увеличению продолжительности жизни животных и защите нейронов от гибели.

При СМА трансгенные мыши, экспрессирующие дефектный ген SMN1 и ген дикого типа SMN2, после рождения погибают через 4–6 сут. При этом у мышей нарушена двигательная активность и сосательный рефлекс, затруднено дыхание. Клинические и гистологические характеристики заболевания соответствуют СМА человека

3 типа. У мышей, экспрессирующих только дефектный ген *SMN1* (без трансгена *SMN2*), смерть наступает во внутриутробном периоде [32]. В ходе ДКИ показано, что интратекальная инъекция вектора AAV-9, кодирующего SMN, трансгенным мышам *SMN^{-/-}*, *hSMN2^{+/+}*, *SMNdelta7^{+/+}*, минипигам и нечеловекообразным приматам приводит к трансдукции 25–75% мотонейронов спинного мозга [33]. Билатеральная инъекция вектора AAV-9, кодирующего SMN, трансгенным мышам *SMNdelta7* в икроножную мышцу опосредует высокий уровень экспрессии гена и повышает выживаемость двигательных нейронов как в ЦНС, так и на периферии и увеличивает медианную продолжительность жизни [34].

Представленные данные свидетельствуют о том, что создание трансгенных животных (мышей), моделирующих НДЗ человека, не всегда позволяет провести полноценную доклиническую оценку препаратов ГТ из-за введенных в геном животных летальных мутаций.

Выбор способа введения препарата для генной терапии. Одним из важных моментов, который должен быть определен в ходе ДКИ препаратов ГТ, — это выбор способа введения, который обеспечивал бы достаточную концентрацию трансгена в органе-мишени (ЦНС, спинной мозг). Для ГТ НДЗ преимущественно рассматриваются следующие способы введения: прямые инъекции в пораженный участок, внутривенные, интратекальные, внутримышечные, внутривенные инъекции [33, 35–37]. Способность некоторых серотипов AAV транспортироваться в область, удаленную от мест инъекций, также может увеличить терапевтический эффект.

Локальная доставка терапевтических векторов для ГТ может осуществляться в определенные области паренхимы головного мозга посредством нейрохирургических стереотаксических инъекций низких доз препарата. Это особенно применимо к заболеваниям, затрагивающим определенные области мозга (например, БП и БХ), или к лизосомным болезням накопления, при которых терапевтический белок секретируется и может повторно захватываться другими клетками (перекрестная коррекция), что обеспечивает его диффузное распространение [38, 39]. Известны протоколы ДКИ *in vivo* с использованием интратекального введения, которые продемонстрировали эффективность и в последующем применены в КИ, например в случае препарата AAV9-CLN6 для лечения болезни Баттена¹².

Системная инъекция, теоретически самый простой и безопасный способ введения препаратов для ГТ, ограничивается неспособностью векторов на основе AAV проникать через ГЭБ, возможными проблемами, связанными с возникновением иммунного ответа, нецеловой экспрессией и техническими ограничениями (необходимо значительное количество вектора для введения) [40]. Поэтому большое внимание уделяется созданию векторов, обладающих способностью переносить гены в ЦНС после системной инъекции [41, 42]. Так, была продемонстрирована способность модифицированного AAV-9 преодолевать ГЭБ и трансдуцировать нейроны в ЦНС. Инъекция препарата новорожденным мышам приводила к высокому уровню трансдукции нейронов, тогда как инъекция взрослым мышам вызывала в основном трансдукцию астроцитов [42, 43].

Одним из способов улучшения доставки ЛП в мозг является подход, основанный на усилении конвекции при имплантации катетеров малого диаметра в мозг, что широко используется для точечной доставки ЛП к опухоли головного мозга с использованием небольших градиентов давления во время инъекции. Этот метод использовался у собак и приматов в ДКИ в основном при лечении опухолей головного мозга, но также и при БП; данный способ введения препарата ГТ потенциально может увеличить диффузию вектора после доставки [44, 45].

Доставка через цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) является безопасной альтернативой введению в паренхиму головного мозга; несколько исследований на нечеловекообразных приматах показали, что доставка AAV через ЦСЖ обеспечивает эффективную трансдукцию тканей в ЦНС [46].

Клинические исследования препаратов для генной терапии

Дизайн клинических исследований. При составлении программы КИ могут применяться разные подходы с учетом гетерогенности группы НДЗ: одни заболевания этой группы являются моногенными расстройствами с относительно хорошо охарактеризованным патогенезом и патофизиологией (например, СМА), а другие НДЗ имеют плохо изученную этиологию и/или изменчивую патофизиологию (например, спорадические БАС или БА)¹³. В первом случае для ускорения получения

¹² <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02725580>

¹³ Human Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. Draft Guidance for Industry; 2021. <https://www.fda.gov/media/144886/download>

результатов КИ могут применяться инновационные схемы, во втором случае – рандомизированные плацебо-контролируемые КИ, включая, при необходимости, перекрестные схемы, которые могут быть наиболее эффективным средством получения убедительных доказательств эффективности.

Для любого НДЗ, независимо от этиологии, патофизиологии и истории развития заболевания, разработчикам рекомендуется рассмотреть вопрос, могут ли являться информативными инновационные программы КИ (например, адаптивные, исследования с контролируемой дозой, с включением исторического контроля или другие). Например, целесообразно применить стратегию рандомизации в КИ для получения пациентами дополнительного препарата ГТ или плацебо среди пациентов, которые уже получают лечение препаратом с доказанной эффективностью при НДЗ, поскольку ни одному пациенту с НДЗ не должно быть отказано в эффективной терапии.

Испытания с использованием внешнего, исторического контроля для сравнения (а не параллельной группы сравнения) могут проводиться с использованием препарата ГТ, предназначенного для лечения редкого и серьезного НДЗ, для которого:

- существует неудовлетворенная медицинская потребность;
- включение параллельного контроля не является практичным или этичным;
- течение заболевания хорошо документировано, предсказуемо и может быть объективно измерено и проверено, например высокая и предсказуемая во времени смертность;
- исследуемая популяция и исторические контрольные показатели сопоставимы;
- ожидаемый эффект лечения препаратом ГТ очевиден и тесно связан во времени с традиционным лечением.

Однако даже при этих обстоятельствах исторический контроль может быть неадекватным (например, если важные прогностические ковариаты либо неизвестны, либо не были зарегистрированы в исторических записях).

Критерии включения пациентов. При разработке критериев включения пациентов в КИ препаратов ГТ, в том числе для лечения НДЗ, необходимо учитывать следующие аспекты.

- Подтверждение наличия генетической мутации, которая является показанием к проведению ГТ. Если генетический диагностический тест недоступен, может потребоваться разработка сопутствующей диагностики для надлежащего выбора субъектов для КИ.

- Исключение потенциальных участников КИ при наличии антител к препарату ГТ, что также может потребовать разработки средств диагностики для их обнаружения.

- Если возможно, первое исследование на людях должно быть начато на взрослой популяции пациентов, которые способны понимать риски и давать информированное согласие. При отсутствии предварительных данных о безопасности или эффективности для человека, производители, планирующие проведение исследований на детях, должны предоставить обоснование того, почему исследования для взрослых либо неэтичны, либо неосуществимы.

Выбор дозы и режима дозирования. Для КИ большинства препаратов ГТ на ранней стадии рекомендуется проводить исследования в диапазоне доз, однако в некоторых случаях исследуется одна доза, выбранная на основе данных ДКИ и данных литературы. Это допускается регуляторными органами, учитывая также, что препараты ГТ предназначены для лечения жизнеугрожающих редких заболеваний с ограниченным количеством пациентов, соответствующих критериям включения при проведении КИ. Выбор и обоснование безопасной терапевтической дозы препарата для ГТ имеют важное значение, поскольку у субъектов может быть только один шанс получить препарат ГТ, который, как правило, применяется однократно из-за риска возникновения иммунного ответа. Для мониторинга системных иммунных реакций исследователи должны проводить диагностику клеточных и гуморальных иммунных реакций как на вектор, так и на белок, кодируемый трансгеном, а чтобы свести к минимуму иммунные реакции до и после введения продукта, могут применяться иммунодепрессанты, такие как кортикостероиды.

Выбор начальной дозы и режима дозирования должен быть подкреплен данными ДКИ и/или имеющимися результатами клинического применения с указанием того, что начальная доза не только достаточно безопасна, но и обладает терапевтическим потенциалом, особенно если процедура введения препарата сопряжена со значительными рисками или если препарат будет вводиться детям.

Конечные точки клинических исследований. Конечные точки КИ должны позволять оценить потенциальную клиническую пользу; биомаркеры, в том числе и потенциальные суррогатные конечные точки, могут указывать на активность препарата ГТ. Что касается НДЗ, то необходимо отметить, что способность обнаруживать экспрессию трансгена у пациентов, участвующих в КИ, ограничена часто из-за отсутствия био-

маркеров и трудностей, связанных с доступностью тканей головного мозга.

Поскольку многие НДЗ являются редкими и сложными с ограниченным пониманием их патогенеза, идентификация и характеристика суррогатной или промежуточной конечной точки часто затруднительна. Использование суррогатной конечной точки может быть уместным, если препарат ГТ непосредственно нацелен на основное, хорошо понятное и документированное изменение в организме, например при моногенном НДЗ, связанном с дефектом/недостатком/отсутствием определенного гена, который доставляется в организм препаратом ГТ. Терапия таким препаратом может улучшать клиническое течение или излечивать заболевание. Кроме того, данные о ранее полученном опыте применения препарата у отдельных пациентов во время разработки препарата ГТ (не в рамках основных КИ) могут служить дополнительным подтверждением его клинической пользы.

В настоящее время в реестре КИ содержатся данные о проведенных КИ препаратов ГТ для лечения НДЗ только на основе ААВ различных серотипов¹⁴ [6]. В основном это КИ, показывающие безопасность применения препарата ГТ на основе ААВ при соответствующих способах введения на небольшом количестве пациентов, например с болезнью Паркинсона [47], Помпе [48], Альцгеймера [49], Баттена [50], мукополисахаридозом [51].

Аспекты разработки и регистрации препарата Zolgensma® в Европейском союзе и США

Первым и пока единственным препаратом ГТ для лечения НДЗ, разрешенным к применению в мире, первоначально в США, затем в ЕС (условное разрешение на продажу) и Японии, а с 2021 г. и в России, является Zolgensma® производства Novartis. Препарат Zolgensma® представляет собой ААВ вектор с делетированными генами *rep* и *cap*, ответственными за репликацию вируса, и содержащий последовательность гена выживаемости моторных нейронов *SMN1*.

СМА — это аутосомно-рецессивное генетическое заболевание с частотой около 1 на 10 000 новорожденных, из которых примерно 45–60% случаев приходится на СМА 1 типа. У пациентов с СМА отсутствует ген *SMN1*, что приводит к прогрессирующей потере мотор-

ных нейронов и вызывает мышечную слабость и смерть из-за дыхательной недостаточности. Тяжесть заболевания отрицательно коррелирует с количеством копий гена *SMN2*, при этом у большинства пациентов с СМА 1 типа имеется 2 копии гена. У пациентов с 3 копиями гена *SMN2* СМА 1 типа (никогда не сможет сидеть самостоятельно) развивается примерно в 15% случаев, а СМА 2 типа (никогда не сможет ходить) — у 55% пациентов, у 30% пациентов — СМА типа 3а (медленное прогрессирование мышечной слабости). СМА 1 типа является смертельным заболеванием, и без респираторной поддержки и искусственного питания большинство пациентов не достигают двухлетнего возраста. Таким образом, лечение направлено на продление выживаемости и улучшение двигательной функции.

В период процедуры регистрации FDA¹⁵ препарата Zolgensma® научных консультаций (scientific advice) не проводилось; европейским регуляторным органом были проведены 3 научные консультации в рамках помощи по протоколу (две в 2017 г. и одна в 2018 г.). Консультации в 2017 г. были посвящены вопросам КИ, в то время как в 2018 г. заявитель задал вопросы, связанные с качеством и доклинической разработкой¹⁶.

Поддержка в рамках протокола (protocol assistance) при регистрации препарата касалась следующих клинических аспектов:

- приемлемости дизайна контролируемого многоцентрового КИ фазы 3;
- планирования проведения многоцентрового открытого КИ фазы 2–3 при однократном внутривенном введении препарата, использования исторического контроля, выбранной популяции пациентов, размера выборки, первичных и вторичных конечных точек, а также подхода к статистическому анализу и дозе;
- сопоставимости исследуемых серий препаратов в КИ фазы 1 и 3 и возможности учета результатов КИ в заявке на регистрацию.

В 2018 г. вопросы консультаций касались аспектов качества препарата и проведения ДКИ:

- оценки сопоставимости серий препаратов, используемых в КИ фазы 1 и 3, при этом обсуждался перечень необходимых показателей качества и их критериев приемлемости, предлагаемый подход к производству и тестированию, программа исследования стабильности для активного вещества и готового продукта,

¹⁴ <https://www.clinicaltrials.gov/>

¹⁵ Summary Basis for Regulatory Action. Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

¹⁶ Assessment report, Zolgensma (EMA/200482/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

- срок годности, количественный анализ эффективности, план проведения квалификации, тестирование готового препарата при выпуске;
- дизайн ДКИ.

Качество

Программа обеспечения качества препарата Zolgensma® включала разработку перечня показателей качества и критериев их приемлемости для активной субстанции при оценке 20 после-

довательных партий. Спецификации на активную субстанцию и готовый препарат были разработаны на основе производственного и клинического опыта, а также стандартов Европейской фармакопеи. Ввиду получения условного разрешения на продажу препарата Zolgensma® (когда польза от быстрого доступа пациентам превышает риск неполных данных о разработке препарата) ЕМА были также установлены определенные обязательства для заявителя, касающиеся качества препарата (рис. 1)¹⁷.

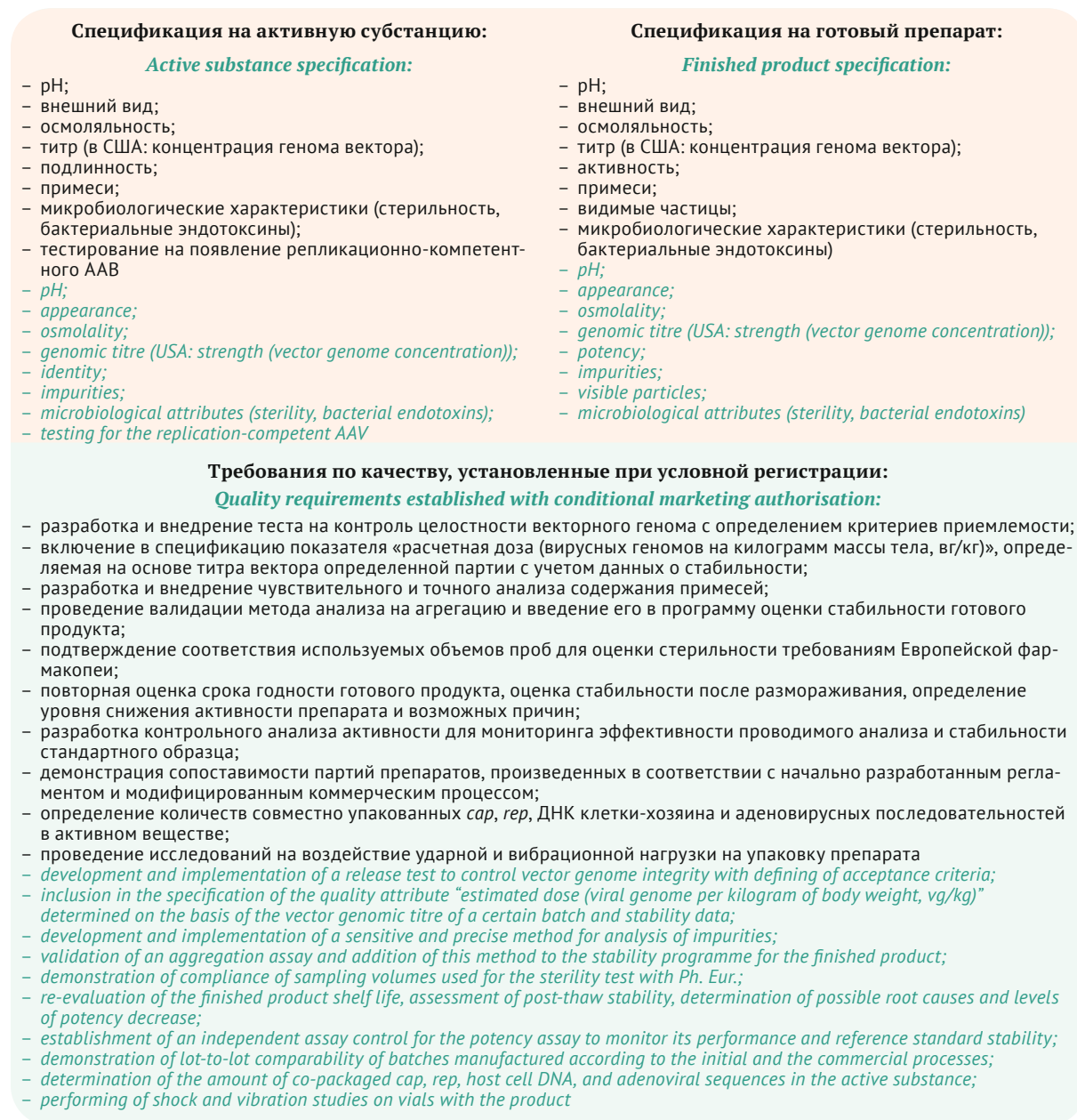


Рис. 1. Стратегия контроля качества препарата Zolgensma®¹⁸.

Fig. 1. Zolgensma® quality control strategy¹⁸.

¹⁷ Assessment report, Zolgensma. EMA/200482/2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

¹⁸ 5.2.3. Cell substrates for production of vaccines for human use. European Pharmacopoeia 10th ed; 2020.

Кроме того, при изучении вопроса наличия/отсутствия эндогенных ретровирусов в банках клеток, используемых для производства препарата, в связи с определением положительного сигнала при анализе на активность обратной транскриптазы PERT (product-enhanced reverse transcriptase) в клеточных линиях, регуляторный орган ЕС рекомендовал заявителю уточнить, проводилось ли определение инфицирующей способности в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи¹⁹. В ответ заявитель обосновал схему тестирования на наличие ретровируса и обязался провести анализ на инфицирующую способность для следующего главного банка клеток в случае положительного анализа PERT. По запросу заявитель также предоставил данные тестирования на вирусы клеток из текущих трех рабочих банков клеток (на максимальном уровне удвоения клеточной популяции), используемых для производства препарата.

Доклинические исследования

Заявка на маркетинговую авторизацию препарата Zolgensma® содержала сведения о проведенных ДКИ на мышах, минипигах и обезьянах *Cynomolgus*. В таблице 1 представлены основные результаты ДКИ, содержащиеся в заявке на регистрацию препарата Zolgensma®²⁰.

Результаты ДКИ показали, что фармакологические характеристики (биораспределение, эффективность экспрессии трансгена и др.) препарата Zolgensma® на модели заболевания СМА мышей обеспечивают принципиальное обоснование клинического использования препарата при внутривенном введении в предполагаемой популяции пациентов. Кроме того, фармакологические исследования на мышах и обезьянах *Cynomolgus* показали, что лечение должно быть начато как можно раньше: чем позже начинается лечение, тем больше повреждаются моторных нейронов, трансдукция AAV Zolgensma® которых является основным показателем, отвечающим за эффективное лечение. Терапевтическая доза Zolgensma® для КИ фазы 1 была установлена $1,1 \times 10^{14}$ вирусных геномов на килограмм массы тела (вг/кг).

Основным нежелательным явлением, выявленным в ходе токсикологических исследований на мышах, является дозозависимый (выше $1,5 \times 10^{14}$ вг/кг) тромбоз предсердий, который приводит к высокой смертности животных. Исследования безопасности были проведены при использовании препарата, который затем применили в КИ фазы 3.

В КИ не наблюдалось сердечно-сосудистой токсичности, связанной с препаратом, изготовленным в соответствии с технологией производства для коммерческих целей, что может указывать на межвидовые различия в способности к трансдукции вектором кардиомиоцитов между мышами и людьми, что подтверждалось представленным заявителем обзором доступных данных о биораспределении препарата в тканях человека и мыши. Также в ходе ДКИ наблюдалась гепатотоксичность при дозе $3,9 \times 10^{14}$ вг/кг²¹.

Клинические исследования

Программа КИ препарата Zolgensma® включала 9 исследований: 7 интервенционных и 2 наблюдательных. В регистрационном досье ЕМА были представлены результаты шести КИ. По состоянию на 31.12.2019 в рамках КИ препарат получили 133 пациента: 101 – внутривенно (98 из них в предложенной терапевтической дозе и 3 в более низкой дозе), и 32 пациентам препарат был введен интратекально²². В первом КИ фазы 1 (CL-101) исследовали препарат, произведенный по ранее разработанному процессу, а в КИ 3 фазы CL-303, CL-302 и CL-304 – препарат, произведенный по технологии производства для коммерческих целей²³.

Никаких специальных исследований фармакокинетики и фармакодинамики для Zolgensma® не проводилось. Это признано регуляторным органом ЕС приемлемым для продукта генной терапии. Биораспределение у людей в значительной степени основано на данных, полученных при изучении биораспределения у нечеловекообразных приматов и после изучения тканей умерших пациентов. Выделение вируса происходит главным образом с калом, и большая часть дозы выводится в течение 30 сут после введения. Ни у одного пациента исходные титры антител

¹⁹ 5.2.3. Cell substrates for production of vaccines for human use. European Pharmacopoeia 10th ed; 2020.

²⁰ Assessment report, Zolgensma (EMA/200482/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

Summary basis for regulatory action. Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

²¹ Assessment report, Zolgensma (EMA/200482/2020). EMA; 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf

²² Там же.

²³ Там же.

Таблица 1. Перечень основных результатов доклинических исследований препарата Zolgensma®
Table 1. List of the main results of Zolgensma® preclinical development

Показатель Attribute	Способ введения / препарат Method of administration / gene therapy product	Модель Model	Краткие результаты Brief results
Фармакологические исследования Pharmacology			
Биораспреде- ление Biodistribution	Внутривенно / AAV9.CB.GFP Intravenously / AAV9.CB.GFP	Мыши дикого типа линии C57BL/6 Wild-type C57BL/6 mice	Экспрессия GFP через 10 и 21 сут после инъекции была выявлена в сердце и скелетных мышцах, в ганглиях дорсальных корешков и нижних двигательных нейронах в спинном мозге. Экспрессия GFP сохранялась в течение 7 недель после введения исследуемого препарата, в головном мозге — до 21 сут GFP expression was detected in the heart and skeletal muscles, the ganglia of dorsal roots, and lower motor neurons in the spinal cord in 10 and 21 days after injection. GFP expression persisted for 7 weeks after investigational product administration, and up to day 21 in the brain
	Внутривенно / целевой препарат Intravenously / target product	Новорожденные мыши линии FVB Newborn FVB mice	При введении препарата в дозах $1,5 \times 10^{14}$, $2,4 \times 10^{14}$ или $3,0 \times 10^{14}$ вг/кг экспрессию трансгена детектировали через 3, 6 и 12 недель после введения, в том числе в головном и спинном мозге, что указывало на способность вектора пре- одолевать гематоэнцефалический барьер при системном введении. Самые высокие уровни экспрессии трансгена были обнаружены в сердце, печени, легких и скелетных мышцах Transgene expression was detected in 3, 6, and 12 weeks after administration at doses of 1.5×10^{14} , 2.4×10^{14} , or 3.0×10^{14} vg/kg, including in the brain and spinal cord, which indicated the ability of the vector to cross the blood-brain barrier after systemic administration. The highest levels of transgene expression were found in the heart, liver, lungs, and skeletal muscles
	Интрастекально; интрацеребрально / AAV9.CB.GFP Intrathecaly; intracranially / AAV9.CB.GFP	Здоровые минипиги Healthy minipigs	Через 21–24 сут после инъекции препарата в дозе $5,2 \times 10^{12}$ вг/кг экспрессия GFP была выявлена в ганглиях дор- сальных корешков, сером и белом веществе спинного мозга животных. Наблюдалась значительная трансдукция двигательных нейронов, а также больших нейронов вентрального рога. В головном мозге высокие уровни экспрес- сии были обнаружены в клетках Пуркинье мозжечка, нервных волокнах продолговатого мозга, а также в отдельных ядрах. Отсутствие экспрессии GFP в периферических тканях подтверждало селективность трансдукции клеток ЦНС и возможность интрацеребрального введения GFP expression was detected in the ganglia of dorsal roots and grey and white matter of the spinal cord of animals in 21–24 days after injection at a dose of 5.2×10^{12} vg/kg. There was a significant transduction of motor neurons, as well as large neurons of the ventral horn. In the brain, high levels of expression were found in the Purkinje cells of the cerebellum, nerve fibers of the medulla oblongata, as well as in individual nuclei. The absence of GFP expression in peripheral tissues confirmed the selectivity of CNS cell transduction and the possibility of intracranial administration
	Внутривенно; в желудочки головного мозга / AAV9.CB.GFP Intravenously; intraventrically / AAV9.CB.GFP	Нечеловеко- образные прима- ты (Cynomolgus) Non-human primates (Cynomolgus)	Внутривенная инъекция приводила к экспрессии трансгена в скелетных мышцах и органах, включая семенники, сердце, селезенку и тонкий кишечник. Экспрессия трансгена в тканях сердца была значительно ниже, чем у мышей. Инъекции исследуемым препаратом осуществляли в первый день, на 30 сут (соответствует возрасту 3 месяцев человека) и на 90 сут (соответствует возрасту 1 года человека) после рождения. Было показано, что введение пре- парата даже на 30 или 90 сут все еще приводит к высокому уровню трансдукции двигательных нейронов, предска- зывающей клиническую эффективность, что считается важным результатом, поскольку лечение препаратом детей может проводиться в возрасте до 1,5 лет в зависимости от массы тела пациентов Intravenous injection resulted in transgene expression in skeletal muscles and organs, including the testes, heart, spleen, and small intestine. The expression of the transgene in the heart tissues of primates was significantly lower than that in mice. Injections were carried out on days 1, 30 (corresponding to the human age of 3 months), and 90 (corresponding to the human age of 1 year) after birth. Even when administered on day 30 or 90, the product still led to a high level of motor neuron transduction predicting clinical efficacy. It is an important result, since the product can be used to treat children up to 1.5 years old, depending on their body weight

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Показатель Attribute	Способ введения / препарат Method of administration / gene therapy product	Модель Model	Краткие результаты Brief results
Специфическая активность Potency	Интракельно / целевой препарат Intrathecaly / target product	Минипиги с моделью СМА Minipigs with SMA	Животным на 6 сут после рождения (предсимптомно) либо на 33–36 сут после рождения (симптоматически) вводили препарат Zolgensma®. Методами иммуногистохимии клеток спинного мозга выявлен тропизм вектора AAV9 к двигательным нейронам, при этом глиальные клетки трансдуцировались в редких случаях. При предсимптомном лечении заболевание СМА было полностью предотвращено (доза 8×10^{12} вг/кг). После симптоматического лечения наблюдалось частичное улучшение состояния (доза $2-3,8 \times 10^{13}$ вг/кг). Данное исследование показывает, что раннее применение препарата имеет решающее значение для оптимальной эффективности <i>Animals were injected with Zolgensma® on day 6 after birth (pre-symptomatic treatment) or on days 33–36 after birth (symptomatic treatment). Immunohistochemical analysis of spinal cord cells revealed AAV9 tropism for motor neurons, while glial cell transduction was rare. Pre-symptomatic SMA treatment (8×10^{12} vg/kg) completely prevented the disease, and symptomatic SMA treatment ($2-3,8 \times 10^{13}$ vg/kg) partially improved the condition. This study shows that early use of the product is crucial for optimal efficacy</i>
	Внутривенно / целевой препарат Intravenously / target product	Нокаутные мыши SMNdelta7 SMNdelta7 knock-out mice	Введение препарата в дозе $6,7 \times 10^{13}$ вг/кг (исследовательские серии для КИ I фазы) увеличивало время выживания мышей с СМА с 15 до 35 сут, в то время как введение препарата в дозе $3,3 \times 10^{14}$ вг/кг увеличивало выживаемость более чем до 250 сут (по сравнению со средней выживаемостью 15,5 сут у контрольных животных). Эффективность коммерческой серии препарата Zolgensma® была определена относительно данных КИ I фазы (исследовательская серия препарата), которые показали сопоставимое время выживания в зависимости от введенной дозы: доза $1,2 \times 10^{13}$ вг/кг Zolgensma® привела к увеличению времени выживания мышей с СМА с ~2 недель (14–17 сут) до ~3 недель (20–25 сут), введение препарата в дозе $7,4 \times 10^{13}$ вг/кг увеличивало время выживания до ~4 недель (28–34 сут). Была продемонстрирована эффективность исследовательской (для КИ I фазы) и коммерческой серий препарата (для КИ 3 фазы) <i>Doses of $6,7 \times 10^{13}$ vg/kg (clinical batches for phase I CTs) increased the survival time of SMA mice from 15 to 35 days, while doses of $3,3 \times 10^{14}$ vg/kg increased it to more than 250 days (compared with an average survival of 15.5 days in control animals). The efficacy of the commercial batch of Zolgensma® was determined relative to the phase I CT data (clinical batch), which showed comparable survival times depending on the administered dose: a dose of $1,2 \times 10^{13}$ vg/kg of Zolgensma® increased the survival time of SMA mice from ~2 weeks (14–17 days) to ~3 weeks (20–25 days), while a dose of $7,4 \times 10^{13}$ vg/kg increased the survival time to ~4 weeks (28–34 days). The efficacy of the clinical (CT phase I) and commercial (CT phase III) batches was demonstrated</i>
Доза Dose	Внутривенно; в желудочки головного мозга / целевой препарат Intravenously; intraventrically / target product	Нокаутные мыши SMNdelta7 SMNdelta7 knock-out mice	Однократное введение целевого препарата в дозах от $1,2 \times 10^{13}$ до $1,1 \times 10^{14}$ вг/кг у новорожденных мышей приводило к дозозависимому увеличению выживаемости, улучшению двигательной функции и передачи нервно-мышечного импульса, увеличению массы тела и улучшению сердечной функции. Увеличение выживаемости и массы тела было характерно для мышей, получавших дозу на 1 или 2 сут после рождения <i>A single administration of the target product to newborn mice in a dose ranging from $1,2 \times 10^{13}$ to $1,1 \times 10^{14}$ vg/kg led to a dose-dependent increase in survival and body weight and improvement in cardiac and motor functions and neuromuscular transmission. The increase in survival and body weight was characteristic of mice receiving their dose on day 1 or 2 after birth</i>
Интракельно/ целевой препарат Intrathecaly / target product		Минипиги с СМА Minipigs with SMA	В модели СМА у минипигов использовали только одну дозу Zolgensma® (предсимптомно — доза 8×10^{12} вг/кг, при симптоматическом лечении — доза $2-3,8 \times 10^{13}$ вг/кг), поэтому в данной модели не было установлено никакой зависимости доза–ответ <i>Only one dose of Zolgensma® was used in the minipig SMA model (pre-symptomatic treatment with a dose of 8×10^{12} vg/kg and symptomatic treatment with a dose of $2-3,8 \times 10^{13}$ vg/kg); therefore, no dose-response relationship was established in this model</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Показатель <i>Attribute</i>	Способ введения / препарат <i>Method of administration / gene therapy product</i>	Модель <i>Model</i>	Краткие результаты <i>Brief results</i>
Эффективность трансдукции, эффективность экспрессии трансгена <i>Efficiency of transduction, efficiency of transgene expression</i>	Внутривенно / AAV9.CB.GFP <i>Intravenously / AAV9.CB.GFP</i>	Нокаутные мыши SMNdelta7 и нечело- векообразные при- маты (<i>Cynomolgus</i>) с SMA1 <i>SMNdelta7 knock-out mice and non-human primates (Cynomolgus) with SMA1</i>	Обезьянам <i>Cynomolgus</i> вводили исследуемый препарат в дозе 1×10^{13} вг/кг (что соответствует 2×10^{13} вг/обезьяна) в позе Тренделенбурга либо в обычном положении. Максимальная эффективность трансдукции достигалась, когда животных удерживали в позе Тренделенбурга в течение 10 мин после инъекции. Уровень экспрессии GFP составил 55, 62 и 80% в шейном, грудном и поясничном отделах спинного мозга соответственно. У мышей при введении дозы $3,3 \times 10^{13}$ вг/кг экспрессия GFP составила 46, 47 и 72% в шейном, грудном и поясничном отделах спинного мозга соответственно. Результаты исследований показали, что при более низкой дозе у обезьян <i>Cynomolgus</i> достигается бо́льшая эффективность трансдукции по сравнению с мышами <i>Cynomolgus monkeys were injected with the investigational product at a dose of 1×10^{13} vg/kg (corresponding to 2×10^{13} vg/monkey) in the Trendelenburg position or in the usual position. The maximum transduction efficiency was achieved when the animals were held in the Trendelenburg position for 10 minutes after injection. GFP expression was 55, 62, and 80% in the cervical, thoracic, and lumbar regions, respectively. In mice, a dose of $3,3 \times 10^{13}$ vg/kg resulted in GFP expression of 46, 47 and 72% in the cervical, thoracic and lumbar regions, respectively. The results of the studies showed that at a lower dose, Cynomolgus monkeys achieved higher transduction efficiency compared to that in mice</i>
Токсикологические исследования <i>Toxicology</i>			
Токсичность при однократном введении <i>Single-dose toxicity</i>	Внутривенно / целевой препарат <i>Intravenously / target product</i>	Новорожденные мыши FVB <i>Newborn FVB mice</i>	Дегенерация миокарда наблюдалась при введенной дозе препарата $7,9 \times 10^{13}$ вг/кг и выше. При дозе $1,5 \times 10^{14}$ вг/кг и выше наблюдалось дозозависимое увеличение частоты и тяжести неблагоприятных сердечных проявлений различной степени (тромбоз предсердий, увеличение предсердий, фиброплазия, дегенерация миокарда и воспаление). Изменения в печени включали дегенерацию/некроз гепатоцитов в минимальной или умеренной степени, незначительную гепатоцеллюлярную гипертрофию, перинуклеарную вакуолизацию и увеличение клеток Купфера. Кроме того, при уровнях дозы $2,4 \times 10^{14}$ вг/кг и выше в легких наблюдалось незначительное периваскулярное и хроническое воспаление. Смертность, связанная с введением препарата, выявлена при уровнях дозы $2,4 \times 10^{14}$ вг/кг и выше, что ассоциировалось с наблюдаемой кардио- и гепатотоксичностью. Причиной смерти чаще всего был тромбоз предсердий <i>Myocardial degeneration was observed at doses of $7,9 \times 10^{13}$ vg/kg and higher. At doses of $1,5 \times 10^{14}$ vg/kg and higher, the study showed a dose-dependent increase in the frequency and severity of cardiac adverse events of various degrees (atrial thrombosis, atrial dilation, fibroplasia, myocardial degeneration, and inflammation). Changes in the liver included minimal to moderate degeneration/necrosis of hepatocytes, minor hepatocellular hypertrophy, perinuclear vacuolation, and increased Kupffer cells. In addition, at doses of $2,4 \times 10^{14}$ vg/kg and higher, minor perivascular and chronic inflammation was observed in the lungs. At doses of $2,4 \times 10^{14}$ vg/kg and higher, the study showed preparation-related mortality, which was associated with the observed cardiac and hepatic toxicity. The most frequent cause of death was atrial thrombosis</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Показатель Attribute	Способ введения / препарат Method of administration / gene therapy product	Модель Model	Краткие результаты Brief results
Токсичность при однократном введении Single-dose toxicity	Внутривенно; в желудочки головного мозга / целевой препарат intravenously; intraventrically / target product	Нечеловеко- образные прима- ты (Cynomolgus) Non-human primates (Cynomolgus)	Токсичности, связанной с введением препарата в дозе 6.7×10^{13} вг/кг, не наблюдалось, но часть данных оценки не была представлена заявителем (например, данные вскрытия), что затрудняло надлежащую оценку результатов. Полученные результаты не соответствовали представленным ранее данным о системном воспалении, токсичности для печени и дегенерации нейронов у ювенильных макак-резусов и минипигов после введения аналогичного вектора [52], что, вероятно, связано с использованием более низкой дозы препарата. Поскольку в настоящее время имеются данные KI, эти данные являются предпочтительными для определения профиля безопасности и эффективности препарата. No toxicity associated with the product was observed at a dose of 6.7×10^{13} vg/kg, but the Applicant did not provide part of the evaluated data (for example, necropsy), which made it difficult to properly evaluate the results. The submitted results did not correspond with the previously reported data on systemic inflammation, liver toxicity, and neuron degeneration in juvenile rhesus monkeys and minipigs after administration of a similar vector [52], which is probably due to the use of a lower dose. Since CT data are currently available, CT data are preferred for determining the product safety profile and effectiveness
Генотоксичность, канцерогенность / онкогенность (риск инсерционного мутагенеза) Genotoxicity, carcinogenicity / oncogenicity (risk of insertion mutagenesis)	Исследования не проводились: отсутствие исследований по интеграции AAV в геном объясняется тем, что риск считается ограниченным, так как лишь небольшая часть AAV интегрируется в геном (случайным образом в области хроматина/ДНК без преимущественной интеграции в критические сайты), большая же часть остается в эписомальной форме. Кроме того, в настоящее время не было зарегистрировано ни одного случая инсерционного мутагенеза для AAV. No studies have been conducted: the lack of studies on AAV integration into the genome is explained by the fact that the risk is considered limited, since only a small part of the AAV integrates into the genome (randomly into the regions of chromatin/DNA, without preferential integration into critical sites), while most of it remains in the episomal form. In addition, no cases of insertion mutagenesis have been reported for the AAV		

Примечание. AAV – аденоассоциированный вирус; KI – клиническое исследование; вг/кг – вирусных геномов на килограмм мышечной массы тела; SMA – спинальная мышечная атрофия; GFP – зеленый флуоресцирующий белок; AAV9.CB.GFP – аденоассоциированный вирусный вектор со вставкой гена зеленого флуоресцирующего белка вместо вставки исследуемого гена SMN для изучения биораспределения.
Notes. AAV, adeno-associated virus; CT, clinical trial; vg/kg, viral genomes per kilogram of body weight; SMA, spinal muscular atrophy; GFP, green fluorescence peptide; AAV9.CB.GFP, adeno-associated viral vector with the insertion of the green fluorescence peptide gene instead of the target SMN gene to study biodistribution.

к белку SMN не превышали уровень 1:50; иммунного ответа после введения препарата не было зарегистрировано. Как и ожидалось, был установлен иммунный ответ против капсида AAV-9, который корректировался предварительной обработкой преднизолоном.

Оценка эффективности препарата Zolgensma® европейским регуляторным органом была проведена по результатам исследования внутривенного применения препарата у 98 пациентов. Специальных КИ по определению дозы для препарата Zolgensma® не проводилось, предлагаемая терапевтическая доза 1×10^{14} вг/кг была определена в ДКИ; в рамках КИ 1 фазы CL-101 применялись две дозы (от $4,3 \times 10^{13}$ до $4,6 \times 10^{13}$ вг/кг и от $1,1 \times 10^{14}$ до $1,4 \times 10^{14}$ вг/кг)²⁴. Во всех КИ был использован исторический контроль. Основным КИ, проведенным на территории ЕС, результаты которого рассматривались ЕМА в рамках оценки регистрационного досье, было КИ 3 фазы CL-303 (одноруппное) с участием 22 пациентов со СМА 1 типа (без функционального гена *SMN1*, а также одной или двумя копиями гена *SMN2*), у которых уже проявлялись симптомы заболевания либо не проявлялись на момент включения в КИ; возраст пациентов на момент лечения составлял менее 6 месяцев (<180 сут). Первичными конечными точками были определены: выживаемость в возрасте 14 месяцев и доля пациентов, достигших функционального сидения без поддержки в течение не менее 30 с при контрольном посещении врача в возрасте 18 месяцев.

Во время КИ у всех пациентов наблюдалось увеличение показателя двигательных функций при нейромышечных заболеваниях у новорожденных по шкале CHOP-INTEND (Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders [53]) по сравнению с исходным уровнем. Анализ общей и мелкой моторики с помощью шкалы Бейли (Bayley Scales of Infant Development) для оценки раннего развития детей также указывает на постоянное улучшение у большинства пациентов мелкой моторики.

Из пациентов, включенных в исследование CL-303, 19 пациентов завершили исследование; один пациент скончался, а два пациента отзывали свое согласие. Сравнение с историческим контролем показало увеличение выживаемости пациентов, получивших лечение препаратом Zolgensma®. При этом 14 из 22 пациентов достигли навыка самостоятельно сидения в течение ≥ 30 с. Один пациент смог

ходить самостоятельно. У 3 из 22 пациентов не было зарегистрировано никаких улучшений, это были 3 пациента, не завершившие исследование из-за смерти и выхода из исследования. Исследования показали, что 18 из 22 пациентов (81,8%) были независимы от ИВЛ в возрасте 18 месяцев (сопутствующая конечная точка, $p < 0,0001$). В общей сложности 15 из 22 пациентов (68,1%) не нуждались в ИВЛ ни на одном этапе исследования, а также не получали поддержки в виде парентерального питания. Десять из 22 пациентов (40,9%) соответствовали критериям развития для возраста ребенка 18 месяцев. Это существенно отличается от естественного анамнеза (исторического контроля) и считается клинически значимым [54, 55].

Помимо данных КИ CL-303, заявка на маркетинговую авторизацию содержала следующие результаты эффективности применения препарата.

- Данные КИ 1 фазы CL-101: 14 из 15 пациентов, получавших лечение препаратом Zolgensma®, были живы в возрасте 13,6 и 20 месяцев. В конце исследования (через 24 месяца после введения дозы) 11 (из 12) пациентов из когорты 2 (доза от $1,1 \times 10^{14}$ до $1,4 \times 10^{14}$ вг/кг) смогли держать голову прямо без поддержки в течение ≥ 3 с и сидеть с поддержкой, 9 пациентов смогли сидеть без поддержки в течение ≥ 30 с, а 2 пациента смогли ходить самостоятельно; в конце КИ все пациенты находились на пероральном питании.
- Данные КИ LT-001 (наблюдательное КИ по оценке долгосрочной эффективности).
- Данные КИ 3 фазы CL-302 (аналог исследования CL-303 в ЕС): препарат получили 33 пациента, один пациент скончался, остальные 32 пациента живут без инвазивной вентиляции легких и продолжают участвовать в исследовании, один пациент не включен в оценку данных, поскольку проходил лечение в возрасте 181 сут (возраст исследуемой популяции – до 180 сут). Пациенты в исследовании CL-302 были старше на момент лечения по сравнению с пациентами в исследовании CL-303. По состоянию на 31.12.2019 6 пациентов соответствовали критериям ВОЗ – сидение без поддержки более 10 с, а 8 пациентов могли сидеть без поддержки не менее 30 с;
- Данные КИ 3 фазы CL-304 (когорта 1 – 14 пациентов с двумя копиями гена *SMN2*; когорта 2 – 15 пациентов с тремя копиями гена *SMN2*; первичной конечной точкой эффективности для когорты 2 являлась доля пациентов, до-

²⁴ Summary basis for regulatory action. Zolgensma. FDA. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

стигших способности стоять без поддержки не менее 3 с при любом посещении врача в возрасте до 24 месяцев). Пациентам не понадобилось применение инвазивной вентиляции легких. Четверо из 14 пациентов когорты 1 научились ходить с поддержкой, а затем самостоятельно, и 1 продолжает ходить с посторонней помощью. Пациенты во 2 когорте демонстрируют двигательные этапы развития, которые в значительной степени находятся в пределах нормального развития. Трое из 15 пациентов научились ходить с поддержкой, а затем самостоятельно, а четверо ходили с посторонней помощью.

Таким образом, достигнутые в ходе КИ показатели выживаемости и двигательной активности в значительной степени превосходят естественную историю течения СМА типа 1.

Не было представлено никаких данных, подтверждающих пользу у пациентов с одной копией гена *SMN2*. Данные, подтверждающие пользу у пациентов с тремя копиями гена *SMN2*, ограничены и не позволяют сделать вывод о пользе лечения из-за неоднородности естественного анамнеза у пациентов. Считается, что эффективность для пациентов с двумя копиями гена *SMN2* может быть экстраполирована на пациентов с одной или тремя копиями гена *SMN2*.

База данных по безопасности препарата Zolgensma® при рассмотрении европейским регуляторным органом на дату отсечения данных 31.12.2019 включала данные о 101 пациенте, получившем внутривенную инъекцию Zolgensma® в КИ, из которых 98 пациентов получили терапевтическую дозу препарата — $1,1 \times 10^{14}$ вг/кг. Двенадцать из этих 98 пациентов, были пролечены препаратом Zolgensma®, произведенным по ранее разработанному процессу. Таким образом, 86 пациентов получили препарат, изготовленный по коммерческой технологии, внутривенно в предлагаемой терапевтической дозе.

Дизайн КИ с одной группой лечения затрудняет определение того, связано ли неблагоприятное событие с лечением препаратом и сопутствующим применением кортикостероидов, с симптомами заболевания СМА 1 типа, его осложнениями или с естественными фоновыми детскими заболеваниями.

Были зарегистрированы следующие основные нежелательные явления (НЯ): общие реакции — повышение температуры тела; со стороны иммунной системы — иммунный ответ на капсид AAV9; со стороны крови — тромбоцитопения; со стороны желудочно-кишечного тракта — рвота; со стороны печени — преимущественно в те-

чение двух недель после введения препарата повышение уровня трансаминаз, аспартатами-нотрансферазы, аланинаминотрансферазы, тропонина-I, в связи с чем необходимо проводить лечение на фоне приема преднизолона, используемого в КИ в дозе 1 мг/кг/сут [54].

В целом, база данных по безопасности ограничена и существует неопределенность в отношении потенциальной кардиотоксичности и токсичности для дорсальных корневых ганглиев (DRG), наблюдаемой в ДКИ. Оценка НЯ со стороны сердца затруднена в связи с тем, что СМА 1 типа сама по себе связана с сопутствующими заболеваниями сердца. Обнаружение воспаления DRG в ДКИ на приматах не подтверждено у людей. Кроме того, существует неопределенность в отношении безопасности препарата при долгосрочных КИ вследствие потенциальной канцерогенности, хотя риск считается низким, поскольку векторы AAV в основном не интегрируются в геном хозяина. Для подтверждения этого необходимы данные долгосрочного наблюдения в течение 15 лет.

В КИ было зарегистрировано два случая смерти. Один пациент умер из-за дыхательной недостаточности, вероятно, связанной с проявлением СМА 1 типа, а не с введением препарата Zolgensma®. Причиной смерти второго пациента, скорее всего, было гипоксическое/ишемическое повреждение головного мозга из-за инфекции дыхательных путей, возникшей вследствие ИВЛ.

Выводы регуляторных органов по результатам экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения препарата Zolgensma® основывались на существующей неудовлетворенной медицинской потребности для лечения данного заболевания, преимуществе для пациентов при однократном введении препарата по сравнению с необходимостью повторного лечения нусинерсеном, а также на том, что с клинической точки зрения польза от немедленной доступности препарата для общественного здравоохранения перевешивает риски, связанные с тем фактом, что по-прежнему требуются дополнительные данные. Однако регуляторным органом ЕС было поставлено условие проведения заявителем оценки корреляции показателей качества готового препарата с клиническими данными и рассмотрение вопроса о том, насколько эффективен препарат в начале и конце срока годности, а также включение в перечень показателей контроля качества при выпуске показателя «расчетной дозы», вводимой пациенту (вг/кг, определенной на основе титра

вирусного вектора партии продукта на момент дозирования с учетом данных о стабильности)²⁵.

Заключение

Проведен анализ направлений и проблем разработки, проведения доклинических и клинических исследований препаратов генной терапии для лечения НДЗ, в результате которого показано, что к составлению программ ДКИ и КИ препаратов ГТ для НДЗ, как правило, применяется индивидуальный подход, учитывая разнообразие их проявлений, разную степень изученности и изменчивую патофизиологию.

Наиболее важными аспектами в ходе разработки дизайна ДКИ препаратов ГТ для НДЗ являются: выбор моделей животных с соответствующими НДЗ; включение в ДКИ более крупных животных (минипиги, приматы) наряду с грызунами, что позволяет представить дополнительные данные для экстраполяции дозы препарата для применения у человека и о его безопасности, а также оценить способ введения препаратов ГТ при использовании хирургических процедур и устройств доставки; особое внимание в ходе ДКИ препаратов ГТ для НДЗ уделяется выбору и применению нерутинных способов введения (в головной и спинной мозг) и обеспечению достаточной концентрации трансгена в органе-мишени при небольших объемах вводимого препарата.

На этапе КИ препаратов ГТ для НДЗ часто обоснованным является применение исторического контроля для сравнения (в случае сопоставимости популяций пациентов и контрольных показателей), особенно в случае редкого, серьезного НДЗ, отнесенного к заболеваниям с неудовлетворенной медицинской потребностью, для которого включение параллельного контроля не является практичным или этичным, а ожидаемый эффект лечения препаратом ГТ очевиден и сопоставим во времени с традиционным лечением. Исследование в КИ одной дозы препарата, определенной на этапе ДКИ и на основе данных литературы, допускается регуляторными органами, учитывая, что препараты ГТ предназначены преимущественно

для лечения жизнеугрожающих редких заболеваний с ограниченным количеством пациентов и, как правило, применяются однократно из-за возможного возникновения иммунного ответа. Важным аспектом в дизайне КИ таких препаратов при НДЗ является и выбор промежуточных, конечных точек эффективности и биомаркеров, в большинстве случаев для этого используются суррогатные конечные точки.

На примере препарата Zolgensma® (Novartis) для лечения детей со СМА 1 типа, получившего условное разрешение на продажу со стороны ЕМА, выделены установленные обязательства для заявителя относительно качества: разработка и внедрение дополнительных методов оценки качества, в частности, целостности векторного генома, содержания примесей, активности препарата, стабильности, оценки наличия/отсутствия эндогенных ретровирусов в банках клеток, используемых в производстве, и некоторые другие. В качестве особенностей представленных результатов ДКИ следует отметить, что выполнение исследований происходило при использовании разных серий препаратов, произведенных как по ранее разработанному процессу, так и по технологии производства для коммерческих целей. Требованием регуляторных органов при регистрации было продолжение изучения сопоставимости данных препаратов по эффективности в ДКИ и КИ. Что касается данных КИ, то заявителю необходимо завершить все КИ, которые не были закончены на момент рассмотрения регуляторными органами ЕС, и представить их результаты, в том числе и по долгосрочному наблюдению за пациентами.

Для Российской Федерации механизм условной регистрации лекарственных препаратов является новым, он стал доступен с марта 2022 г. в рамках нормативно-правовой базы ЕАЭС. Результат изучения зарубежного опыта экспертной оценки регистрационного досье препарата Zolgensma® (Novartis) в аспекте его условной регистрации может быть использован разработчиками в ходе вывода на рынок ЕАЭС лекарственных препаратов по процедуре условной регистрации.

Литература/References

1. Dunbar CE, High KA, Jounk JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science*. 2018;359(6372):eaan4672. <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>
2. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Горенков ДВ, Хантимирова ЛМ, Гусева СГ, Меркулов ВА. Проблемные аспекты разработки и регистрации генотерапевтических препаратов. *БИОпрепараты*.

²⁵ Assessment report, Zolgensma. EMA/200482/2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zolgensma-epar-public-assessment-report_en.pdf
Summary Basis for Regulatory Action. Zolgensma. <https://www.fda.gov/media/127961/download>

- Профилактика, диагностика, лечение. 2022;22(1):6–22.
- Soldatov AA, Avdeeva ZI, Gorenkov DV, Khantimirova LM, Guseva SG, Merkulov VA. Challenges in development and authorisation of gene therapy products. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):6–22 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-6-22>
3. Ravi B, Chan-Cortés MH, Sumner CJ. Gene-targeting therapeutics for neurological disease: lessons learned from spinal muscular atrophy. *Annu Rev Med*. 2021;72:1–14.
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-070119-115459>
 4. Ямщикова НГ, Ставровская АВ, Иллариошкин СН. Некоторые аспекты развития нейродегенеративных заболеваний. *Асимметрия*. 2018;12(4):631–45. Yamshchikova NG, Stavrovskaya AV, Illarioshkin SN. Some aspects of the development of neurodegenerative diseases. *Journal of Asymmetry*. 2018;12(4):631–38 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18454/ASY.2018.12.4.030>
 5. Heemels MT. Neurodegenerative diseases. *Nature*. 2016;539(7628):179.
<https://doi.org/10.1038/539179a>
 6. Hudry E, Vandenberghe LH. Therapeutic AAV gene transfer to the nervous system: a clinical reality. *Neuron*. 2019;101(5):839–62.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.017>
 7. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(5):358–78.
<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
 8. Lee JH, Wang JH, Chen J, Li F, Edwards TL, Hewitt AW, Liu GS. Gene therapy for visual loss: opportunities and concerns. *Prog Retin Eye Res*. 2019;68:31–53.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.08.003>
 9. Sun J, Roy S. Gene-based therapies for neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2021;24(3):297–311.
<https://doi.org/10.1038/s41593-020-00778-1>
 10. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020;578(7794):229–36.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
 11. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet*. 2000;1(2):91–9.
<https://doi.org/10.1038/35038533>
 12. Leone P, Shera D, McPhee SW, Francis JS, Kolodny EH, Bilaniuk LT, et al. Long-term follow-up after gene therapy for Canavan disease. *Sci Transl Med*. 2012;4(165):165ra163.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003454>
 13. Bedbrook CN, Deverman BE, Gradinaru V. Viral strategies for targeting the central and peripheral nervous systems. *Annu Rev Neurosci*. 2018;41:323–48.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-062048>
 14. Samaranch L, Salegio EA, San Sebastian W, Kells AP, Bringas JR, Forsayeth J, Bankiewicz KS. Strong cortical and spinal cord transduction after AAV7 and AAV9 delivery into the cerebrospinal fluid of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*. 2013;24(5):526–32.
<https://doi.org/10.1089/hum.2013.005>
 15. Xiang C, Zhang Y, Guo W, Liang XJ. Biomimetic carbon nanotubes for neurological disease therapeutics as inherent medication. *Acta Pharm Sin B*. 2020;10(2):239–48.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.11.003>
 16. Katz ML, Tecedor L, Chen Y, Williamson BG, Lysenko E, Wininger FA, et al. AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. *Sci Transl Med*. 2015;7(313):313ra180.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac6191>
 17. Federici T, Taub JS, Baum GR, Gray SJ, Grieger JC, Matthews KA, et al. Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene Ther*. 2012;19(8):852–9.
<https://doi.org/10.1038/gt.2011.130>
 18. Sehara Y, Fujimoto KI, Ikeguchi K, Katakai Y, Ono F, Takino N, et al. Persistent expression of dopamine-synthesizing enzymes 15 years after gene transfer in a primate model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2017;28(2):74–9.
<https://doi.org/10.1089/humc.2017.010>
 19. Saraiva J, Nobre RJ, Pereira de Almeida L. Gene therapy for the CNS using AAVs: the impact of systemic delivery by AAV9. *J Control Release*. 2016;241:94–109.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.011>
 20. 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>
 21. Van Dam D, De Deyn PP. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(11):956–70.
<https://doi.org/10.1038/nrd2075>
 22. Pype S, Moechars D, Dillen L, Mercken M. Characterization of amyloid β peptides from brain extracts of transgenic mice overexpressing the London mutant of human amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 2003;84(3):602–9.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01556.x>
 23. Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci*. 2014;109(2) 73–86.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.05.017>
 24. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet*. 2004;13(2):159–70.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
 25. Jankowsky JL, Slunt HH, Gonzales V, Savonenko AV, Wen JC, Jenkins NA, et al. Persistent amyloidosis following suppression of A β production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Med*. 2005;2(12):e355.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020355>
 26. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein. *Neuron*. 2002;34(4):521–33.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00682-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00682-7)

27. Gaj T, Ojala DS, Ekman FK, Byrne LC, Limsirichai P, Schaffer DV. *In vivo* genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Sci Adv*. 2017;3(12):eaar3952.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aar3952>
28. Duan W, Guo M, Yi L, Liu Y, Li Z, Ma Y, et al. The deletion of mutant *SOD1* via CRISPR/Cas9/sgrNA prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Gene Ther*. 2020;27(3-4):157–69.
<https://doi.org/10.1038/s41434-019-0116-1>
29. Lim CKW, Gapinske M, Brooks AK, Woods WS, Powell JE, Zeballos CMA, et al. Treatment of a mouse model of ALS by *in vivo* base editing. *Mol Ther*. 2020;28(4):1177–89.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.005>
30. Mangiarini L, Sathasivam K, Sella M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*. 1996;87(3):493–506.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81369-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81369-0)
31. Ekman FK, Ojala DS, Adil MM, Lopez PA, Schaffer DV, Gaj T. CRISPR-Cas9-mediated genome editing increases lifespan and improves motor deficits in a Huntington's disease mouse model. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;17:829–39.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.009>
32. Monani UR, Sendtner M, Covert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn*^{-/-} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2000;9(3):333–9.
<https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.333>
33. Passini MA, Bu J, Richards AM, Treleaven CM, Sullivan JA, O'Riordan CR, et al. Translational fidelity of intrathecal delivery of self-complementary AAV9-survival motor neuron 1 for spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther*. 2014;25(7):619–30.
<https://doi.org/10.1089/hum.2014.011>
34. Benkhalifa-Ziyyat S, Besse A, Roda M, Duque S, Astord S, Carcenac R, et al. Intramuscular scAAV9-SMN injection mediates widespread gene delivery to the spinal cord and decreases disease severity in SMA mice. *Mol Ther*. 2013;21(2):282–90.
<https://doi.org/10.1038/mt.2012.261>
35. Richardson RM, Gimenez F, Salegio EA, Su X, Bringas J, Berger MS, Bankiewicz KS. T2 imaging in monitoring of intraparenchymal real-time convection-enhanced delivery. *Neurosurgery*. 2011;69(1):154–63.
<https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318217217e>
36. Miyanohara A, Kamizato K, Juhas S, Juhasova J, Navarro M, Marsala S, et al. Potent spinal parenchymal AAV9-mediated gene delivery by subpial injection in adult rats and pigs. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16046.
<https://doi.org/10.1038/mtm.2016.46>
37. Morabito G, Giannelli SG, Ordazzo G, Bido S, Castoldi V, Indrigo M, et al. AAV-PHP.B-mediated global-scale expression in the mouse nervous system enables GBA1 gene therapy for wide protection from synucleinopathy. *Mol Ther*. 2017;25(12):2727–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.004>
38. Coune PG, Schneider BL, Aebischer P. Parkinson's disease: gene therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(4):a009431.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009431>
39. Boussicault L, Alves S, Lamazière A, Planques A, Heck N, Moumné L, et al. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain*. 2016;139(Pt3):953–70.
<https://doi.org/10.1093/brain/awv384>
40. Challis RC, Kumar SR, Chan KY, Challis C, Beadle K, Jang MJ, et al. Systemic AAV vectors for widespread and targeted gene delivery in rodents. *Nat Protoc*. 2019;14(2):379–414.
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0097-3>
41. Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, Kumar SR, Chan KY, Banerjee A, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol*. 2016;34(2):204–9.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3440>
42. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM, et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther*. 2009;17(7):1187–96.
<https://doi.org/10.1038/mt.2009.71>
43. Xie C, Gong XM, Luo J, Li BL, Song BL. AAV9-NPC1 significantly ameliorates Purkinje cell death and behavioral abnormalities in mouse NPC disease. *J Lipid Res*. 2017;58(3):512–8.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M071274>
44. Vogelbaum MA, Aghi MK. Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2015;17(Suppl_2):ii3–8.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/nou354>
45. Debinski W, Tatter SB. Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*. 2009;9(10):1519–27.
<https://doi.org/10.1586/ern.09.99>
46. Piguet F, Alves S, Cartier N. Clinical gene therapy for neurodegenerative diseases: past, present, and future. *Hum Gene Ther*. 2017;28(11):988–1003.
<https://doi.org/10.1089/hum.2017.160>
47. McFarthing K, Prakash N, Simuni T. Clinical trial highlights: 1. Gene therapy for Parkinson's, 2. Phase 3 study in focus — Intec Pharma's Accordion Pill, 3. Clinical trials resources. *J Parkinson's Dis*. 2019;9(2):251–64.
<https://doi.org/10.3233/JPD-199001>
48. Smith BK, Collins SW, Conlon TJ, Mah CS, Lawson LA, Martin AD, et al. Phase I/II trial of adeno-associated virus-mediated alpha-glucosidase gene therapy to the diaphragm for chronic respiratory failure in Pompe disease: initial safety and ventilatory outcomes. *Hum Gene Ther*. 2013;24(6):630–40.
<https://doi.org/10.1089/hum.2012.250>
49. Rafii MS, Tuszynski MH, Thomas RG, Barba D, Brewer JB, Rissman RA, et al. Adeno-associated viral vector (serotype 2)-nerve growth factor for patients with Alzheimer disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol*. 2018;75(7):834–41.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0233>

50. Worgall S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, et al. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther.* 2008;19(5):463–74. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.022>
51. Fu H, Meadows AS, Pineda RJ, Kunkler KL, Truxal KV, McBride KL, et al. Differential prevalence of antibodies against adeno-associated virus in healthy children and patients with mucopolysaccharidosis III: perspective for AAV-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2017;28(4):187–96. <https://doi.org/10.1089/humc.2017.109>
52. Hinderer C, Katz N, Buza EL, Dyer C, Goode T, Bell P, et al. Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an adeno-associated virus vector expressing human SMN. *Hum Gene Ther.* 2018;29(3):285–98. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.015>
53. Glanzman AM, Mazzone E, Main M, Pelliccioni M, Wood J, Swoboda KJ, et al. The Children's Hospital of Philadelphia infant test of neuromuscular disorders (CHOP INTEND): test development and reliability. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(3):155–61. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.11.014>
54. Day JW, Mendell JR, Mercuri E, Finkel RS, Strauss KA, Kleyn A, et al. Clinical trial and postmarketing safety of onasemnogene abeparvovec therapy. *Drug Saf.* 2021;44(10):1109–19. <https://doi.org/10.1007/s40264-021-01107-6>
55. Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, Connolly AM, Crawford TO, Darras BT, et al. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(4):284–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00001-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00001-6)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Мельникова** — идея, концепция и дизайн исследования, анализ и обобщение результатов исследования по направлениям разработки генотерапевтических лекарственных препаратов в мире; **В.А. Меркулов** — интерпретация результатов исследования, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; **О.В. Меркулова** — анализ и обобщение данных о регистрации препарата Zolgensma® в ЕС и США.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. В.А. Меркулов является главным редактором журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Melnikova** elaborated the study idea, concept, and design, analysed and summarised the study results on global trends in the development of gene therapy products. **V.A. Merkulov** interpreted the study results and approved the final version of the manuscript for publication. **O.V. Merkulova** analysed and summarised data on Zolgensma® authorisation in the EU and the USA.

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. V.A. Merkulov is the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
melnikovaEV@expmed.ru

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

Меркулова Ольга Владимировна, канд. мед. наук
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7013-0394>
merkulova@expmed.ru

Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>
melnikovaEV@expmed.ru

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

Olga V. Merkulova, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7013-0394>
merkulova@expmed.ru

Поступила 09.06.2022

После доработки 23.01.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Online first 20.04.2023

Received 9 June 2022

Revised 23 January 2023

Accepted 13 March 2023

Online first 20 April 2023



Современные подходы к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований дендритно-клеточных вакцин в онкологии

Т.Л. Нехаева¹✉, А.А. Камалетдинова², М.Ф. Лутфуллин², Т.В. Табанская³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Ленинградская, д. 68, пос. Песочный, Санкт-Петербург, 197758, Российская Федерация

² Министерство здравоохранения Российской Федерации, Рахмановский пер., д. 3/25, стр. 1–4, Москва, ГСП-4, 127994, Российская Федерация

³ 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

✉ Нехаева Татьяна Леонидовна; nehaevat151274@mail.ru

Резюме

На сегодняшний день применение персонализированных методов клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований рассматривается как перспективный подход к лечению опухолей, а эффективность этих методов оценивается в контексте клинико-биологических характеристик опухоли и состояния иммунной системы конкретного пациента. Одним из вариантов иммунотерапии является разработка аутологических противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток.

Цель работы — анализ современных методологических подходов к оценке качества, эффективности и безопасности противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток.

В обзоре приведено описание функциональной роли дендритных клеток в регуляции иммунного ответа, а также проведен анализ данных литературы, посвященных современным подходам получения дендритно-клеточных вакцин с заданными характеристиками, оценке качества, изучению противоопухолевой эффективности клеточного препарата, а также опыту проведения доклинических и клинических исследований. Освещены специфические аспекты международного опыта регистрации и клинического применения клеточных препаратов. В обзоре обсуждены методологические подходы к проведению доклинических исследований дендритно-клеточных вакцин, которые должны быть нацелены на получение сведений для выбора дозы, обоснования пути введения, режима применения клеточных препаратов, а также идентификации иммунологических маркеров, коррелирующих с клинической эффективностью. Рассмотрен международный опыт проведения клинических исследований дендритно-клеточных вакцин при различных злокачественных новообразованиях. Предложен перечень показателей качества клеточных препаратов на основе соматических клеток человека для их дальнейшего использования в клинической практике.

Ключевые слова: дендритно-клеточная вакцина; доклинические исследования; клинические исследования; оценка качества; модели *in vitro*; модели *in vivo*

Для цитирования: Нехаева Т.Л., Камалетдинова А.А., Лутфуллин М.Ф., Табанская Т.В. Современные подходы к оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований дендритно-клеточных вакцин в онкологии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):148–161. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-148-161>

© Т.Л. Нехаева, А.А. Камалетдинова, М.Ф. Лутфуллин, Т.В. Табанская, 2023

Current approaches to quality assessment, non-clinical and clinical studies of dendritic cell vaccines in oncology

T.L. Nekhaeva¹✉, A.A. Kamaletdinova², M.F. Lutfullin², T.V. Tabanskaya³

¹ N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, 68 Leningradskaya St., Pesochny, St Petersburg 197758, Russian Federation

² Ministry of Health of the Russian Federation, 3/25 Rakhmanovsky Ln., bld. 1–4, Moscow 127994, Russian Federation

³ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Tatiana L. Nekhaeva; nehaevat151274@mail.ru

Abstract

At present, personalised cellular immunotherapy is considered a promising approach to the treatment of malignant neoplasms. The effectiveness of these cellular immunotherapy methods is evaluated in the context of clinical and biological tumour characteristics and the state of the immune system of a particular patient. One of the immunotherapy options for cancer is the development of autologous dendritic cell vaccines.

The aim of this study was to analyse current methodological approaches to the evaluation of the quality, efficacy, and safety of dendritic cell cancer vaccines.

This review describes the functional role of dendritic cells in immune response regulation. The paper presents the results of literature analysis covering current approaches to obtaining dendritic cell vaccines with specific characteristics, quality assessment, studies of the anti-tumour efficacy of cell therapy products, and the experience of conducting non-clinical and clinical studies. The review highlights specific aspects of international experience in the registration and clinical use of cell therapy products. The authors discuss methodological approaches to non-clinical studies of dendritic cell vaccines, which should aim to obtain information to select the dose, route, and mode of administration and to identify immunological markers correlating to the clinical efficacy of cell therapy products. The paper covers international experience in conducting clinical trials of dendritic cell vaccines for various malignant neoplasms. The authors propose a list of quality attributes of human somatic cell-based medicinal products for further clinical use.

Key words: dendritic cell vaccine; non-clinical studies; clinical trials; quality assessment; *in vitro* models; *in vivo* models

For citation: Nekhaeva T.L., Kamaletdinova A.A., Lutfullin M.F., Tabanskaya T.V. Current approaches to quality assessment, non-clinical and clinical studies of dendritic cell vaccines in oncology. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):148–161. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-148-161>

Введение

Одним из современных иммунотерапевтических подходов, вызывающих повышенное внимание исследователей, является использование противоопухолевых вакцин. Механизм действия этих препаратов заключается в иммунизации пациента опухоль-ассоциированными антигенами (ОАА), что приводит к активации адаптивного иммунного ответа, нацеленного на опухолевые клетки [1]. В настоящее время разрабатываются различные виды противоопухолевых вакцин — на основе пептидов,

опухолевых клеток, экзосом. Однако наиболее перспективной представляется разработка дендритно-клеточных вакцин (ДКВ), в основе которых лежит способность дендритных клеток (ДК) представлять антиген Т-лимфоцитам, вызывать их активацию и инициировать противоопухолевый иммунный ответ [1–3].

Впервые идея о возможности использования ДК для лечения злокачественных опухолей была высказана в 1990-х годах, когда в эксперименте на лабораторных животных была показана возможность выделения этих клеток,

их активации опухолевыми антигенами *ex vivo* и формирования противоопухолевого ответа на модели мышей с инокулированными опухолевыми клетками [4]. В других ранних работах по ДК описано их применение для нагрузки пептидами папилломавируса человека или синтетическими пептидами, что вызывало развитие противоопухолевого ответа, главным образом опосредованного Т-лимфоцитами [5]. В дальнейших исследованиях было показано, что формирующийся Т-клеточный иммунный ответ специфичен к антигену, используемому для нагрузки. Результаты первых пилотных клинических исследований (КИ) применения ДКВ, проведенные с включением пациентов с фолликулярной В-клеточной лимфомой, множественной миеломой, меланомой и различными злокачественными новообразованиями (ЗНО) с экспрессией раково-тестикулярных антигенов, показали, что данный подход безопасен и вызывает опухолеспецифический иммунный ответ [6].

Для формирования противоопухолевого иммунного ответа ДКВ необходимо обеспечить способность ДК к миграции и индукции трех сигналов, необходимых для активации Т-лимфоцитов: перекрестной презентации антигена, взаимодействию с костимулирующими молекулами и поляризации Т-лимфоцитов путем продукции цитокинов [1, 7]. Различные типы ДК могут быть пригодны для клинического применения: выделенные из периферической крови; выращенные *ex vivo* из их CD34⁺ костномозговых предшественников; полученные из моноцитов периферической крови; зрелые и незрелые [8].

В настоящее время существует множество стратегий создания противоопухолевых ДКВ с заданными характеристиками, однако есть несколько общих основных шагов в разработке этих клеточных препаратов. Как правило, первым этапом получения ДК является выделение предшественников этих клеток (например, моноцитов из периферической крови или CD34⁺ клеток из костного мозга), затем проводят их дифференцировку *in vitro* путем инкубации с цитокинами — гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) и интерлейкином-4 (IL-4) или Flt3 лигандом [1]. Далее ДК нагружают одним или несколькими опухолевыми антигенами, для чего клетки инкубируют с лизатом или внеклеточными экзосомами опухолевых клеток, белками или пептидами, подобранными для определенных молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) [1, 3]. Другим подходом являет-

ся электропорация ДК с использованием мРНК, кодирующей различные опухолевые антигены. Разные методы нагрузки ДК имеют свои преимущества и недостатки. Однако наиболее перспективными являются вакцины, полученные с использованием нагрузки лизатом инактивированных опухолевых клеток, подверженных иммуногенной клеточной гибели [3, 9]. На заключительном этапе обеспечивают созревание ДК *in vitro*, чтобы получить антигенпрезентирующие клетки (АПК), способные активировать Т-лимфоциты. Для этого ДК инкубируют с различными комбинациями провоспалительных цитокинов (например, TNF- α , IL-1 β и IL-6), часто с добавлением простагландина E2, липополисахарида, CD40L, интерферонов (IFN), агонистов Толл-подобных рецепторов (toll-like receptor, TLR), например poly-ICLC [10]. В результате этих воздействий полученные ДК обладают высоким уровнем экспрессии молекул для активации лимфоцитов (МНС класса I и II, CD80, CD86), рецепторов, необходимых для миграции в лимфатические узлы (например, CCR7), и секретируют цитокины для поляризации лимфоцитов (например, IL-12) [1]. Однако есть протоколы получения ДКВ и их использования в КИ в виде незрелых ДК, например вакциноterapia костномозговыми предшественниками ДК, сенсibilizированными фотомодифицированными опухолевыми клетками [11].

Внедрение в клиническую практику клеточного препарата возможно только при условии подробного изучения специфической активности и безопасности на этапе экспериментальных исследований. Соответственно, получение ДКВ с заданными характеристиками, способных индуцировать противоопухолевый иммунный ответ, требует контроля этих характеристик, изучения противоопухолевой эффективности полученного клеточного препарата, а также идентификации и оценки рисков при планировании доклинического и клинического исследования.

Цель работы — анализ современных методологических подходов к оценке качества, эффективности и безопасности противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток.

Функциональная роль дендритных клеток в регуляции иммунного ответа

В зависимости от происхождения ДК разделяют на следующие типы.

1. Классические, или «конвенциональные», ДК (classical/conventional dendritic cell, cDC): происходят от общего предшественника ДК в костном мозге, экспрессируют CD11c. Их можно разделить на субпопуляции.

- Классические ДК 1 типа (cDC1): развиваются под контролем транскрипционных факторов IRF8, ID2 и BATF3; характеризуются экспрессией CD141 [12]. Основная функция этих клеток при ЗНО – презентация антигенов CD8⁺ Т-лимфоцитам и их активация, но также они могут активировать и CD4⁺ Т-клетки. Под действием IFN I типа или IFN-γ классические ДК 1 типа могут секретировать хемокины CXCL9 или CXCL1, которые привлекают CXCR3⁺ эффекторы (например, NK-клетки) [12].
- Классические ДК 2 типа (cDC2): развиваются под контролем транскрипционных факторов IRF4, ID2, ZEB2 и Notch2/KLF4; характеризуются экспрессией CD1c; при ЗНО презентуют антигены CD4⁺ Т-лимфоцитам [12].

2. Плазмацитоидные ДК (plasmacytoid dendritic cell, pDC): происходят как от общего предшественника ДК, так и от лимфоидных предшественников [13]. Эти клетки экспрессируют CD123, CD303 (BDCA2), CD304 (BDCA4) и иммуноглобулин-подобный транскрипт (ILT7); демонстрируют выраженную экспрессию IFN I типа; помимо адаптивного иммунного ответа способны индуцировать миграцию и активацию NK-клеток, созревание макрофагов и ДК [13]. Однако также есть данные о проопухолевой активности pDC.

3. Воспалительные, или моноцитарные, ДК (monocyte-derived dendritic cell, moDC): появляются только при воспалении, когда экспрессия CCR2 в тканях способствует привлечению моноцитов и их дифференцировке в ДК.

Одной из важных характеристик ДК как профессиональных АПК является их способность представлять захваченные экзогенные антигены в контексте молекул как МНС II класса, так и МНС I класса, которые в случае других ядросодержащих клеток образуют комплексы с эндогенными антигенами [12, 14]. Эта особенность ДК, называемая кросс-презентацией, или перекрестной презентацией, необходима для формирования иммунитета к вирусам, внутриклеточным бактериям и злокачественным клеткам [12]. Опухолевые антигены, связанные с молекулами МНС I класса и представленные на поверхности ДК, распознаются наивными антиген-специфическими CD8⁺ Т-лимфоцитами, что приводит к их пролиферации и индукции цитотоксической активности с последующей элиминацией злокачественных клеток, несущих данные антигены. С другой стороны, антигены в комплексе с молекулами МНС II класса распознаются наивными антиген-специфическими

CD4⁺ Т-хелперами, которые в случае секреции ДК необходимых цитокинов приобретают фенотип Т-хелперов 1 типа (Th1) и способствуют индукции противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [14].

После взаимодействия Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) и МНС в Т-лимфоцитах инициируется процесс активации и дифференцировки, известный как праймирование Т-клеток, после чего они мигрируют в опухоль, где ЦТЛ оказывают цитотоксическое противоопухолевое действие при поддержке Т-хелперов [12]. Однако для активации эффективного антигенспецифического противоопухолевого ответа, опосредованного ЦТЛ, необходима секреция ДК цитокинов, основным среди которых является IL-12 [1]. Продукция ДК цитокина IL-12 зависит от двух сигналов – один индуцируется CD40 или TLR, другой связан с IFN-γ. Под действием IL-12 происходит праймирование CD8⁺ Т-лимфоцитов и превращение их в цитотоксические эффекторы, а также поляризация наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов 1 типа [1, 12, 15]. Секреция IL-12 является третьим сигналом, который наряду с кросс-презентацией антигена и экспрессией костимулирующих молекул индуцирует адаптивный клеточный ответ при ЗНО [1]. Кроме того, секреция IL-12 ДК способствует активации NK-клеток, участвующих в неспецифической элиминации опухолевых клеток [16].

Тогда как поляризация Т-хелперов в сторону Th1 происходит под действием IL-12, поляризации в направлении Th2 способствует секреция IL-4. В норме она осуществляется, главным образом, с участием классических ДК 2 типа и необходима для формирования иммунного ответа на внеклеточные патогены, паразитарные антигены и аллергены. Однако преобладание Th2 в опухолевом микроокружении приводит к недостаточной эффективности цитотоксического клеточного иммунного ответа, элиминирующего злокачественные клетки [14].

Методологические подходы к изучению дендритно-клеточных вакцин *in vitro* и *in vivo*

Доклинические исследования являются необходимым этапом разработки клеточных препаратов, в том числе ДКВ, и включают оценку эффективности, безопасности и биораспределения изучаемого клеточного препарата [17, 18]. В настоящее время наблюдается разрыв между фундаментальными исследованиями и клиническим применением полученных результатов. Несмотря на многочисленные попытки решения

этой проблемы, существенными препятствиями к внедрению новых терапевтических подходов остаются низкая воспроизводимость и применимость доклинических результатов в клинической практике. Одним из подходов для преодоления этих препятствий является создание релевантных моделей [17, 19, 20].

Модели *in vitro* (2D-модели, 3D-модели)

Для оценки способности ДКВ активировать антигенспецифические Т-лимфоциты и вызывать их пролиферацию используются подходы *in vitro*. Долгое время «золотым стандартом» определения функциональной активности ДКВ считался метод смешанной культуры лимфоцитов, однако он не отражал всех аспектов взаимодействия ДК и Т-клеток [21]. В настоящее время широко используется метод анализа молекул костимуляции («COSTIM bioassay») с применением анти-CD3 антител для субоптимальной стимуляции Т-лимфоцитов [21], который был валидирован для оценки эффективности ДКВ и может использоваться в КИ. Основой этих методов является количественная оценка пролиферации Т-лимфоцитов, которую ранее определяли с помощью радиоактивного ³H-тимидина. Сейчас существует более простой метод окрашивания клеток красителем сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеин-диацетата (carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE), содержание которого измеряется с помощью проточной цитофлуориметрии. Другим подходом к оценке специфического противоопухолевого иммунного ответа является определение цитотоксической активности CD8⁺ Т-лимфоцитов, для чего оценивают уровень разрушения (лизиса) опухолевых клеток ЦТЛ или секрецию ими цитотоксических медиаторов (IL-2, IFN- γ , TNF- α) [22]. Эффекторными CD8⁺ Т-лимфоцитами реализуют свою функцию с помощью цитолитических белков, содержащихся в литических гранулах (гранзимы, перфорины) [23].

Для оценки противоопухолевой эффективности ДКВ в ходе доклинических исследований необходима разработка моделей ЗНО *in vitro* с использованием опухолевых клеточных линий [20, 24]. Долгое время они считались «золотым стандартом» благодаря их доступности и простоте использования, неограниченной способности к пролиферации, а также отсутствию этических ограничений [24]. Однако показано, что свойства клеточных линий часто не соответствуют характеристикам опухоли *in vivo* [25]. Клеточные линии демонстрируют низкую гетерогенность и фенотип, отличный от исходного фенотипа клеток ЗНО, а при дли-

тельном культивировании могут накапливать генетические аберрации [24]. В связи с этим активно развиваются методы получения первичных опухолевых культур и клеточных линий пациентов, которые сохраняют исходный уникальный фенотип и могут использоваться в доклинических исследованиях и персонализированной медицине [24, 25].

Первичные культуры получают из фрагмента опухоли пациента, извлеченного при биопсии или хирургическом вмешательстве, который подвергают ферментативной или механической диссоциации до отдельных клеток, а затем культивируют *in vitro* и используют для оценки различных терапевтических подходов. В некоторых случаях из первичной культуры удается получить стабильную клеточную линию [24, 25]. Тем не менее для некоторых опухолей клеточные линии отсутствуют, что может быть связано со сложностью выделения и/или длительного поддержания культуры *in vitro*, а также с изменением фенотипа в культуре, связанным с генетической нестабильностью [26]. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России создан Банк клеточных линий солидных опухолей однотипно пролеченных пациентов (из фрагментов опухолей 917 пациентов). Доля жизнеспособных клеточных линий на пятом пассаже составляла 60,9%, а после 40–45 пассажа доля клеточных линий со стабильными пролиферативными характеристиками и секреторным фенотипом была равна лишь 21,5%. В работе А.Б. Даниловой с соавт. [27] отмечена важность строгой воспроизводимости условий культивирования и постоянный контроль функциональных параметров опухолевых клеток.

Для оценки противоопухолевого эффекта ДКВ *in vitro* разрабатываются многокомпонентные (гетеротипические) модели, включающие помимо опухолевых клеток эффекторные Т-лимфоциты. В работе P.V. Pham с соавт. [28] зрелые ДК, нагруженные лизатом стволовых клеток рака молочной железы (РМЖ), инкубировали с Т-клетками, а затем добавляли эту клеточную суспензию к монослою опухолевых клеток. Для оценки цитотоксического эффекта праймированных лимфоцитов использовали анализатор клеток в реальном времени xCELLigence (Agilent Technologies, США), измеряя снижение пролиферации клеток РМЖ [28].

Одной из причин неприменимости результатов доклинических исследований в клинике является использование в качестве моделей достаточно простых биологических объектов, не учитывающих комплексные взаимодействия в организме [19]. Хотя двумерные *in vitro*

модели являются относительно недорогими и простыми в использовании, они не способны имитировать процесс роста солидных опухолей *in vivo*, их структуру и гетерогенность, сложные пространственные взаимодействия между злокачественными клетками и микроокружением (включая внеклеточный матрикс), градиент питательных веществ, экспрессию генов и белков [25, 26]. В связи с этим исследования, проведенные с использованием 2D-моделей, часто приводят к противоречивым результатам [26], поэтому на сегодняшний день разработано несколько подходов к получению 3D-моделей опухоли.

Одним из таких подходов является создание сфероидов из отдельных опухолевых клеток — агрегатов сферической формы, способных к самоорганизации и самообновлению [25, 26, 29]. Эти трехмерные модели опухоли широко используются для определения эффективности различных методов противоопухолевой терапии, включая химиотерапию, фотодинамическую терапию и иммунотерапию. Процесс формирования сфероида соответствует фазам роста опухоли *in vivo*, наличие гипоксического ядра имитирует состояние участков опухоли, не получающих достаточного кровоснабжения, с характерными особенностями метаболизма и секрецией соответствующих факторов, а накопление компонентов внеклеточного матрикса в сфероиде приводит к его уплотнению и снижению проницаемости, позволяя моделировать взаимодействия клеток опухоли с матриксом [25, 29].

Помимо злокачественных клеток в состав сфероидов могут быть включены эндотелиоциты, клетки стромы и иммунной системы, что позволяет изучать роль различных компонентов микроокружения в развитии и прогрессировании опухоли [26, 29]. Поскольку гетеротипическая 3D-модель имитирует комплексные взаимодействия опухоли и иммунной системы, она может использоваться для оценки эффективности иммунотерапевтических подходов. В работе T. Courau с соавт. [30] на модели, включавшей клетки колоректального рака и мононуклеарные клетки периферической крови, была изучена инфильтрация сфероида Т-лимфоцитами и NK-клетками и показано его иммуноопосредованное разрушение. В исследовании E. Gottfried с соавт. [31] было оценено влияние типа опухоли на фенотип ДК в 3D-модели и показана роль лактата в дифференцировке этих клеток. N. Etminan с соавт. [32] использовали сфероиды клеток глиомы для изучения созревания и миграции ДК.

Применение опухолевых сфероидов имеет ограничения, связанные с неспособностью некоторых опухолевых клеток формировать трехмерные структуры *in vitro*, а также сложностями поддержания одинакового размера и соотношения различных клеток в составе сфероида. Кроме того, сфероиды, искусственно созданные *in vitro*, не вполне точно повторяют структуру опухолевой ткани. Применение органоидов, являющихся фрагментами первичной опухолевой ткани, сохраняющих структуру, морфологию, состав стромы и гетерогенность исходной опухоли, позволяет персонализировать поиск терапевтических подходов *in vitro* [26, 29]. Показана возможность трансплантации органоидов мышам с формированием гистологически аналогичной опухоли [26].

Для оценки эффективности различных онкоиммунологических подходов для противоопухолевой терапии может использоваться сокультивирование органоидов с опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами или клетками периферической крови [33]. На этом основана персонифицированная опухолевая *ex vivo* модель CANscript (MitraBiotech, США), позволяющая изучать опухоль с сохранением ее морфологии в контексте индивидуального опухолевого микроокружения пациента, для чего фрагменты опухолевой ткани пациента культивируют в аутологичной плазме с аутологичными мононуклеарными клетками периферической крови.

Перспективным подходом к созданию 3D-моделей опухоли считается метод трехмерной биопечати, при котором используют автоматизированное послойное нанесение опухолевых клеток и других компонентов микроокружения [34]. Хотя метод позволяет получить любую заданную архитектуру ткани, включая сосудистую сеть, остаются технические сложности, связанные с функционированием модели. Решением этой проблемы может быть использование микрофлюидных систем — устройств с микроскопическими камерами и каналами, позволяющими длительно культивировать клетки в условиях непрерывной подачи питательной среды. Кроме того, разрабатываются более сложные биотехнологические системы — «органы-на-чипе», состоящие из жестких и эластичных материалов, скаффолдов (матриц для культивирования), микрофлюидных систем и живых клеток различных типов [25]. С помощью этого метода созданы васкуляризированные модели меланомы кожи, рака легкого, почечно-клеточного рака, РМЖ, опухоли головного мозга и ряда других ЗНО, модели лимфоидной ткани, а также смодели-

лировано взаимодействие опухоли и иммунной системы [35].

Несмотря на сложность и высокую стоимость, микрофлюидные системы и «органы-на-чипе» активно внедряют в лабораторную практику для проведения доклинических исследований в онкоиммунологии [35]. Этот подход был использован для оценки эффективности генно-инженерных Т-лимфоцитов на 3D-модели рака печени, рака легкого и рака яичника [36]. В работе С. Frick с соавт. [37] использовали микрофлюидную 3D-модель для оценки миграции ДК в условиях строго контролируемых градиентов хемокинов в режиме реального времени. В исследовании S. Parlato с соавт. [38] с применением данной технологии была изучена не только миграция ДК, но и их взаимодействие с опухолевыми клетками и фагоцитоз.

Таким образом, современные биотехнологические подходы расширяют возможности использования *in vitro* моделей для проведения доклинических исследований иммунотерапевтических подходов в онкологии. Актуальной задачей остается разработка 3D-систем, позволяющих оценить противоопухолевую эффективность ДКВ в условиях, приближенных к условиям в организме человека. Однако, несмотря на успехи моделирования взаимодействий опухоли и иммунной системы *in vitro*, некоторые их аспекты могут быть воспроизведены только *in vivo* с использованием лабораторных животных.

Модели *in vivo*

Большая часть исследований противоопухолевых терапевтических подходов *in vivo* проводится на моделях с использованием мышей, среди которых выделяют автохтонные (спонтанные), канцероген-индуцированные и перевиваемые [39, 40]. Спонтанные опухолевые модели наиболее близко отражают процесс возникновения и развития опухоли у человека [41]. Существуют линии мышей, которые характеризуются высокой частотой спонтанного появления ЗНО, кроме того, в качестве автохтонных опухолевых моделей используются мыши с генетическими изменениями [39]. Однако работа с такими моделями затруднена в связи с длительным латентным периодом и вариабельной скоростью роста опухоли. Применение канцероген-индуцированных опухолевых моделей широко распространено и хорошо описано в литературе. Использование этой модели дает возможность подобрать метод индукции для ЗНО определенного типа и локализации, но не позволяет изучать мета-

стазирование опухоли и требует длительного наблюдения [42].

В доклинической разработке методов иммунотерапии ЗНО широко применяются сингенные перевиваемые мышинные модели благодаря иммуносовместимости трансплантируемых клеток с организмом реципиента. Существенным ограничением их применения являются отличия мышинных опухолевых клеточных линий от опухолевых клеток человека. Так, важной проблемой является статус экспрессии молекул МНС I класса, который необходимо учитывать при разработке иммунотерапевтических подходов. Кроме того, клетки мышинных опухолевых линий не экспрессируют гены опухолей человека и лишены гетерогенности [43]. Таким образом, хотя сингенная модель полезна для проведения доклинических исследований, она часто не отражает характеристики человеческих опухолей *in situ* и не может являться индикатором эффективности терапии у людей [41].

Использование ксенотрансплантации опухолевых клеток человека иммунодефицитным мышам позволяет избежать этих ограничений. Кроме того, в такой гуманизированной модели возможна трансплантация опухолевой ткани, полученной от пациента, с сохранением ее гетерогенности и биологических характеристик [43]. Современные биотехнологические методы позволяют создавать гуманизированные мышинные модели путем ксенотрансплантации как опухолевого, так и иммунного компонента и моделировать взаимодействие ЗНО и иммунной системы человека. Однако такой подход не учитывает комплексного взаимодействия опухоли с иммунной системой и неприменим для изучения ряда иммунотерапевтических методов лечения. Несмотря на указанные недостатки, возможность трансплантации опухолевой ткани пациента с индивидуальным мутационным ландшафтом в частично воспроизведенный компартмент человеческой иммунной системы открывает новые перспективы в изучении факторов, влияющих на эффективность иммунотерапии [41].

Исходя из особенностей клеточных препаратов, к которым относятся ДКВ, и их отличий от классических лекарственных препаратов, релевантными моделями *in vivo* можно считать гуманизированные модели или стратегию «гомологичный препарат», подразумевающую создание лекарственного препарата животного происхождения, аналогичного предназначенному для использования у человека [17, 18].

В работе J. Sprooten с соавт. [44] описано использование различных моделей *in vivo*

для оценки эффективности ДКВ в доклинических исследованиях. Часто для этой цели применялись сингенные модели с получением мышинных ДК и изучением их эффективности против мышинных опухолей. В исследовании S.K. Wculek с соавт. [45] выделяли классические ДК 1 типа из селезенки мышей, нагружали их лизатом опухолевых клеток, оценивали их способность индуцировать CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточный ответ *in vivo* у мышей с перевиваемыми опухолями и обнаружили инфильтрацию опухолевых очагов Т-лимфоцитами и снижение скорости их прогрессирования. В работе S. Pellegatta с соавт. [46] на сингенной модели глиомы также было показано, что введение ДК, нагруженных лизатом клеток глиомы, вызывает измеримый противоопухолевый ответ. Применение сингенной модели глиомы 9L у крыс породы Вистар позволило продемонстрировать, что терапия ДК, нагруженными опухолевым антигеном, приводит к усилению инфильтрации опухоли CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитами и к увеличению выживаемости.

В работе Y. Kametani с соавт. [47] обобщены современные данные об использовании гуманизированных моделей для оценки эффективности различных иммунотерапевтических подходов. В работе P.V. Pham с соавт. [28] использовали линию мышей с иммунодефицитом (NOD/SCID) для получения гуманизированной модели путем трансплантации человеческих гемопоэтических стволовых клеток и последующего введения мышам опухолевых стволовых клеток РМЖ. Вакцина на основе моноклеарных ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток, введенная мышам с последующей оценкой размера опухоли и выживаемости, продемонстрировала противоопухолевую эффективность [28]. В другом исследовании [48] на гуманизированной модели NOD/SCID IL-2Rg^{null} (NSG) мышей, которым трансплантировали человеческие моноклеарные клетки периферической крови, был показан Т-клеточный ответ после введения ДКВ, нагруженной антигеном меланомы MART-1, с использованием метода оценки уровня лизиса опухолевых клеток лимфоцитами *ex vivo*.

Отдельного внимания заслуживает разработка методов визуализации эффекта ДКВ *in vivo*. В работе B. Wang с соавт. [49] рассмотрены подходы к отслеживанию миграции ДКВ в реальном времени на мышинных моделях карциномы с использованием неинвазивных методов, включая ПЭТ и МРТ. Имеются данные о клиническом применении методов визуализации при использовании ДКВ у пациентов с меланомой [50].

Модели *in silico*

Одним из перспективных подходов к разработке противоопухолевой иммунотерапии, включая ДКВ, является моделирование *in silico* с использованием компьютерных технологий [51]. Для оценки эффектов введения ДКВ на мышах была создана математическая модель, которая согласуется с моделью меланомы мыши *in vivo*. На разработанной модели показано значение миграции ДК в лимфатические узлы для реализации противоопухолевого иммунного ответа. L.R. Dickman с соавт. [52] изучили роль временных показателей иммунного ответа на эффективность вакцинации ДК; созданная модель была валидирована *in vivo* на мышах с индуцированной меланомой. В исследовании F. Rappalardo с соавт. [53] была разработана вычислительная модель формирования иммунного ответа на введение ДКВ с учетом роли активированных ЦТЛ и Т-клеток памяти. Выбор молекулярных мишеней для оптимизации вакцинотерапии на основе ДК был проведен X. Lai с соавт. с использованием многоуровневого вычислительного моделирования [54]. Однако следует отметить, что для мишеней, определенных этим методом, требуется дополнительная проверка в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Доклинические исследования являются необходимым этапом разработки лекарственных препаратов на основе соматических клеток, включая иммунотерапевтические клеточные препараты, за которым следует клиническая оценка безопасности и эффективности.

Клинические исследования дендритноклеточных вакцин

К настоящему времени уже накоплен опыт клинического применения ДКВ при различных ЗНО, среди которых меланома, глиомы, саркомы, рак яичников, мочевого пузыря, почки, поджелудочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак предстательной железы (РПЖ), РМЖ, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, острый миелоидный лейкоз, лимфомы и др. [44, 55, 56]. Для большинства опухолей ДКВ изучаются в KI I–II фазы; при РПЖ на настоящий момент завершены исследования III фазы. В нескольких KI III фазы продолжается изучение ДКВ при глиобластоме, увеальной меланоме и меланоме кожи и раке почки [44, 56]. В метаанализе была показана эффективность ДКВ при глиобластоме, однако при впервые диагностированном данном ЗНО эффекта выявлено не было [57]. Согласно результатам метаанализа, проведенного на пациентах с гепатоцеллюлярной карциномой, получивших ДКВ, показано увеличение общей

выживаемости и выживаемости без прогрессирования [58]. По данным метаанализа, включавшего результаты 6 нерандомизированных КИ вакцинотерапии РПЖ, терапевтический эффект ДКВ не выявлен [59]. В большинстве исследований продемонстрирована безопасность вакцинотерапии у онкологических пациентов, а в ряде случаев было показано развитие иммунного ответа после введения ДКВ [58, 59].

Первой ДКВ, одобренной Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA, США), является Sipuleucel-T (Provenge®, Dendreon, США). Вакцина представляет собой аутологичные моноклеарные клетки, включающие АПК (в том числе ДК), нагруженные таргетным антигеном PAP (prostatic acid phosphatase), который считается опухолеспецифическим для опухолевых клеток РПЖ [60]. Были проведены КИ I, II и III фаз, подтверждающие безопасность и эффективность препарата Sipuleucel-T при РПЖ. Применение этой вакцины позволило увеличить общую выживаемость на 4,1 месяца и улучшить трехлетнюю выживаемость на 8,7% у пациентов с кастрационно-резистентным метастатическим РПЖ [61]. Примерами других ДКВ, официально используемых в клинической практике, являются препарат APCEDEN® (APAC Biotech, Индия) для лечения РПЖ, рака яичников, немелкоклеточного рака легких и колоректального рака [62] и препарат CreaVax-RCC (JW CreaGene, Республика Корея) для лечения метастатической карциномы почек. Препарат DCVax®-L (Northwest Biotherapeutics, США) проходит КИ III фазы у пациентов после хирургического удаления глиобластомы в сочетании с лучевой и химиотерапией [63].

Хотя многочисленные КИ продемонстрировали безопасность и иммуногенность ДКВ, их противоопухолевая эффективность была недостаточно высокой [1, 9]. Это может быть связано с недостаточной функциональной активностью ДК, полученных *ex vivo* и входящих в состав вакцин. Поскольку стадии созревания ДК и их нагрузки антигеном *in vivo* не в полной мере воспроизводимы при производстве ДКВ, возможно нарушение функциональных свойств ДК, таких как миграция, презентация антигена и продукция цитокинов [1]. Решением проблемы может быть разработка оптимальных протоколов получения зрелых ДК *ex vivo* и их нагрузки опухолевыми антигенами, обеспечивающих максимальное соответствие ДКВ характеристикам, необходимым для индукции выраженного опухолеспецифического иммунного ответа.

Клинические и доклинические исследования показали, что менее 5% введенных ДК достигают лимфатического узла [1]. Поскольку известно, что миграция ДК в лимфоузлы обусловлена наличием рецептора CCR7, возможным подходом к увеличению эффективности ДКВ является повышение экспрессии этого рецептора путем инкубации с растворимыми факторами или с помощью генно-инженерных конструкций, а также непосредственное воздействие на сигнальные пути, связанные с CCR7 [64]. Другим возможным подходом является введение ДК непосредственно в дренирующий лимфатический узел, так как показано, что при внутривенном введении ДК оседают в легочной ткани, печени, селезенке и не определяются в опухолях и лимфатических узлах [3]. Для повышения эффективности ДКВ обязательным фактором является оптимизация условий созревания клеток, нацеленная на усиление кросс-презентации антигена, увеличение экспрессии костимулирующих молекул и повышение секреции цитокинов для активации Т-лимфоцитов. Возможные стратегии заключаются в подборе растворимых факторов с учетом сигнальных путей, задействованных в созревании ДК, и создании генно-модифицированных ДК с заданными характеристиками [65].

Способность к презентации антигена, миграции и секреции цитокинов различается в зависимости от типа ДК. В связи с этим выбор типа клеток является решающим параметром при разработке ДКВ [1]. Хотя наилучшим кандидатом для иммунотерапии являются классические ДК 1 типа, в настоящее время в большинстве вакцин используются моноцитарные ДК [15]. Результаты исследований показали, что эти клетки обладают ограниченной способностью к кросс-презентации антигенов и миграции в лимфатические узлы. Кроме того, даже если *ex vivo* ДК моноцитарного происхождения приобрели свойства, характерные для классических ДК 2 типа, в иммуносупрессивном микроокружении эти свойства могут быть утрачены [16]. Следует отметить, что для использования в производстве ДКВ классических ДК 1 типа есть существенные ограничения: их содержание в крови составляет менее 1%, при этом данный тип клеток трудно получить методами *ex vivo* таким образом, чтобы сохранился их функциональный фенотип [12].

В исследовании Е. Hlavackova с соавт. [66] было показано, что предшествующее применение некоторых комбинаций противоопухолевых препаратов (темозоломид + иринотекан, пазопаниб + топотекан + циклофосфамид) у пациентов перед отбором клеток негативно влияет

на созревание ДК и снижает их иммуностимулирующие свойства. Помимо изменения характеристик самих ДК, снижение эффективности ДКВ может также объясняться различными паттернами экспрессии антигенов, связанными с гетерогенностью опухоли, недостаточной инфильтрацией опухоли лимфоцитами и формированием различных иммуносупрессивных механизмов [10, 12, 66]. Это свидетельствует о необходимости тщательного подбора пациентов, которым показана иммунотерапия ДКВ, на основании клинических и молекулярных характеристик опухоли, состояния иммунной системы, а также с учетом уже проведенной терапии [3]. Более того, новые данные свидетельствуют о том, что сочетание применения ДКВ с другими методами противоопухолевой терапии может полностью раскрыть потенциал этого направления иммунотерапии и улучшить показатель выживаемости пациентов [44].

Для разработки и повышения эффективности инновационных терапевтических подходов к лечению ЗНО, включая иммунотерапию, необходимо изучение компонентов опухолевого микроокружения и их взаимодействия с малигнизированными клетками. Уникальные клиничко-биологические характеристики каждого ЗНО связаны с особенностями состава и функционирования микроокружения опухоли, что влияет на эффективность противоопухолевого иммунного ответа, ключевую роль в котором играют ДК. Накопленные знания о функциях и механизме действия ДК позволили разработать персонализированные противоопухолевые ДКВ, применение которых в настоящее время активно изучается у пациентов с различными ЗНО.

Нерешенной задачей иммунологических протоколов остается идентификация иммунологических маркеров, которые коррелируют с клинической эффективностью. Тщательный скрининг пациентов и более точная характеристика популяции, участвующей в КИ, необходимы для повышения эффективности исследуемых иммунотерапевтических подходов [19]. Для оценки противоопухолевого иммунитета традиционно используется определение количественного содержания и субпопуляционного состава клеток иммунной системы у онкологических пациентов. Присутствие эффекторных клеток в опухолевом очаге, их локализация и отсутствие иммуносупрессивных клеток связаны с успешной реализацией иммунного ответа [67]. Для обнаружения этих клеточных компонентов в опухоли используют гистологическое окрашивание и иммуногистохимические методы, позволяющие опреде-

лить субпопуляции клеток на основе экспрессии поверхностных маркеров.

Оценка специфического противоопухолевого иммунного ответа предполагает определение поляризации иммунного ответа в составе микроокружения в направлении противоопухолевого фенотипа, что связано с определенным профилем секреции цитокинов. В связи с этим для оценки взаимодействия опухоли и иммунной системы, а также для определения прогноза онкологического заболевания целесообразно определение цитокинового профиля пациентов с использованием проточной цитофлуориметрии (в том числе с применением внутриклеточного окрашивания), ИФА и его модификации ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay), количественной ПЦР, а также мультиплексных иммунологических методов [22, 68]. Определение цитокинового профиля используют для оценки эффективности адаптивной Т-клеточной иммунотерапии, при этом важна роль баланса между IFN- γ и TGF- β [68]. Продукция цитокинов (IFN- γ , Gr- β , IL-4, TNF- α) опухолеспецифическими Т-лимфоцитами в ELISPOT-тесте, визуализация активированных Т-лимфоцитов при помощи проточного цитофлуориметрического анализа с использованием меченого комплекса пептид-МНС, который специфично связывается с Т-клеточным рецептором лимфоцита, и размеры реакции гиперчувствительности замедленного типа далеко не всегда связаны с регрессом опухоли. Отсутствие такой корреляции между иммунологической и клинической эффективностью ДКВ является одной из нерешенных проблем иммунотерапии злокачественных опухолей.

В настоящее время не существует универсальных подходов к тестированию клеточных препаратов на основе аутологичных ДК для обеспечения безопасности и эффективности их применения у онкологических пациентов. Основную сложность с точки зрения разработки клеточного препарата представляет собой обеспечение контроля качества ввиду малого размера серии продукта, а также отсутствия согласованного представления о номенклатуре и допустимых значениях показателей качества. Например, в КИ могут использоваться клеточные препараты, содержащие в одной дозе от $0,3 \times 10^6$ до 200×10^6 клеток [69]. Разработка индивидуального лекарственного препарата на основе соматических клеток потребует подбора эффективной дозы и соответствующего контроля качества данного продукта.

Более того, в Российской Федерации отсутствует нормативный документ, определяющий требования к показателям и методикам оценки

качества лекарственного препарата на основе соматических клеток. Для оценки качества могут быть использованы некоторые общие фармакопейные статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд.¹ и других стран Европейского союза (ЕС)², Японии³, США⁴ и Республики Беларусь⁵ [70]. В рамках Федерального закона Российской Федерации № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»⁶ необходимо обеспечить качество биомедицинского клеточного продукта, разработать нормативную документацию (спецификацию на ДКВ). Требования к качеству на этапе разработки ДКВ будут определяться предполагаемыми клиническими эффектами и показаниями к применению клеточного продукта [10].

Существует перечень показателей качества, которые характерны для всех видов клеточных продуктов. Например, для аутологичной ДКВ на основе раково-тестикулярных антигенов CaTeVac производства ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России основными показателями качества являются следующие: «Идентичность (подлинность)», «Специфическая активность», «Жизнеспособность клеток», «pH», «Стерильность» и др. Показатель «Идентичность (подлинность)» определяется методом проточной цитофлуориметрии по уровню экспрессии костимулирующих молекул (CD14/CD83⁺/CD80⁺/CD86⁺/HLA-DR⁺); по данному показателю ДК должны быть фенотипически зрелыми. Определение показателя «Специфическая активность» проводится по оценке специфичности пролиферации Т-лимфоцитов в присутствии вакцинных ДК. Показатель «Жизнеспособность клеток» определяется методом проточной цитометрии; в препарате должно быть более 70% живых клеток. Определение показателя «pH» проводится потенциометрическим методом; значение должно быть от 5 до 8. По показателю «Стерильность» клеточный препарат должен быть стерильным. Испытания проводят методом прямого посева с использованием только тиаггилевоулевой среды при двух температурных режимах инкубирования 32,5±2,5 °С и 22,5±2,5 °С. Возможно определение бионагрузки с использованием BacT/Alert 3D. Показатель «Микоплазмы» определяют молекулярно-генетическим методом (ПЦР); в препарате микоплазмы должны

отсутствовать. Определение показателя «Бактериальные эндотоксины» проводится с использованием геле-тромб теста (метод А); значение показателя должно быть не более 30 ЕЭ/мл. Все методы оценки качества готового клеточного препарата должны быть научно обоснованы, валидированы и обеспечивать получение достоверных результатов.

Заключение

Проведен анализ современных подходов получения дендритно-клеточных вакцин с заданными характеристиками, оценки качества вакцин, изучения противоопухолевой эффективности клеточного препарата, а также опыта проведения доклинических и клинических исследований.

Показано, что степень зрелости дендритных клеток является ключевой характеристикой противоопухолевой специфической эффективности дендритно-клеточной вакцины, в связи с чем перечень показателей качества готового лекарственного препарата должен содержать в том числе подтверждение данной характеристики.

Среди релевантных моделей изучения противоопухолевой специфической эффективности дендритно-клеточных вакцин *in vitro* широко используются классические 2D-модели, а также существует устойчивый интерес к разработке 3D-моделей, приближенных к условиям организма. При этом модели *in vivo* остаются необходимыми для проверки концепции и установления фармакологической безопасности и изучения биораспределения клеточных препаратов. На этапе проведения клинических исследований актуальной задачей является поиск и валидация иммунологических маркеров, коррелирующих с клинической эффективностью.

В целом изучение мирового опыта проведения доклинических и клинических исследований дендритно-клеточных вакцин в онкологии может быть полезным для обоснования индивидуальных методологических подходов, что будет способствовать повышению качества получаемых в ходе исследований результатов и увеличит вероятность признания результатов научным сообществом и регуляторными органами.

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

² European Pharmacopoeia 10th ed.; 2020.

³ Japanese Pharmacopoeia 17th ed.; 2016.

⁴ USP 42-NF 37; 2019.

⁵ Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд.; 2013.

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

Литература/References

- Swartz AM, Hotchkiss KM, Nair SK, Sampson JH, Batich KA. Generation of tumor targeted dendritic cell vaccines with improved immunogenic and migratory phenotype. In: Thomas S, ed. *Vaccine Design. Methods in Molecular Biology*. Vol. 2410. New York: Humana; 2022. P. 609–27. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1884-4_33
- Нехаева ТЛ, Данилова АБ, Балдуева ИА. Изучение особенностей миграции дендритных клеток в экспериментальной аналитической системе CELL-IQ. *Сибирский онкологический журнал*. 2018;17(4):14–23. Nekhaeva TL, Danilova AB, Baldueva IA. Study of dendritic cell migration using CELL-IQ analysis system. *Siberian Journal of Oncology*. 2018;17(4):14–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2018-17-4-14-23>
- Harari A, Graciotti M, Bassani-Sternberg M, Kandalaft LE. Antitumor dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(9):635–52. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0074-8>
- Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakus M, Bazin H, et al. Murine dendritic cells pulsed *in vitro* with tumor antigen induce tumor resistance *in vivo*. *Eur J Immunol*. 1994;24(3):605–10. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240317>
- Ossevoort MA, Feltkamp MC, van Veen KJ, Melief CJ, Kast WM. Dendritic cells as carriers for a cytotoxic T-lymphocyte epitope-based peptide vaccine in protection against a human papillomavirus type 16-induced tumor. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1995;18(2):86–94. <https://doi.org/10.1097/00002371-199508000-00002>
- Celluzzi CM, Mayordomo JJ, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med*. 1996;183(1):283–7. <https://doi.org/10.1084/jem.183.1.283>
- Нехаева ТЛ, Карпов АЕ, Липиа НП. Поиск иммунотерапевтических мишеней в онкологии при формировании иммунного синапса. *Вопросы онкологии*. 2021;67(3):344–9. Nekhaeva TL, Karpov AE, Lipia NP. Searching for immunotherapeutic targets in oncology during immune synapse formation. *Problems in Oncology*. 2021;67(3):344–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2021-67-3-344-349>
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>
- Vedunova M, Turubanova V, Vershinina O, Savvyuk M, Efimova I, Mishchenko T, et al. DC vaccines loaded with glioma cells killed by photodynamic therapy induce Th17 anti-tumor immunity and provide a four-gene signature for glioma prognosis. *Cell Death Dis*. 2022;13:1062. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05514-0>
- Chiang CL, Balint K, Coukos G, Kandalaft LE. Potential approaches for more successful dendritic cell-based immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(4):569–82. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1000298>
- Моисеенко ВМ, Балдуева ИА, Гельфонд МЛ, Орлова РВ, Фахрутдинова ОЛ, Данилова АБ и др. Способ иммунотерапии костно-мозговыми предшественниками дендритных клеток, сенсibilizированных фотомодифицированными опухолевыми клетками *in vivo*, больных диссеминированными солидными опухолями. Патент Российской Федерации № 2376033; 2009. Moiseenko VM, Baldueva IA, Gelfond ML, Orlova RM, Fahrutdinova OL, Danilova AB, et al. Method of immunotherapy with bone-marrow precursors of dendrite cells, sensibilised with photomodified tumor cells *in vivo*, for patients disseminated with solid tumors. Patent of the Russian Federation No. 2376033; 2009 (In Russ.).
- Godoy-Tena G, Ballestar E. Epigenetics of dendritic cells in tumor immunology. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1179. <https://doi.org/10.3390/cancers14051179>
- Fu C, Zhou L, Mi QS, Jiang A. Plasmacytoid dendritic cells and cancer immunotherapy. *Cells*. 2022;11(2):222. <https://doi.org/10.3390/cells11020222>
- Murphy TL, Murphy KM. Dendritic cells in cancer immunology. *Cell Mol Immunol*. 2022;19(1):3–13. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00741-5>
- Gardner A, de Mingo Pulido A, Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front Immunol*. 2020;11:924. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00924>
- Noubade R, Majri-Morrison S, Tarbell KV. Beyond cDC1: Emerging roles of DC crosstalk in cancer immunity. *Front Immunol*. 2019;10:1014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01014>
- Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Чапленко АА, Меркулов ВА. Дизайн доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов: особенности, ключевые принципы и требования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(3):133–44. Melnikova EV, Merkulova OV, Chaplenko AA, Merkulov VA. Design of preclinical studies of biomedical cell products: characteristics, key principles and requirements. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(3):133–44 (In Russ.).
- Тихомирова АВ, Горячев ДВ, Меркулов ВА, Лысикова ИВ, Губенко АИ, Зебрев АИ и др. Доклинические и клинические аспекты разработки биомедицинских клеточных продуктов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(1):23–35. Tikhomirova AV, Goryachev DV, Merkulov VA, Lysikova IV, Gubenko AI, Zebrev AI, et al. Preclinical and clinical aspects of the development of biomedical cell products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(1):23–35 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-1-23-35>
- Seyhan AA. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. *Transl Med Commun*. 2019;4(1):18. <https://doi.org/10.1186/s41231-019-0050-7>
- Avdonkina NA, Danilova AB, Misyrin VA, Prosekina EA, Girdyuk DV, Emelyanova NV, et al. Biological features of tissue and bone sarcomas investigated using an *in vitro* model of clonal selection. *Pathol Res Pract*. 2021;217:153214. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153214>
- Shankar G, Bader R, Lodge PA. The COSTIM bioassay: a novel potency test for dendritic cells. *J Immunol Methods*. 2004;285(2):293–9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2003.12.008>
- Lamano JB, Ampie L, Choy W, Kesavabhotla K, DiDomenico JD, Oyon DE, et al. Immunomonitoring in glioma immunotherapy: current status and future perspectives. *J Neurooncol*. 2016;127(1):1–13. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-2018-4>
- Cassiooli C, Baldari CT. The expanding arsenal of cytotoxic T cells. *Front Immunol*. 2022;13:883010. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.883010>
- Richter M, Piwocka O, Musielak M, Piotrowski I, Suchorska WM, Trzeciak T. From donor to the lab: a fascinating journey of primary cell lines. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:711381. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711381>
- Miserocchi G, Mercatali L, Liverani C, De Vita A, Spadazzi C, Pieri F, et al. Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *J Transl Med*. 2017;15(1):229. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1328-z>
- Colella G, Fazioli F, Gallo M, De Chiara A, Apice G, Ruosi C, et al. Sarcoma spheroids and organoids – promising tools in the era of personalized medicine. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):615. <https://doi.org/10.3390/ijms19020615>
- Данилова АБ, Нехаева ТЛ, Авдонкина НА, Просекина ЕА, Блохина МЛ, Емельянова НВ и др. Банк клеточных линий солидных опухолей однократно пролеченных пациентов как основа клеточного моделирования в онкологии. *Материалы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020»*. СПб: Вопросы онкологии; 2020. С. 136. Danilova AB, Nekhaeva TL, Avdonkina NA, Prosekina EA, Blokhina ML, Emelyanova NV, et al. The bank of cell lines of solid tumors of similarly treated patients as the basis of cell modeling in oncology. *Materials of the VI St. Petersburg International Oncology Forum “White Nights 2020”*. St. Petersburg: Issues of Oncology; 2020. P. 136 (In Russ.).

28. Pham PV, Le HT, Vu BT, Pham VQ, Le PM, Phan NL, et al. Targeting breast cancer stem cells by dendritic cell vaccination in humanized mice with breast tumor: preliminary results. *Onco Targets Ther.* 2016;9:4441–51. <https://doi.org/10.2147/ott.s105239>
29. Paradiso F, Serpelloni S, Francis LW, Taraballi F. Mechanical studies of the third dimension in cancer: From 2D to 3D model. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):10098. <https://doi.org/10.3390/ijms221810098>
30. Courau T, Bonnereau J, Chicoteau J, Bottois H, Remark R, Assante Miranda L, et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):74. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0553-9>
31. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreessen R, et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006;107(5):2013–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1795>
32. Ertman N, Peters C, Lakbir D, Bünemann E, Börger V, Sabel MC, et al. Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids *in vitro*. *Br J Cancer.* 2011;105(7):961–9. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.327>
33. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of tumor-reactive T Cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell.* 2018;174(6):1586–98.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.009>
34. Zhuang P, Chiang YH, Fernanda MS, He M. Using spheroids as building blocks towards 3D bioprinting of tumor microenvironment. *Int J Bioprint.* 2021;7(4):444. <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i4.444>
35. Maharjan S, Cecen B, Zhang YS. 3D immunocompetent organ-on-a-chip models. *Small Methods.* 2020;4(9):2000235. <https://doi.org/10.1002/smt.202000235>
36. Ando Y, Siegler EL, Ta HP, Cinay GE, Zhou H, Gorrell KA, et al. Evaluating CAR-T cell therapy in a hypoxic 3D tumor model. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(5):e1900001. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900001>
37. Frick C, Dettinger P, Renkawitz J, Jauch A, Berger CT, Reher M, et al. Nano-scale microfluidics to study 3D chemotaxis at the single cell level. *PLoS One.* 2018;13(6):e0198330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198330>
38. Parlato S, De Ninno A, Molfetta R, Toschi E, Salerno D, Mencattini A, et al. 3D microfluidic model for evaluating immunotherapy efficacy by tracking dendritic cell behaviour toward tumor cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):1093. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01013-x>
39. Нехаева ТЛ, Чернов АН, Торопова ЯГ, Галагудза ММ, Балдueva ИА. Разнообразие опухолевых моделей для тестирования противоопухолевой активности веществ у мышей. *Вопросы онкологии.* 2020;66(4):353–63. Nekhaeva TL, Chernov AN, Tоропова YaG, Galagudza MM, Baldueva IA. Variety of tumor models for testing antitumor treatment activity of substances in mice. *Problems in Oncology.* 2020;66(4):353–63 (In Russ.).
40. Hardee S, Prasad ML, Hui P, Dinan CA, Morotti RA. Pathologic characteristics, natural history, and prognostic implications of BRAF^{V600E} mutation in pediatric papillary thyroid carcinoma. *Pediatr Dev Pathol.* 2017;20(3):206–12. <https://doi.org/10.1177/1093526616689628>
41. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541–50. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>
42. Kemp CJ. Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015;2015(10):865–74. <https://doi.org/10.1101/pdb.top069906>
43. Saito K, Kobayashi T, Kashima S, Matsumoto K, Ogawa O. Faithful preclinical mouse models for better translation to bedside in the field of immuno-oncology. *Int J Clin Oncol.* 2020;25(5):831–41. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01520-z>
44. Sprooten J, Ceusters J, Coosemans A, Agostinis P, De Vleeschouwer S, Zitvogel L, et al. Trial watch: dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2019;8(11):e1638212. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2019.1638212>
45. Wculek SK, Amores-Iniesta J, Conde-Garrosa R, Khouili SC, Melero I, Sancho D. Effective cancer immunotherapy by natural mouse conventional type-1 dendritic cells bearing dead tumor antigen. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):100. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0565-5>
46. Pellegatta S, Poliani PL, Corno D, Menghi F, Ghielmetti F, Suarez-Merino B, et al. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res.* 2006;66(21):10247–52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-2048>
47. Kametani Y, Ohno Y, Ohshima S, Tsuda B, Yasuda A, Seki T, et al. Humanized mice as an effective evaluation system for peptide vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6337. <https://doi.org/10.3390/ijms20246337>
48. Spranger S, Frankenberger B, Schendel DJ. NOD/scid IL-2Rg(null) mice: a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies *in vivo*. *J Transl Med.* 2012;10:30. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-30>
49. Wang B, Sun C, Wang S, Shang N, Fignini M, Ma Q, et al. Image-guided dendritic cell-based vaccine immunotherapy in murine carcinoma models. *Am J Transl Res.* 2017;9(10):4564–73. PMID: 29118918
50. Mayer AT, Gambhir SS. The immunoimaging toolbox. *J Nucl Med.* 2018;59(8):1174–82. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.185967>
51. Новик АВ, Гирдюк ДВ, Нехаева ТЛ, Емельянова НВ, Ефремова НА, Латипова ДХ и др. Модель прогнозирования прогрессирования солидной опухоли на фоне лекарственной терапии с применением методов искусственного интеллекта. *Эффективная фармакотерапия.* 2022;18(21):6–13. Novik AV, Girdyuk DV, Nekhaeva TL, Emelyanova NV, Efremova NA, Latipova DKh, et al. Progression prediction model of a solid tumor against the background of drug therapy using artificial intelligence methods. *Effective Pharmacotherapy.* 2022;18(21):6–13 (In Russ.).
52. Dickman LR, Kuang Y. Analysis of tumor-immune dynamics in a delayed dendritic cell therapy model. *Chaos.* 2020;30(11):113108. <https://doi.org/10.1063/5.0006567>
53. Pappalardo F, Pennisi M, Ricupito A, Topputo F, Bellone M. Induction of T-cell memory by a dendritic cell vaccine: a computational model. *Bioinformatics.* 2014;30(13):1884–91. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu059>
54. Lai X, Keller C, Santos G, Schaft N, Dörrie J, Vera J. Multi-level computational modeling of anti-cancer dendritic cell vaccination utilized to select molecular targets for therapy optimization. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9:746359. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.746359>
55. Meng X, Sun X, Liu Z, He Y. A novel era of cancer/testis antigen in cancer immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2021;98:107889. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107889>
56. Yu J, Sun H, Cao W, Song Y, Jiang Z. Research progress on dendritic cell vaccines in cancer immunotherapy. *Exp Hematol Oncol.* 2022;11(1):3. <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00257-2>
57. Liu Z, Gao C, Tian J, Ma T, Cao X, Li A. The efficacy of dendritic cell vaccine for newly diagnosed glioblastoma: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Neurosurgery.* 2021;67(5):433–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2021.04.011>
58. Chen C, Ma YH, Zhang YT, Zhang F, Zhou N, Wang X, et al. Effect of dendritic cell-based immunotherapy on hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy.* 2018;20(8):975–89. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.06.002>
59. Mohammadzadeh M, Shirmohammadi M, Ghojzadeh M, Nikniaz L, Raeisi M, Aghdas SAM. Dendritic cells pulsed with prostate-specific membrane antigen in metastatic

- castration-resistant prostate cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Int.* 2018;6(4):119–25. <https://doi.org/10.1016/j.pnrl.2018.04.001>
60. Handy CE, Antonarakis ES. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. *Future Oncol.* 2018;14(10):907–17. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0531>
 61. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penz DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(5):411–22. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1001294>
 62. Kumar C, Kohli S, Chiliveru S, Bapsy PP, Jain M, Suresh Atti VS, et al. A retrospective analysis comparing APCEDEN® dendritic cell immunotherapy with best supportive care in refractory cancer. *Immunotherapy.* 2017;9(11):889–97. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0064>
 63. Liao LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, et al. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J Transl Med.* 2018;16(1):142. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1507-6>
 64. Hong W, Yang B, He Q, Wang J, Weng Q. New insights of CCR7 signaling in dendritic cell migration and inflammatory diseases. *Front Pharmacol.* 2022;13:841687. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.841687>
 65. Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2019;10(1):5408. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13368-y>
 66. Hlavackova E, Pilatova K, Cerna D, Selingerova I, Mudry P, Mazanek P, et al. Dendritic cell-based immunotherapy in advanced sarcoma and neuroblastoma pediatric patients: anti-cancer treatment preceding monocyte harvest impairs the immunostimulatory and antigen-presenting behavior of DCs and manufacturing process outcome. *Front Oncol.* 2019;9:1034. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01034>
 67. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(12):717–34. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101>
 68. Ramesh P, Shivde R, Jaishankar D, Saleiro D, Le Poole IC. A palette of cytokines to measure anti-tumor efficacy of T cell-based therapeutics. *Cancers (Basel).* 2021;13(4):821. <https://doi.org/10.3390/cancers13040821>
 69. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* 2017;27(1):74–95. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.157>
 70. Водякова МА, Сайфутдинова АР, Мельникова ЕВ, Олфир ЮВ. Сравнение требований фармакопей мира к качеству клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):159–73. Vodyakova MA, Sayfutdinova AR, Melnikova EV, Olefir YuV. Comparison of the world pharmacopoeias' requirements for the quality of cell lines. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020;20(3):159–73 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-159-173>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Т.Л. Нехаева** — идея, концепция, анализ и обобщение результатов мирового опыта по проведению доклинических и клинических исследований дендритно-клеточных вакцин в онкологии; **А.А. Камалетдинова** — критический анализ работы и редактирование текста рукописи; **М.Ф. Лутфуллин** — поиск литературных источников, анализ литературных данных, написание текста рукописи; **Т.В. Табанская** — обзор литературы, отбор публикаций, написание текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках научного проекта РНФ № 22-25-00723 по проведению фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований.

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **T.L. Nekhaeva** elaborated the study idea and concept, analysed and summarised international experience of non-clinical and clinical studies of dendritic cell vaccines in oncology. **A.A. Kamaletdinova** critically analysed the work and edited the manuscript. **M.F. Lutfullin** searched and analysed literature, drafted the manuscript. **T.V. Tabanskaya** reviewed literature, selected publications for the study, and drafted the manuscript.

Acknowledgements. The study was carried out as part of research project No. 22-25-00723 of the Russian Science Foundation (RSF) aimed at basic scientific research and exploratory scientific research.

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

Об авторах / Authors

Нехаева Татьяна Леонидовна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7826-4861>
nehaevat151274@mail.ru

Камалетдинова Айсылу Абраровна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0807-6953>
KamaletdinovaAA@minzdrav.gov.ru

Лутфуллин Марсель Фанисович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1484-6587>
LutfullinMF@minzdrav.gov.ru

Табанская Татьяна Валерьевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7965-6050>
TabanskayaTV@minzdrav.gov.ru

Tatiana L. Nekhaeva, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7826-4861>
nehaevat151274@mail.ru

Aisylu A. Kamaletdinova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0807-6953>
KamaletdinovaAA@minzdrav.gov.ru

Marsel F. Lutfullin
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1484-6587>
LutfullinMF@minzdrav.gov.ru

Tatiana V. Tabanskaya
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7965-6050>
TabanskayaTV@minzdrav.gov.ru

Поступила 18.11.2022

После доработки 24.04.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Received 18 November 2022

Revised 24 April 2023

Accepted 7 June 2023



Организационно-методические проблемы производства CAR-T в Российской Федерации

М.Ю. Дроков[✉], Т.В. Гапонова, Т.Ю. Губенко, О.С. Караваева, М.А. Теляшов,
А.С. Антимонов, В.В. Зубков, Е.Н. Паровичникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский
исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Новый Зыковский проезд, д. 4, Москва, 125167, Российская Федерация

✉ Дроков Михаил Юрьевич; drokov.m@blood.ru

Резюме

Несмотря на широкое внедрение в клиническую практику терапии Т-клетками с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T), на территории Российской Федерации данные препараты до сих пор официально не представлены и не используются, в том числе и произведенные промышленным (индустриальным) способом.

Цель работы — описание текущих проблем, связанных с особенностями производства CAR-T в Российской Федерации, и потенциальных путей их решения.

Рассмотрены трудности, связанные с регуляторными, юридическими и организационно-методическими аспектами производства CAR-T. Проанализированы расхождения в трактовке понятия CAR-T в национальном и наднациональном праве: как биомедицинского клеточного продукта согласно Федеральному закону от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» и как высокотехнологического лекарственного препарата (ВТЛП) согласно Решению Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Подробно рассмотрены трудности на этапе получения исходного биологического материала (невозможность рассматривать пациента как донора биологического материала); на этапе передачи биологического материала для производства CAR-T (невозможность применения национального права); особенности экспорта биологического материала. По мнению авторов статьи, CAR-T следует относить к ВТЛП, активной фармацевтической субстанцией (АФС) которых являются генетически модифицированные аутологичные лимфоциты, а последние должны быть определены как «исходный материал», и к ним должны применяться требования как к исходному материалу для производства АФС, указанные в Решении Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Сделано заключение о необходимости гармонизации национального и наднационального права, что требует формирования экспертных групп, объединяющих врачей-клиницистов, специалистов в области права, представителей профильных ведомств и фармацевтической индустрии.

Ключевые слова: CAR-T клеточная терапия; организационно-методические особенности производства CAR-T; Федеральный закон № 180-ФЗ; Решение Совета ЕЭК № 78; исходный материал; индустриальные CAR-T; биологический материал для производства CAR-T

Для цитирования: Дроков М.Ю., Гапонова Т.В., Губенко Т.Ю., Караваева О.С., Теляшов М.А., Антимонов А.С., Зубков В.В., Паровичникова Е.Н. Организационно-методические проблемы производства CAR-T в Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):162–172. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-162-172>

Organisational and methodological challenges of CAR-T manufacturing in the Russian Federation

M.Y. Drokov✉, T.V. Gaponova, T.Y. Gubenko, O.S. Karavaeva, M.A. Telyashov, A.S. Antimonov, V.V. Zubkov, E.N. Parovichnikova

National Medical Research Center for Hematology, 4 Novy Zhykovsky Dr., Moscow 127167, Russian Federation

✉ Mikhail Y. Drokov; drokov.m@blood.ru

Abstract

Despite their widespread clinical implementation, chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy products, including those manufactured by industrial processes, are still not legally available or used in the Russian Federation.

The aim of the study was to describe the current challenges associated with specific aspects of CAR-T manufacturing in the Russian Federation and the potential ways to overcome them. This article discusses the regulatory, legal, organisational, and methodological challenges of CAR-T manufacturing. It analyses differences in the interpretation of CAR-T therapy products under national and supranational law. According to Russian Federal Law No. 180-FZ “On Biomedical Cell Products” of 23 June 2016, CAR-T therapy products are considered biomedical cell products. However, according to Decision No. 78 of the Council of the Eurasian Economic Commission “On the Rules of Marketing Authorisation and Assessment of Medicinal Products for Human Use” of 3 November 2016, CAR-T therapy products are considered advanced therapy medicinal products (ATMPs). This article provides a detailed overview of the difficulties in obtaining starting biological materials (i.e. the inability to consider the patient as a donor) and transferring the materials for CAR-T manufacturing (i.e. the inapplicability of national law). In addition, this article describes export aspects specific to biological materials. The authors reckon that CAR-T therapy products should be categorised as ATMPs and that the corresponding active pharmaceutical ingredients, genetically modified autologous lymphocytes, should be defined as starting materials. Therefore, genetically modified autologous lymphocytes should be regulated under the requirements for starting materials for the manufacturing of active pharmaceutical ingredients that are set forth in Decision No. 77 of the Council of the Eurasian Economic Commission “On the Adoption of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union” of 3 November 2016. In conclusion, the authors recognise the need for national and supranational law harmonisation. For this task, it is necessary to establish expert groups that will include clinicians, legal experts, and representatives from the relevant authorities and the pharmaceutical industry.

Key words:

CAR-T cell therapy; organisational and methodological aspects of CAR-T manufacturing; Federal Law No. 180-FZ; Decision No. 78 of Eurasian Economic Commission; starting material; industrial CAR-T; biological material for CAR-T manufacturing

For citation:

Drokov M.Y., Gaponova T.V., Gubenko T.Y., Karavaeva O.S., Telyashov M.A., Antimonov A.S., Zubkov V.V., Parovichnikova E.N. Organisational and methodological challenges of CAR-T manufacturing in the Russian Federation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):162–172. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-162-172>

Введение

Несмотря на развитие фармацевтической промышленности и внедрение в практику новых лекарственных средств, в настоящее время применение химиотерапевтических препаратов позволяет достичь ремиссии при рецидивах и/или резистентном течении гемобластозов лишь в небольшом проценте случаев [1–3]. Внедрение в клиническую практику Т-клеток с химер-

ным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) открывает новые возможности в терапии, однако также связано с рядом организационных проблем, которые необходимо решить до того, как данная терапия войдет в широкую клиническую практику.

Препараты CAR-T условно классифицируются по месту их производства на производимые в клинике («академические») и индустриально

производимые («индустриальные»). Понятие «академические» включает CAR-T, которые были произведены в том же клиническом центре, где запланировано их применение, что отчасти упрощает ряд моментов, связанных с внутренним финансированием и перемещением биоматериала. В свою очередь, «индустриальные» CAR-T после стадии забора лимфоцитов отправляют на производство, где препарат централизованно получают с использованием мощностей, принадлежащих фармацевтическим компаниям, что ассоциировано с более высокой стоимостью, которая рассчитывается, исходя из затрат, связанных с разработкой, исследованиями, производством и поддержанием всех процессов производственного цикла.

Для «академических» и «индустриальных» CAR-T в настоящее время в Российской Федерации отсутствует нормативно-правовая база, которая бы полностью регулировала эти процессы. На сегодняшний день профильные ведомства предпринимают шаги для формирования такой базы, однако в этом вопросе им требуется поддержка экспертного сообщества.

Цель работы — описание текущих проблем, связанных с особенностями производства CAR-T в Российской Федерации, и потенциальных путей их решения.

Основные организационно-методические трудности, связанные с производством и применением «индустриальных» CAR-T в Российской Федерации

В настоящее время к основным организационно-методическим проблемам, связанным с производством и применением «индустриальных» CAR-T в России, можно отнести следующие.

- Наличие двух действующих законодательных актов, которые регулируют данный аспект: Федеральный закон от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»¹ (далее — Федеральный закон № 180-ФЗ) и Решение Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»² (далее — Решение Совета ЕЭК № 78). Отсутствие юридического статуса, а именно не ясна трактовка CAR-T — это биомедицинский кле-

точный продукт (БМКП) (Федеральный закон № 180-ФЗ) или же высокотехнологический лекарственный препарат (ВТЛП) (Решение Совета ЕЭК № 78).

- Отсутствие четкой роли в правовом поле клинического центра в участии в производстве «индустриальных» CAR-T.
- Отсутствие нормативной базы, механизмов и процедур передачи биологического материала, полученного клиническим центром с целью последующего производства CAR-T (прежде всего это касается передачи компании-производителю и экспорта из Российской Федерации).
- Отсутствие четкого порядка проведения закупок ВТЛП в соответствии с Федеральным законом от 05.04.2013 № 44-ФЗ «О контрактной системе в сфере закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд»³ с учетом особенностей производства и поставки, отсутствие нормативно-правовой базы для соглашений о разделении рисков при неэффективности такого рода препаратов.

В 2016 г. был принят Федеральный закон № 180-ФЗ, который регулирует работу с БМКП: разработку, доклинические и клинические исследования, экспертизу, государственную регистрацию, производство, контроль качества, реализацию, применение, хранение и транспортировку, в том числе экспорт и импорт, а также отношения, возникающие в связи с донорством биологического материала для производства БМКП⁴. Согласно определению, данному в статье 2 Федерального закона № 180-ФЗ, БМКП — это «комплекс, состоящий из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ либо из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ в сочетании с прошедшими государственную регистрацию лекарственными препаратами для медицинского применения, и (или) фармацевтическими субстанциями, включенными в государственный реестр лекарственных средств, и (или) медицинскими изделиями»⁵. Таким образом, CAR-T с момента начала действия закона (с 2016 г.) могли быть зарегистрированы как БМКП и напрямую подпадали под действие этого закона. Несмотря на этот факт, за истекшее время, с 2016 по 2023 гг.,

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

² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

³ Федеральный закон от 05.04.2013 № 44-ФЗ «О контрактной системе в сфере закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд».

⁴ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

⁵ Там же.

по данным официального сайта Росздравнадзора не было зарегистрировано ни одного БМКП CAR-T в Российской Федерации, что связано с высокими требованиями, предъявляемыми как к производству, так и к регистрации данных категорий продуктов.

В 2016 г. в рамках работы Евразийского экономического союза (ЕАЭС) было утверждено Решение Совета ЕЭК № 78⁶, в рамках которого введено понятие «высокотехнологические лекарственные препараты», к которым относятся генотерапевтические лекарственные препараты и лекарственные препараты на основе соматических клеток; последние в случае генетически модифицированных клеток, включая CAR-T, отнесены к генотерапевтическим лекарственным препаратам. Согласно «Договору о Евразийском экономическом союзе»⁷ в полномочия комиссии входит множество сфер, в том числе таможенное регулирование. В рамках полномочий ЕАЭС и ЕЭК был преимущественно определен порядок регистрации данных препаратов на территории ЕАЭС.

В это же время вопросы, касающиеся обращения, условий и порядка применения данного вида препаратов, должны быть регламентированы национальным законодательством каждой из стран – участниц ЕАЭС. Соответственно, в Российской Федерации все лекарственные препараты, в том числе зарегистрированные по процедуре ЕАЭС как «высокотехнологические лекарственные препараты», должны регулироваться единственным Федеральным законом № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»⁸ (далее – Федеральный закон № 61-ФЗ), поскольку иначе возникает юридическая коллизия: в наднациональном праве (Решение Совета ЕЭК № 78⁹) есть определение данного вида препаратов, а в национальном праве (Федеральный закон № 61-ФЗ) такого определения нет. Таким образом, с точки зрения авторов статьи представляется целесообразным исправление, прежде всего, этой коллизии и, соответственно, гармонизация национального и наднационального законодательства.

Процессы, непосредственно связанные с производством CAR-T

Процесс производства «индустриальных» CAR-T-клеток состоит из нескольких этапов [4, 5]. В большинстве имеющихся публикаций делается акцент лишь на производственных этапах

этого процесса, а именно на генетической модификации лимфоцитов. Однако в понимании авторов данной статьи производство включает и организационные этапы, а именно:

- порядок отбора пациентов и схема их маршрутизации для заготовки биоматериала, определение источников финансирования;
- заключение договоров, связанных с процессом производства CAR-T;
- заготовка аутологичных лимфоцитов крови методом лейкофереза (получение биологического материала для производства CAR-T продукта);
- контроль качества полученного продукта лейкофереза на его соответствие стандартам качества, предъявляемым при производстве конкретного CAR-T продукта;
- экспорт биоматериала из Российской Федерации для дальнейшего производства;
- производство препарата CAR-T, включающее генетическую модификацию клеток пациента;
- импорт препарата CAR-T (ВТЛП) и поставка напрямую в клинику, минуя склад поставщика, для ускорения процесса получения терапии пациентом.

Учитывая клинические особенности, связанные с применением CAR-T, а именно потребности в заготовке аутологичных клеток, синхронизации времени проведения химиотерапии пациенту, процессов доставки и др., вопросы, связанные с организацией данного процесса, отошли на второй план. Одним из главных вопросов обращения исходного биологического материала для производства CAR-T являются правовые основания для их передачи (безвозмездной передачи или продажи). При написании данной статьи были проанализированы уставы двух крупных медицинских центров в Российской Федерации: ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России и установлено присутствие в уставах этих организаций понятия фармацевтической деятельности для обеспечения лечебно-диагностического процесса. Так, в перечне выполняемых работ и оказываемых услуг, которые составляют фармацевтическую деятельность, одним из пунктов является изготовление лекарственных препаратов для медицинского применения. Таким образом, центры формально имеют право изготавливать лекарственные препараты, но не могут осуществлять их продажу.

⁶ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

⁷ Договор о Евразийском экономическом союзе (подписан в г. Астане 29.05.2014).

⁸ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

⁹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Отдельно стоит рассмотреть термин «изготовление». Согласно Приказу Минздрава России от 26.10.2015 № 751н «Об утверждении правил изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность»¹⁰ под изготовлением понимают лишь те процессы, которые в своей основе используют фармацевтические субстанции, включенные в государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения. Таким образом, получение исходного биологического материала для производства CAR-T не будет подпадать под определение «изготовление» и, соответственно, такая деятельность потребует предварительного внесения изменений в устав. Однако в настоящее время даже специалисты юридической службы испытывают затруднения с формулировками поправок, которые необходимо будет внести в устав, что, прежде всего, связано с отсутствием консолидированной позиции по этому вопросу как между медицинскими центрами, так и между медицинскими центрами и регуляторными органами.

Получение исходного биологического материала для производства CAR-T

В настоящее время заготовка аутологичных лимфоцитов (не только для нужд производства CAR-T) происходит в отделениях забора гемопоэтических стволовых клеток или в аналогичных структурах. Также в число функций данных подразделений входят: выделение фракции донорских лимфоцитов, криоконсервация полученных клеток, транспортировка между медицинскими организациями. Однако данные функции они выполняют лишь в рамках правового регулирования порядка трансплантации¹¹.

В свою очередь, возможен вариант проведения донаций лимфоцитов через отделения переливания крови, однако пациент в данном случае должен выступать в роли донора, что невозможно по ряду причин. Согласно Федеральному закону от 20.07.2012 № 125-ФЗ «О донорстве крови и ее компонентов» (далее – Федеральный закон

№ 125-ФЗ) донор обязан предоставить информацию о состоянии своего здоровья для выполнения донорской функции¹². В случае выявления факторов риска заражения гемотрансмиссивными инфекционными заболеваниями (при физикальном обследовании донора, сборе медицинского анамнеза, в том числе из данных анкеты, при оценке общего состояния здоровья и связанного с ним образа жизни, а также по результатам лабораторных исследований периферической крови перед донацией) донор отводится от донации. Даже в том случае, если донор рассматривается как аутологичный и медицинское обследование для него не является обязательным, то для проведения донации, согласно действующему законодательству, ему потребуется заполнить анкету для внесения личных данных в базу Службы крови. В этом случае факт заполнения анкеты с указанием наличия в анамнезе онкологического заболевания и случаев переливания компонентов крови в течение предшествующих 120 дней исключает пациента из списка доноров и делает невозможным внесение его в донорскую базу Службы крови даже при наличии удовлетворительных показателей гемограммы.

Отдельно стоит отметить, что, согласно законодательству, лимфоциты не входят в перечень компонентов донорской крови, указанных в Постановлении Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 № 797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации»¹³.

Другая проблема связана с экспортом полученного биологического материала. Так, согласно Федеральному закону № 125-ФЗ ввоз на территорию Российской Федерации и вывоз за пределы территории Российской Федерации донорской крови и (или) ее компонентов допускаются лишь по решению Правительства Российской Федерации при оказании гуманитарной помощи. Продажа же донорской крови и (или) ее компонентов, полученных на территории Российской Федерации, в другие государства запрещается.

¹⁰ Приказ Минздрава России от 26.10.2015 № 751н «Об утверждении правил изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность».

¹¹ Приказ Минздрава России от 12.12.2018 № 875н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи при заболеваниях (состояниях), для лечения которых применяется трансплантация (пересадка) костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток и внесении изменения в Порядок оказания медицинской помощи по профилю «хирургия (трансплантация органов и (или) тканей человека)», утвержденный приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31.10.2012 № 567н.

¹² Федеральный закон от 20.07.2012 № 125-ФЗ «О донорстве крови и ее компонентов».

¹³ Постановление Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 № 797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации».

ется. Таким образом, передача в другую страну лимфоцитов для производства CAR-T невозможна при трактовке данного биоматериала как донорского компонента крови, а отсутствие производственных мощностей делает невозможным создание CAR-T на территории России. Также при рассмотрении данного биоматериала в качестве компонента донорской крови невозможно применение Федерального закона № 125-ФЗ для лиц младше 18 лет, так как по определению статьи 12: «донор — это лицо, достигшее возраста восемнадцати лет»¹⁴, поэтому, в соответствии с вышесказанным, полностью исключается возможность производства аутологичных ВТЛП от любых лиц младше 18 лет независимо от их медицинского статуса и показаний.

Однако, несмотря на все вышеперечисленные ограничения, все-таки существует возможность продажи и экспорта крови и/или ее отдельных компонентов. Согласно общероссийскому классификатору продукции по видам экономической деятельности (ОКПД) кровь и ее компоненты идентифицируются как фармацевтическая субстанция (код 21.10.60.192). По определению Федерального закона № 61-ФЗ фармацевтическая субстанция — это «лекарственное средство в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность»¹⁵. В ОКПД ей соответствует код 21.10.60.192, то есть подкласс «Субстанции фармацевтические». При анализе сайта единой информационной системы в сфере закупок именно с этим кодом производится продажа крови в пределах территории Российской Федерации¹⁶. Таким образом, материал для производства CAR-T может быть трактован как фармацевтическая субстанция, и в связи с этим к нему должны быть применены правила надлежащей производственной практики ЕАЭС¹⁷. Однако, если мы рассмотрим рутинную практику, при регистрации лекарственных препаратов и субстанций предметом регистрации всегда выступает актив-

ная фармацевтическая субстанция (АФС)¹⁸. АФС, согласно Решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза»¹⁹ (далее — Решение Совета ЕЭК № 77) — это вещество или смесь веществ, используемые в производстве лекарственного препарата, которые в процессе производства становятся его активным ингредиентом (действующим веществом). Такие вещества обладают фармакологическим или другим непосредственным действием и предназначены для лечения, диагностики или профилактики заболеваний, ухода, обработки и облегчения симптомов, оказывают влияние на структуры или физиологические функции организма. Именно АФС включается в реестр зарегистрированных субстанций, и требования по регистрации в данном случае не распространяются на ее предшественников, что также подтверждается и Решением Совета ЕЭК № 77.

Обращают на себя внимание положения части II Правил к производству АФС²⁰, в которых процессы, связанные со сбором органов, жидкостей или тканей, а также их обработка не подпадают под действие правил надлежащей производственной практики, а сами клетки в данном случае соответствуют понятию «исходные материалы». Исходные материалы (starting materials) — это все материалы, из которых АФС производится или экстрагируется. «Для биологических лекарственных препаратов исходные материалы представляют собой любые субстанции биологического происхождения, такие как микроорганизмы, органы и ткани растительного или животного происхождения, клетки или жидкости (включая кровь и плазму) человеческого или животного происхождения, а также биотехнологические клеточные субстраты (рекомбинантные и природные), включая первичные клетки»²¹. Таким образом, регламентация требований к лимфоцитам должна осуществляться как в соответствии с Решением Совета ЕЭК № 77²² так и с требованиями, предъявляемыми к исходным материалам: «Требования к качеству исходных материалов, уста-

¹⁴ Федеральный закон Российской Федерации от 20.07.2012 № 125-ФЗ «О донорстве крови и ее компонентов».

¹⁵ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

¹⁶ Официальный сайт Единой информационной системы в сфере закупок. <https://zakupki.gov.ru/>

¹⁷ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

¹⁸ Единый реестр зарегистрированных лекарственных средств Евразийского экономического союза. <https://portal.eaeunion.org/sites/commonprocesses/ru-ru/Pages/DrugRegistrationDetails.aspx>

¹⁹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

²⁰ Там же.

²¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

²² Там же.

новленные производителем лекарственного препарата, должны быть согласованы с поставщиками. Соответствующие аспекты производства, испытаний и контроля, в том числе требования к обработке, маркировке, упаковыванию и реализации, процедуры по рассмотрению претензий, отзыву и изъятию, должны быть зафиксированы в официальных соглашениях по качеству или в спецификациях». Подобные договоры между медицинским центром и производителем потенциально позволят регламентировать вопрос, связанный с заготовкой данного материала и его качеством. Прообразом этих документов могут являться договоры технического афереза, применяемые рядом фармацевтических компаний при включении центров в цепочку производства «индустриальных» CAR-T²³.

Потенциально в качестве контрагумента к применению данного подхода может быть использовано требование к производству биологических (в том числе иммунобиологических АФС) и лекарственных препаратов для медицинского применения, указанное в Решении Совета ЕЭК № 77²⁴, о том, что в отношении ВТЛП, в которых кровь или компоненты крови используются в качестве исходного сырья, применяется

соответствующее законодательство, которое устанавливает требования к отбору доноров, качеству и безопасности при заборе, тестированию, обработке, хранению и транспортировке человеческой крови и ее компонентов. Однако, как уже было указано ранее, лимфоциты не являются компонентами крови, а также в тексте требования речь идет именно об исходном сырье, но не об исходном материале. Несмотря на кажущуюся схожесть, существуют значимые различия между данными понятиями, что может приводить к путанице в аргументации. Следует учесть, что исходные материалы (starting materials) – это все материалы, из которых производится или экстрагируется АФС, а исходное сырье (raw materials) – «это любые субстанции, используемые для производства или экстрагирования АФС, но не являющиеся их источником, такие как реагенты, среды для культивирования, сыворотка телячьих эмбрионов, добавки и буферы для хроматографии и др.»^{25,26}.

В качестве наглядной иллюстрации существующей разницы между понятиями «исходные материалы» и «исходное сырье» на рисунке 1 схематично изображено производство одного из видов ВТЛП – мультипотентных мезен-

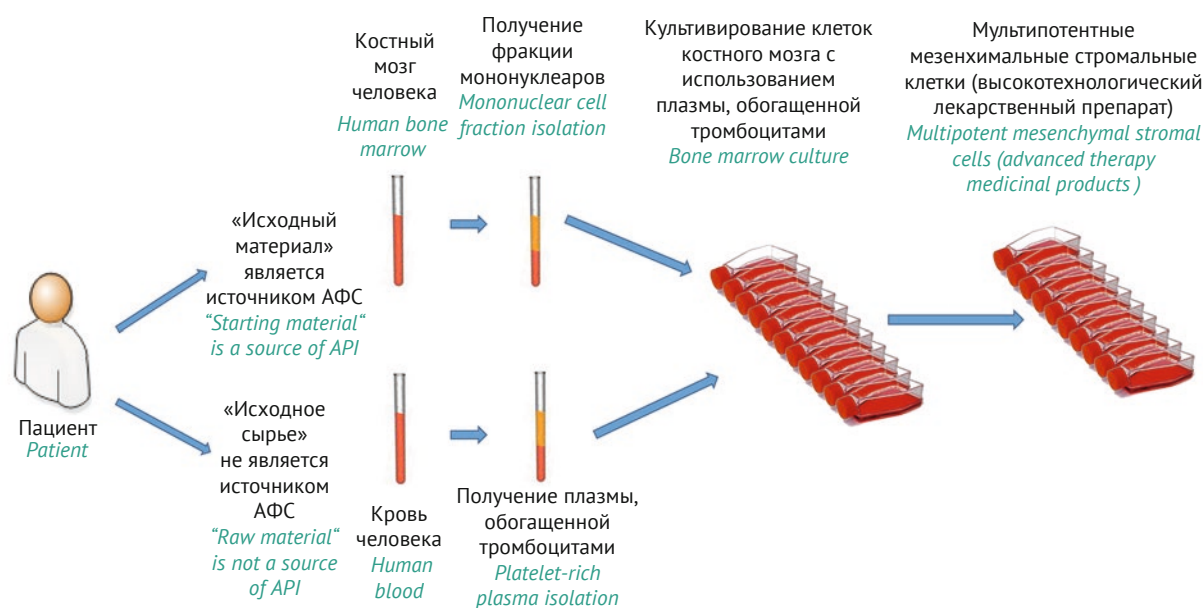


Рис. 1. Особенности применения Решения Совета Евразийской экономической комиссии № 77²⁶ на примере производства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. АФС – активная фармацевтическая субстанция.

Fig. 1. Manufacturing of multipotent mesenchymal stromal cells exemplifying the application of Decision No. 77 of the Council of the Eurasian Economic Commission "On the Adoption of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union"²⁶. API, active pharmaceutical ingredient.

²³ Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. EMA; 2017.

²⁴ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

²⁵ Там же.

²⁶ Там же.

химальных стромальных клеток (ММСК). В данном случае биологические материалы, полученные от донора (пациента), являются источниками исходного материала и исходного сырья. В процессе получения ММСК мононуклеары костного мозга культивируются с использованием плазмы, обогащенной тромбоцитами. Так, в качестве исходного материала в данном случае выступают мононуклеары, полученные из костного мозга донора, поскольку именно из них производится АФС — ММСК, а обогащенная тромбоцитами плазма, полученная из крови этого же человека, используется в качестве среды для культивирования ММСК и, таким образом, является исходным сырьем. В том случае если оба биообразца, полученные от одного пациента, будут представлены кровью или ее компонентами, то к образцу, который выступает в качестве исходного материала (в примере — мононуклеары), требования Решения Совета ЕЭК № 77²⁷ к производству биологических (в том числе иммунобиологических) активных фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов для медицинского применения не предъявляются, в отличие от исходного сырья (в примере — плазма, обогащенная тромбоцитами), к которой требования должны были быть применены в полной мере.

Передача исходного биологического материала для производства CAR-T

Одной из наиболее важных проблем в CAR-T терапии является отсутствие регламентированного процесса передачи биологического материала для производства самих CAR-T-клеток. В рамках Федерального закона № 180-ФЗ²⁸ специальным образом оговаривались все аспекты, связанные с разработкой, доклиническими исследованиями, клиническими исследованиями, экспертизой, государственной регистрацией, производством, контролем качества, реализацией, применением, хранением, транспортировкой, ввозом и вывозом из Российской Федерации, уничтожением БМКП. Существуют дополнительные нормативно-правовые акты, регулирующие правила получения биологического материала и его оборот, а также положение доноров биоматериала в этом процессе (приказы Минздрава России № 569н²⁹ и 125н³⁰). Однако прецедент

использования Федерального закона № 180-ФЗ и других разработанных для БМКП нормативно-правовых актов в практике не соответствовал бы прежде всего Конституции Российской Федерации, а именно статье 15, где указано, что «международные договоры Российской Федерации являются составной частью ее правовой системы. Если международным договором Российской Федерации установлены иные правила, чем предусмотренные законом, то применяются правила международного договора». Таким образом, использование Федерального закона № 180-ФЗ нарушило бы логику межгосударственных усилий, направленных на гармонизацию законодательства в наднациональных масштабах (в рамках полномочий ЕЭК в соответствии с обязательствами, которые взяла на себя Российская Федерация при формировании ЕАЭС в 2014 г. согласно международному договору). Учитывая вышесказанное, CAR-T (по крайней мере «индустриальные») рассматриваются именно как ВТЛП, а не БМКП, поэтому использование таких нормативно-правовых актов вызывает противоречия.

Необходимо отметить, что безвозмездная передача исходного биологического материала для производства CAR-T, которая была прописана в Федеральном законе № 180-ФЗ³¹, в случае трактовки CAR-T как ВТЛП также не будет возможна (собственно, как и ранее в рамках Федерального закона № 180-ФЗ, несмотря на наличие формулировки в законе). Фактически проведение заготовки биоматериала и невозможность компенсировать эти затраты потребует либо нецелевого расходования средств, либо возмещения затрат средствами от приносящей доход деятельности, что также не будет допустимо для организации, особенно при участии в цепочке производства «индустриальных» препаратов. Что касается вариантов покрытия затрат, когда заготовка включается в стоимость препаратов, такой вариант требует проработки, так как непонятно, как будет работать покрытие затрат в случае «неудачной» заготовки биоматериала (когда он не будет соответствовать критериям качества для производства ВТЛП) или в случае, когда летальный исход у пациента наступит до применения ВТЛП.

²⁷ Там же.

²⁸ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

²⁹ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.08.2017 № 569н «Об утверждении Правил получения биологического материала для производства биомедицинских клеточных продуктов и передачи его производителю биомедицинских клеточных продуктов».

³⁰ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 27.03.2018 № 125н «Об утверждении порядка медицинского обследования донора биологического материала и перечня противопоказаний (абсолютных и относительных) для получения биологического материала».

³¹ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

Экспорт материала для производства CAR-T-клеток

Любая технология производства CAR-T-клеток предполагает перемещение биоматериала в лабораторию (или на производство), где будет происходить генетическая модификация исходных клеток [6]. Однако учитывая, что в настоящее время на территории Российской Федерации отсутствует производство «индустриальных» CAR-T-препаратов полного цикла, потребуется экспорт исходного материала в другие страны.

На основе Гармонизированной системы описания и кодирования товаров (Harmonised System, HS) на территории Российской Федерации и в странах Содружества Независимых Государств создана товарная номенклатура внешнеэкономической деятельности (ТН ВЭД), при этом коды товаров в обеих системах совпадают. Согласно номенклатуре ТН ВЭД/HS исходные лимфоциты могут быть отнесены к разделу V – «продукция химической и связанных с ней отраслей промышленности», группе 30 – «фармацевтическая продукция, товарной позиции» 3002 – «кровь человеческая; кровь животных, приготовленная для использования в терапевтических, профилактических или диагностических целях; сыворотки иммунные, фракции крови прочие и иммунологические продукты, модифицированные или немодифицированные, в том числе полученные методами биотехнологии; вакцины, токсины, культуры микроорганизмов (кроме дрожжей) и аналогичные продукты». Согласно пояснениям к ТН ВЭД, данный материал может быть закодирован как «кровь человеческая» (3002901000) или как «продукты для клеточной терапии» (код 3002510000)³².

Для обеспечения международного экспортного контроля и в целях предотвращения угроз безопасности в 1996 г. были заключены Вассенаарские соглашения³³ [7]. Национальная политика

стран-участниц соответствует Вассенаарским соглашениям и дополняется при изменении последних, однако может иметь свои особенности. В области экспортного контроля основными являются следующие регламентирующие документы:

- Вассенаарские соглашения³⁴;
- Регламент Европейского парламента и Совета от 20.05.2021 № 2021/821³⁵;
- список товаров и технологий двойного назначения Российской Федерации³⁶;
- Правила экспортного контроля (ЭК) США³⁷ [7].

Для товаров «кровь человеческая» (код 3002901000) и «продукты для клеточной терапии» (код 3002510000) при экспорте из Российской Федерации в страны Европейского союза (ЕС) действуют некоторые ограничения³⁸, также существует необходимость проверки, попадает ли данный продукт под санкции и входит ли он в списки товаров и технологий двойного назначения в России и других странах.

В Вассенаарских соглашениях³⁹ и Правилах ЭК США⁴⁰ термины «клетки» и «клеточные культуры» упоминаются только в одном пункте, посвященном «биокатализаторам для обеззараживания или разложения отравляющих веществ и биологических системах для них», однако, согласно примечанию к этому пункту, правила не применяются к клеткам, используемым для гражданских целей, таких как сельское хозяйство, фармацевтика, медицина, ветеринария, охрана окружающей среды, управление отходами, или в пищевой промышленности. В Регламенте Европейского Парламента и Совета⁴¹ термины «клетки» и «клеточные культуры» сами по себе также не упоминаются. Согласно указанным документам исходные лимфоциты для производства CAR-T не являются товаром двойного назначения.

В списке товаров и технологий двойного назначения Российской Федерации⁴² товар «кровь человеческая» с кодом 3002901000 относится к пункту 9.3.3 «Образцы биологических мате-

³² Пояснения к Товарной номенклатуре внешнеэкономической деятельности ЕАЭС. <https://tnved.info/>

³³ The Wassenaar Arrangement. <https://www.wassenaar.org/>

³⁴ Там же.

³⁵ Regulation (EU) 2021/821 of the European Parliament and of the Council of 20 May 2021. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2021/821>

³⁶ Постановление Правительства Российской Федерации от 19.07.2022 № 1299 «Об утверждении списка товаров и технологий двойного назначения, которые могут быть использованы при создании вооружений и военной техники и в отношении которых осуществляется экспортный контроль».

³⁷ Bureau of Industry and Security. <https://www.bis.doc.gov/>

³⁸ Council Regulation (EEC) No 2658/87 of 23 July 1987 on the tariff and statistical nomenclature and on the Common Customs Tariff. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A31987R2658>

³⁹ The Wassenaar Arrangement. <https://www.wassenaar.org/>

⁴⁰ Bureau of Industry and Security. <https://www.bis.doc.gov/>

⁴¹ Regulation (EU) 2021/821 of the European Parliament and of the Council of 20 May 2021. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2021/821>

⁴² Постановление Правительства Российской Федерации от 19.07.2022 № 1299 «Об утверждении списка товаров и технологий двойного назначения, которые могут быть использованы при создании вооружений и военной техники и в отношении которых осуществляется экспортный контроль».

риалов человека», но примечание к данному пункту гласит: «не применяется к крови и ее компонентам, тканям, органам и другим биологическим материалам человека, предназначенным для лечебно-диагностических целей, включая гемотрансфузию, трансплантацию, а также для целей допинг-контроля». Экспорт исходного биоматериала из Российской Федерации будет осуществляться не с лечебно-диагностической, а с фармацевтической (производственной) целью, то есть для производства лекарственного препарата. Код товара «продукты для клеточной терапии» (3002510000) не упоминается в списке товаров двойного назначения и более логично соответствует описанным процессам. В соответствии с решением 61 сессии комитета по гармонизации Всемирной таможенной организации⁴³ этот код ТН ВЭД касается АФС — готовых к использованию клеточных продуктов.

Заключение

Анализ источников, посвященных правовым аспектам CAR-T, в частности, в области оборота биоматериала, показал, что основной проблемой в настоящее время является расхождение национального и наднационального права: Федеральный закон № 180-ФЗ рассматривает CAR-T как БМКП, а Решение Совета ЕЭК № 78 рассматривает CAR-T как ВТЛП, что влечет за собой дальнейшие трудности применения действующих нормативно-правовых актов. Так, согласно Федеральному закону № 61-ФЗ отсутствует определение понятия ВТЛП; термин «изготовление» согласно Приказу Минздрава России № 751н не применим к CAR-T; в соответствии с Федеральным законом № 125-ФЗ пациент не может быть донором лимфоцитов. Несмотря на существование дополнительных нормативно-правовых актов (Приказы Минздрава России № 569н и 125н), регулирующих правила получения биологического материала, его оборот, положение доноров биоматериала, отсутствуют прецеденты использования их в практике, так как нет соответствия с наднациональным правом (Решение Совета ЕЭК № 78).

Литература/References

1. Gökbüget N, Dombret H, Ribera J, Fielding A, Advani A, Bassan R, et al. International reference analysis of outcomes in adults with B-precursor Ph-negative relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(12):1524–33. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144311>
2. Crump M, Neelapu S, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse

Таим образом, основной задачей в настоящее время является гармонизация национального и наднационального права в области CAR-T. По мнению авторов данной статьи, CAR-T следует относить к ВТЛП, активной фармацевтической субстанцией которых являются генетически модифицированные аутологичные лимфоциты; в свою очередь, аутологичные лимфоциты, полученные от пациента, генетическая модификация которых осуществляется на производстве, следует определять как «исходный материал». В связи с этим к ним должны применяться требования как к исходному материалу для производства АФС, указанные в Решении Совета ЕЭК № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Использование подобного подхода решает большую часть проблем, связанных с первичным биологическим материалом и его производственными характеристиками для любого вида ВТЛП в будущем.

Несмотря на решение этой отдельной задачи, в будущем для обсуждения других вопросов, связанных с CAR-T терапией, представляется целесообразным формирование отдельных экспертных групп, объединяющих экспертов из разных областей, включая врачей-клиницистов, специалистов в области права, представителей профильных ведомств и фармацевтической индустрии, что позволит скоординировать усилия и поиск оптимальных решений. Именно такие рабочие экспертные группы способны формировать предложения по последовательному развитию и гармонизации правил ЕАЭС и национального законодательства в области инновационной терапии, с учетом опыта зарубежных стран и мнения отечественных экспертов, профильных министерств и регуляторных органов.

Именно широкий компромисс во всех областях позволит обеспечить доступ пациентов к высокотехнологичной клеточной терапии (в том числе «академической» или «индустриальной» CAR-T терапии) и будет способствовать развитию этого и других перспективных направлений в будущем.

- large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 2017;130(16):1800–08. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-769620>
3. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke F, Jacobson C, Hill B, et al. KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2020;382(14):1331–42. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1914347>

⁴³ World Customs Organisation. <https://www.wcoomd.org/>

4. Böll B, Subklewe M, Bergwelt-Baildon M. Ten things the hematologist wants you to know about CAR-T cells. *Intensive Care Med.* 2020;46(6):1243–5. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06002-9>
5. Liu B, Song Y, Liu D. Clinical trials of CAR-T cells in China. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):166. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0535-7>
6. Sterner R, Sterner R. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 2021;11(4):69. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
7. Кириченко ЭВ. Экспортный контроль как инструмент поддержания лидерства США в меняющемся мире. *Полис. Политические исследования.* 2020;20(1):74–88. Kirichenko EV. Export controls as a tool to maintain US leadership in a changing world. *Polis. Political Studies.* 2020;20(1):74–88 (In Russ.). <https://doi.org/10.17976/jpps/2020.01.06>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.Ю. Дроков** — разработка концепции, сбор и анализ данных, написание текста рукописи, ответственность за достоверность данных и целостность частей статьи; **Т.В. Гапонова** — критический пересмотр содержания текста рукописи; **Т.Ю. Губенко** — интерпретация и анализ данных; **О.С. Караваева, М.А. Теляшов, А.С. Антимонов** — сбор данных, написание текста рукописи; **В.В. Зубков** — анализ данных и написание текста рукописи; **Е.Н. Паровичникова** — критический пересмотр содержания текста рукописи.

Благодарности. Коллектив авторов выражает благодарность помощнику директора ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского» И.И. Наделева, эксперту Всероссийского союза пациентов А.А. Федорову за помощь в подготовке статьи.

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

Об авторах / Authors

Дроков Михаил Юрьевич, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9431-8316>
drokov.m@blood.ru

Гапонова Татьяна Владимировна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9684-5045>
gaponova.tatj@yandex.ru

Губенко Татьяна Юрьевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1532-9744>
gubenko.t@blood.ru

Караваева Ольга Станиславовна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8158-8210>
olga.starikova.1994@mail.ru

Теляшов Максим Александрович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7053-7039>
ticktackkk@icloud.com

Антимонов Антон Сергеевич, канд. юрид. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2367-4801>
antimonov.a@blood.ru

Зубков Вадим Вячеславович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3481-7476>
zubkov.v@blood.ru

Паровичникова Елена Николаевна, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>
parovichnikova.e@blood.ru

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.Y. Drovkov** conceptualised the study, collected and analysed data, drafted the manuscript, agreed to be accountable for the reliability of data and the integrity of all parts of the work. **T.V. Gaponova** critically revised the content of the manuscript. **T.Y. Gubenko** interpreted and analysed data. **O.S. Karavaeva, M.A. Telyashov, A.S. Antimonov** collected data and drafted the manuscript. **V.V. Zubkov** analysed data and drafted the manuscript. **E.N. Parovichnikova** critically reviewed the content of the manuscript. **Acknowledgements.** The authors would like to express their gratitude to I.I. Nadelyaeva, Assistant Director of B.V. Petrovsky National Research Center of Surgery, and to A.A. Fedorov, Expert of the Russian Patients Association, for help in preparing this article.

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

Mikhail Y. Drovkov, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9431-8316>
drokov.m@blood.ru

Tatiana V. Gaponova, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9684-5045>
gaponova.tatj@yandex.ru

Tatiana Y. Gubenko
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1532-9744>
gubenko.t@blood.ru

Olga S. Karavaeva
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8158-8210>
olga.starikova.1994@mail.ru

Maksim A. Telyashov
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7053-7039>
ticktackkk@icloud.com

Anton S. Antimonov, Cand. Sci. (Law)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2367-4801>
antimonov.a@blood.ru

Vadim V. Zubkov
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3481-7476>
zubkov.v@blood.ru

Elena N. Parovichnikova, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>
parovichnikova.e@blood.ru

Поступила 28.12.2022

После доработки 04.05.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Received 28 December 2022

Revised 4 May 2023

Accepted 7 June 2023



Исследование фармакокинетики биотехнологических препаратов на примере моноклональных антител

В.В. Смирнов^{1,2,✉}, О.А. Петухова¹, А.В. Филатов¹, Д.А. Кудлай^{1,2}, М.Р. Хаитов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Каширское шоссе, д. 24, Москва, 115522, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Смирнов Валерий Валерьевич; vall@mail.mipt.ru

Резюме

Терапевтические моноклональные антитела (МкАт) являются одним из самых быстро-развивающихся классов лекарственных средств, которые разрабатываются для лечения многих патологий, включая рак, аутоиммунные и инфекционные заболевания. Учитывая большое количество находящихся в настоящее время в разработке МкАт и сохраняющийся интерес со стороны фармацевтических компаний, ожидается, что рынок МкАт будет продолжать расти и в последующие годы. Для максимизации как терапевтической пользы, так и безопасности препаратов этого класса крайне важно, чтобы их фармакологические свойства были тщательно охарактеризованы.

Цель работы — анализ литературных данных о подходах в изучении фармакокинетических параметров моноклональных антител.

Представлены данные об основных физико-химических и фармакологических свойствах МкАт. Проведен сравнительный анализ характеристик МкАт и низкомолекулярных лекарственных веществ. Показано влияние на фармакокинетические параметры МкАт различных факторов, таких как способ введения, гидрофильность и заряд МкАт, индивидуальные особенности пациентов (масса тела, уровень альбумина в плазме крови, генетические особенности и др.), совместное применение с другими лекарственными средствами. Оценена роль межиндивидуальной и внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров МкАт. Сделан вывод о том, что в условиях стремительных темпов разработки препаратов данной группы и появления новых перспективных молекул особо важное значение приобретает необходимость подробного изучения и оптимизации фармакокинетических и фармакодинамических свойств для повышения как терапевтической пользы, так и безопасности препаратов класса МкАт.

Ключевые слова: моноклональные антитела; МкАт; фармакокинетические параметры; биоподобный препарат; молекулярная мишень; биотехнология

Для цитирования: Смирнов В.В., Петухова О.А., Филатов А.В., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Исследование фармакокинетики биотехнологических препаратов на примере моноклональных антител. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):173–180. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-173-180>

Studying the pharmacokinetics of biotechnological medicinal products on the example of monoclonal antibodies

V.V. Smirnov^{1,2,✉}, O.A. Petukhova¹, A.V. Filatov¹, D.A. Kudlay^{1,2}, M.R. Khaitov¹

¹ NRC Institute of Immunology of the FMBA of Russia, 24 Kashirskoe Hwy, Moscow 115522, Russian Federation

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

✉ Valery V. Smirnov; vall@mail.mipt.ru

Abstract

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs), which are developed to treat many pathologies, including cancer, autoimmune and infectious diseases, are one of the fastest growing classes of medicinal products. Given the large number of mAbs in the pipeline and continued interest from pharmaceutical companies, the mAb market is expected to continue to grow in the coming years. To maximise both the therapeutic benefit and the safety of medicinal products in this class, it is essential that their pharmacological properties be carefully characterised and understood.

The aim of the study was to analyse literature data on approaches to studying the pharmacokinetics of mAbs. This review presents data on the main physicochemical and pharmacological properties of mAbs and compares them with small molecules. The article describes the influence of various factors on mAb pharmacokinetics.

For example, such factors include the method of administration, hydrophilicity, and charge of the mAb, individual characteristics of the patient (body weight, plasma albumin levels, genetic characteristics, etc.), and concurrent administration of other medicinal products. The authors evaluated the role of intra- and inter-individual variability of pharmacokinetic parameters. The rapid development of this group of medicinal products and the emergence of new promising molecules are indicative of the need to study the pharmacokinetics and pharmacodynamics of mAbs in detail and to maximise both the therapeutic benefit and the safety of the medicinal products in this class.

Key words: monoclonal antibodies; mAbs; pharmacokinetic parameters; biosimilar medicinal products; molecular target; biotechnology

For citation: Smirnov V.V., Petukhova O.A., Filatov A.V., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Studying the pharmacokinetics of biotechnological medicinal products on the example of monoclonal antibodies. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):173–180. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-173-180>

Введение

В XX веке лекарственные препараты изготавливали на основе методов синтетической химии или получали из природных источников (например, инсулин). В ходе фармакологических исследований изучали процессы фармакодинамики, включая механизмы действия лекарственных средств, взаимодействие с рецепторами, транспортерами и ферментами, и фармакокинетику — всасывание, распределение, метаболизм и выведение лекарственных средств [1]. Многие из низкомолекулярных лекарственных веществ были разработаны таким образом, чтобы свести

к минимуму нежелательные и непредсказуемые эффекты. В последние три десятилетия с появлением рекомбинантных молекулярно-биологических технологий и углубленным изучением иммунологических механизмов резко увеличилось количество белковых терапевтических средств, представленных на фармацевтическом рынке [2]. За это время накопилось достаточно информации об особенностях фармакокинетики моноклональных антител.

Цель работы — анализ литературных данных о подходах в изучении фармакокинетических параметров моноклональных антител (МкАт).

Основные характеристики моноклональных антител

Антитела (Ат) являются гетеродимерными белками с молекулярной массой около 150 кДа, состоящими из двух легких и двух тяжелых цепей, каждая из которых состоит из нескольких доменов. Существуют пять классов антител, выделяемых на основе структуры их тяжелых цепей: IgM, IgD, IgG, IgE и IgA. IgG имеют длительный период полувыведения, их производство отличается относительной легкостью, поэтому все используемые в настоящее время терапевтические МкАт принадлежат к классу IgG [3].

Антигенсвязывающий фрагмент Ат (Fab-фрагмент) состоит из переменных участков тяжелых и легких цепей. Последовательность CDR (complementarity-determining region) переменных участков определяет место связывания этого МкАт (паратоп) с эпитопом на антигене [4]. Паратоп уникален для каждого МкАт и является основой их целевой специфичности. Участки МкАт с постоянной структурой (Fc-фрагменты) обеспечивают реализацию ряда эффекторных функций.

Fc-фрагменты МкАт, связавшиеся с клеткой-мишенью, приводят к активации комплемента и инициации комплементзависимой цитотоксичности (КЗТ). Fc-фрагменты антител изотипов IgG1 и IgG3 являются наиболее мощными активаторами комплемента по классическому пути [5]. Связывание Fc-фрагментов МкАт с Fcγ-рецепторами (FcγR) на иммунных клетках инициирует процесс антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) [6]. Антитела изотипа IgG1 особенно эффективны в индукции АЗКЦ, что опосредует лизис клеток, связанных с IgG1. Антитела субкласса IgG1 широко используются в терапии рака, вызывая цитотоксический эффект [4, 7]. Антитела субклассов IgG2 и IgG4 обладают более низкой эффекторной функцией [8], в связи с чем менее представлены на фармацевтическом рынке [9]. Однако их использование является более предпочтительным при иммуноопосредованных заболеваниях, при которых эффекты АЗКЦ или КЗТ нежелательны. Эффекторная функция IgG2 и IgG4 может быть еще более снижена с помощью генно-инженерной модификации [8].

Различия в физико-химических свойствах и характеристиках МкАт и низкомолекулярных лекарственных веществ (табл. 1) позволяют рассматривать МкАт в качестве перспективного объекта экспериментальной фармакологии.

Наиболее очевидным различием между низкомолекулярными лекарственными веществами и МкАт является размер молекулы. Большие размеры МкАт ограничивают их терапевтический

потенциал, что связано с рядом факторов: МкАт не имеют доступа к внутриклеточным мишеням, распределение МкАт по тканям происходит медленнее, чем низкомолекулярных лекарственных веществ. В частности, МкАт не преодолевают гематоэнцефалический барьер, и для обеспечения доступа к клеткам мозга должны применяться другие стратегии, например внутриназальная или таргетная доставка [11–13]. Однако это свойство МкАт позволяет избежать серьезного воздействия на ЦНС.

В отличие от низкомолекулярных лекарственных веществ, производимых путем химического синтеза и представляющих собой гомогенные продукты высокой чистоты, МкАт являются биотехнологическими продуктами, получаемыми с помощью клеток-продуцентов, что предопределяет их большую гетерогенность, в том числе связанную с наличием посттрансляционных модификаций.

На свойства МкАт оказывает влияние используемая для их получения клеточная линия. Например, профиль гликозилирования экспрессирующихся рекомбинантных белков различается в случае применения в качестве клеток-продуцентов культуры клеток эмбриональной почки человека (линия HEK293) и клеток яичников китайского хомячка (линия CHO) [14]. Таким образом, состав препарата МкАт может быть достаточно гетерогенным. От процесса производства МкАт зависят характеристики и свойства рекомбинантного белка, такие как посттрансляционные модификации, особенности гликозилирования, присутствие производственных примесей и др. Вследствие этого биоподобные препараты МкАт схожи по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным препаратом в такой же лекарственной форме.

Таким образом, биоподобный препарат МкАт должен быть клинически охарактеризован, чтобы быть эквивалентным референтному препарату МкАт. Это соответствие подтверждается контролем качества готового продукта, а также в процессе сравнительных доклинических и клинических исследований с оригинальным препаратом.

Следует отметить, что высокое сродство и селективность МкАт в отношении молекулярной мишени делает их особенно удобными в качестве инструментов для изучения роли мишени в патогенезе заболевания, особенно в экспериментальных моделях. Подобно низкомолекулярным лекарственным веществам, МкАт могут обладать активностью полных/частичных агонистов или аллостерически изменять рецептор [15, 16]. В качестве примера можно привести

Таблица 1. Сравнение свойств низкомолекулярных лекарственных веществ и моноклональных антител (по M.S. Castelli с соавт. [10] с изменениями)**Table 1.** Comparison of properties of small molecules and monoclonal antibodies (adapted from M.S. Castelli et al. [10])

Наименование параметра <i>Parameters</i>	Низкомолекулярные лекарственные вещества <i>Small molecules</i>	Моноклональные антитела <i>Monoclonal antibodies</i>
Происхождение <i>Origin</i>	Химический синтез или природное происхождение <i>Synthetic or natural origin</i>	Белковая молекула <i>Protein molecule</i>
Молекулярная масса <i>Molecular weight</i>	<700 Да <i><700 Da</i>	~146000 Да <i>~146000 Da</i>
Получение <i>Production</i>	Химический синтез <i>Chemical synthesis</i>	Методы биотехнологии <i>Biotechnology methods</i>
Гомогенность <i>Homogeneity</i>	>99%	Гетерогенны <i>Heterogeneous</i>
Аффинность <i>Affinity</i>	Умеренная (нмоль/л — мкмоль/л) <i>Moderate (nmol/L–μmol/L)</i>	Высокая (фмоль/л — пкмоль/л) <i>High (fmol/L–pmol/L)</i>
Селективность <i>Selectivity</i>	Умеренная <i>Moderate</i>	Очень высокая <i>Very high</i>
Сайт связывания <i>Binding site</i>	Ядерные, внутриклеточные и внеклеточные мишени <i>Nuclear, intracellular, and extracellular targets</i>	В основном внеклеточные мишени или поверхностные антигены клеток <i>Mostly extracellular targets or cell surface antigens</i>
Механизм действия <i>Mechanism of action</i>	Различные (индукция и ингибирование ферментов, агонисты или антагонисты рецепторов и др.) <i>Various (induction and inhibition of enzymes, agonism or antagonism at receptors, etc.)</i>	Ингибирующая активность различных молекул вне клеток, белок-белковые взаимодействия, связывание с мембранными рецепторами и др. <i>Inhibition of various molecules outside cells, protein–protein interactions, binding to membrane receptors, etc.</i>
Мультитаргетность <i>Multitargeting</i>	При увеличении количества одновременно применяемых препаратов эффективность безопасности снижаются <i>An increase in the number of simultaneously used medicinal products reduces the efficacy and safety</i>	Возможно совместное применение с другими лекарственными средствами без существенного изменения аффинности <i>Monoclonal antibodies can be used with other medicinal products without significant changes in affinity</i>
Способ введения <i>Method of administration</i>	Различные <i>Various</i>	В основном внутривенное или подкожное <i>Mainly intravenous or subcutaneous</i>
Всасывание и распределение <i>Absorption and distribution</i>	Сильно зависят от химического строения и способа введения <i>Strongly dependent on the chemical structure and route of administration</i>	Лимфатическая и кровеносная система <i>Lymphatic and blood systems</i>
Период полувыведения <i>Half-life</i>	В основном до 24 ч <i>Mostly, up to 24 h</i>	Недели <i>Weeks</i>
Клиренс <i>Clearance</i>	Печеночный, почечный <i>Hepatic, renal</i>	Внутриклеточная лизосомальная деградация <i>Intracellular lysosomal degradation</i>

препарат обинутузумаб (Gazyva®, Genentech), анти-CD20-МкАт с повышенным сродством к FcγR и повышенной специфической иммуномодулирующей активностью по сравнению с антителами первого поколения, например ритуксимабом [17].

Получение моноклональных антител

Гибридомная технология получения МкАт была разработана G. Köhler и C. Milstein в 1975 г. [18], что было отмечено Нобелевской преми-

ей. Антитела генерируются в процессе иммунизации животных с оценкой титров в течение нескольких месяцев с последующим отбором субпопуляций В-клеток селезенки и получением гибридом. Каждое МкАт продуцируется единственным клоном В-клеток, что делает их моноспецифичными и однородными [19].

Применение методов генной инженерии позволило получить химерные (мышь/человек), гуманизированные и полностью человеческие МкАт [20]. Гуманизацию МкАт проводили пу-

тем клонирования генов варибельного региона или участка CDR, определяющего комплементарность. Альтернативой трансгенным животным является использование библиотек Ат, комбинаторный скрининг которых позволяет отбирать Ат, обладающие умеренно высоким сродством, и полностью человеческие МкАт [4]. Полученные МкАт применяются при лечении иммунных, онкологических и инфекционных заболеваний [9].

Существуют три основных способа получения биспецифических МкАт: химическая конъюгация, слияние двух клеточных линий гибридом и генная инженерия [21]. Биспецифические МкАт имеют ряд преимуществ относительно моноспецифических МкАт, в том числе более высокую специфичность связывания антитела при взаимодействии с двумя различными антигенами и повышенную клеточную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток [21]. Так, препарат катумаксомаб (Removab®, Trion Pharma) связывается с CD3 на цитотоксических Т-клетках и с ЕpCAM на опухолевых клетках аденокарциномы человека [17]. В последнее десятилетие Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило для терапевтического использования два препарата биспецифических антител: блинатумомаб (Blincyto®, Amgen), используемый для лечения В-клеточных опухолей, и катумаксомаб, применяемый для лечения карциноматозного асцита у пациентов с ЕpCAM-положительными злокачественными опухолями [21].

МкАт могут быть также конъюгированы с цитотоксическими агентами путем химического связывания (antibody–drug conjugate, ADC). ADC могут применяться для эффективной терапии рака, обеспечивая селективную доставку цитотоксических препаратов к опухолям и создавая условия для расширения «терапевтического окна» по сравнению с использованием только цитотоксических агентов [22]. Примером ADC является препарат трастузумаб-эмтанзин (Kadcyla®, F.Hoffmann–La Roche), который нацелен на рецептор HER2 и доставляет эмтанзин в опухолевые клетки при HER2-положительном метастатическом раке молочной железы [22].

Особенности фармакокинетики моноклональных антител

Учитывая большой размер и высокую полярность молекул МкАт, а также их ограниченную способность проникать через клеточные мембраны, слабую стабильность в желудочно-кишечном тракте, препараты МкАт не обладают

высокой биодоступностью при пероральном применении (<1%) [3, 23]. По этой причине их обычно не вводят перорально, а парентеральный прием в основном осуществляют с помощью внутривенных, подкожных и внутримышечных инъекций. При внутримышечных или подкожных инъекциях процесс всасывания из места инъекции происходит через интерстициальное пространство и лимфатическую систему с последующим попаданием в системный кровоток [3]. Несмотря на то что внутримышечный и подкожный пути введения обеспечивают более низкую биодоступность, чем внутривенный, из-за деградации под действием протеолитических ферментов интерстициальной жидкости или лимфы [23], подкожный путь наиболее широко используется благодаря удобству и возможности самостоятельного введения пациентом [17]. При этих двух способах введения максимальная концентрация МкАт в плазме крови после приема одной дозы достигается через 3–7 сут после введения вследствие медленной абсорбции из места введения в системный кровоток [17, 23]. Другими возможными способами введения МкАт являются интравитреальное, внутрибрюшинное и внутрилегочное введение [23].

По сравнению с низкомолекулярными лекарственными веществами МкАт имеют более длительный период полувыведения из кровяного русла (как правило, 11–30 сут), и, следовательно, требуют гораздо более низкой периодичности введения [17]. Fc-фрагмент IgG имеет домен связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), что обеспечивает защиту IgG от лизосомальной деградации, способствует рециркуляции, в результате чего увеличивается период полувыведения МкАт [24]. Важно отметить, что используемые терапевтические концентрации МкАт далеки от насыщающей концентрации [24], что способствует увеличению периода полувыведения МкАт [24].

После введения происходит распределение МкАт в ткани и интерстициальное пространство в основном за счет пассивного переноса, в том числе транцитоза через сосудистые эндотелиальные клетки [3]. Препараты МкАт имеют низкие объемы распределения в равновесном состоянии (3–8 л), что указывает на их преимущественное присутствие в системном кровотоке [17]. В том случае если мишени МкАт находятся в тканях, медленное распределение из системного кровотока может препятствовать клиническому эффекту. Одним из способов решения этой проблемы является использование Fab-фрагментов МкАт или одноцепочечных ва-

риабельных фрагментов Ат, которые лучше проникают в ткани [23].

На процессы распределения МкАт в тканях влияют такие показатели, как сродство к целевым антигенам, скорость интернализации, гидрофильность и заряд МкАт. Для улучшения распределения МкАт в органах-мишенях может быть проведена оптимизация этих показателей [17]. При изучении распределения может быть использован подход физиологически обоснованного фармакокинетического моделирования для описания процесса переноса МкАт в зависимости от скорости потока лимфы. В качестве критерия оценки фармакологической эффективности может выступать величина кажущегося объема распределения МкАт наряду с иммунохимическими показателями [3].

Из-за высокой молекулярной массы фильтрация и выведение МкАт почками снижены, а имеющиеся фрагменты МкАт, как правило, реабсорбируются [3]. Однако есть некоторые исключения, например, применение тоцилизумаба (Actemra®, F. Hoffmann–La Roche) вызывает повышение экспрессии изоферментов цитохрома P450 (CYP), что приводит к увеличению клиренса лекарственных препаратов, которые метаболизируются этими ферментами [23]. В элиминации МкАт задействованы механизмы, связанные с клеточным поглощением молекул путем пиноцитоза и эндоцитоза и последующей лизосомальной деградацией [3].

Фармакокинетические параметры терапевтических МкАт демонстрируют большую индивидуальную вариабельность. В многочисленных исследованиях сообщается о существовании взаимосвязи между концентрацией и выраженностью эффекта МкАт при различных заболеваниях. Причины межиндивидуальной вариабельности могут быть условно разделены на три группы [26]:

- индивидуальные факторы, связанные с полом, массой тела, генетическими особенностями, уровнем альбумина в плазме крови;
- факторы, связанные с молекулярной массой антигена, с большим количеством антигена, приводящим к более высокому мишень-опосредованному распределению препарата, нелинейным клиренсом;
- факторы, связанные с иммуногенностью МкАт (было показано влияние щелочной фосфатазы на клиренс МкАт).

Литература/References

1. Kenakin TP. *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods*. 2nd ed. Vol. XVIII. Burlington, MA; London: Academic Press; 2006.
2. Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(1):21–39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>

Существуют также другие причины вариабельности параметров фармакокинетики, например сродство МкАт к рецептору FcRn и способность неспецифического связывания [27, 28]. Кроме того, при анализе показателей фармакокинетики МкАт следует учитывать фактор совместного применения препаратов, например кортикостероидов или иммуномодуляторов. Все эти факторы могут быть ответственны за серьезные внутрииндивидуальные вариации фармакокинетики МкАт в дополнение к уже существующей межиндивидуальной вариабельности.

При проведении фармакокинетических исследований основным методом количественного определения МкАт является твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Однако в настоящее время для количественного определения МкАт, помимо ИФА, также используют высокоэффективную жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), например, в случае таких препаратов, как бевацизумаб [29], ниволумаб [30], пембролизумаб [31] и трастузумаб [32]. Следует отметить, что сравнение данных, полученных с использованием ИФА и ВЭЖХ-МС/МС, показало отличие результатов между собой на 20% [33]. Важно отметить, что для получения достоверных результатов при изучении фармакокинетики МкАт должны быть использованы только валидированные методы.

Заключение

Терапевтические МкАт стали одним из самых быстроразвивающихся классов лекарственных средств в истории медицины. Дальнейшее совершенствование терапевтических МкАт будет зависеть от развития технологий, позволяющих идентифицировать новые мишени и усовершенствовать структуру МкАт для повышения эффективности, оптимизации фармакокинетических/фармакодинамических свойств и минимизации потенциальных побочных эффектов. Особую роль приобретает изучение влияния межиндивидуальной и внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров. Для повышения как терапевтической пользы, так и безопасности препаратов класса МкАт крайне важно, чтобы их фармакологические свойства были тщательно изучены и охарактеризованы.

3. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2017;6(9):576–88.
<https://doi.org/10.1002/psp4.12224>
4. Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet*. 2000;355(9205):735–40.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)01034-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)01034-5)
5. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(5):317–27.
<https://doi.org/10.1038/nri2744>
6. Geng X, Kong X, Hu H, Chen J, Yang F, Liang H, et al. Research and development of therapeutic mAbs: an analysis based on pipeline projects. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(12):2769–76.
<https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1074362>
7. Kinder M, Greenplate AR, Strohl WR, Jordan RE, Brezski RJ. An Fc engineering approach that modulates antibody-dependent cytokine release without altering cell-killing functions. *MAbs*. 2015;7(3):494–504.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1022692>
8. An Z, Forrest G, Moore R, Cukan M, Haytko P, Huang L, et al. IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function. *MAbs*. 2009;1(6):572–9.
<https://doi.org/10.4161/mabs.1.6.10185>
9. Strohl WR. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein Cell*. 2018;9(1):86–120.
<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0457-8>
10. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect*. 2019;7(6):e00535.
<https://doi.org/10.1002/prp2.535>
11. Pardridge WM. Blood-brain barrier drug delivery of IgG fusion proteins with a transferrin receptor monoclonal antibody. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(2):207–22.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2014.952627>
12. Cooper PR, Ciambone GJ, Kliwinski CM, Maze E, Johnson L, Li Q, et al. Efflux of monoclonal antibodies from rat brain by neonatal Fc receptor, FcRn. *Brain Res*. 2013;1534:13–21.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.035>
13. Karaoglu Hanzatian D, Schwartz A, Gizatullin F, Erickson J, Deng K, Villanueva R, et al. Brain uptake of multivalent and multi-specific DVD-Ig proteins after systemic administration. *MAbs*. 2018;10(5):765–77.
<https://doi.org/10.1080%2F19420862.2018.1465159>
14. Wang W, Soriano B, Chen Q. Glycan profiling of proteins using lectin binding by surface plasmon resonance. *Anal Biochem*. 2017;538:53–63.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.09.014>
15. Hinke SA, Cieniewicz AM, Kirchner T, D'Aquino K, Nanjunda R, Aligo J, et al. Unique pharmacology of a novel allosteric agonist/sensitizer insulin receptor monoclonal antibody. *Mol Metab*. 2018;10:87–99.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.01.014>
16. Kang JC, Poovassery JS, Bansal P, You S, Manjares IM, Ober RJ, Ward ES. Engineering multivalent antibodies to target heregulin-induced HER3 signaling in breast cancer cells. *MAbs*. 2014;6(2):340–53.
<https://doi.org/10.4161/mabs.27658>
17. Ovacik M, Lin K. Tutorial on monoclonal antibody pharmacokinetics and its considerations in early development. *Clin Transl Sci*. 2018;11(6):540–52.
<https://doi.org/10.1111/cts.12567>
18. Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol*. 1976;6(7):511–9.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830060713>
19. Levene AP, Singh G, Palmieri C. Therapeutic monoclonal antibodies in oncology. *J R Soc Med*. 2005;98(4):146–52.
<https://doi.org/10.1177/014107680509800403>
20. Yamashita M, Katakura Y, Shirahata S. Recent advances in the generation of human monoclonal antibody. *Cytotechnology*. 2007;55(2–3):55–60.
<https://doi.org/10.1007/s10616-007-9072-5>
21. Sedykh SE, Prinz VV, Buneva VN, Nevinsky GA. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:195–208.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S151282>
22. Sau S, Alsaab HO, Kashaw SK, Tatiparti K, Iyer AK. Advances in antibody–drug conjugates: a new era of targeted cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2017;22(10):1547–56.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.011>
23. Keizer RJ, Huitema AD, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(8):493–507.
<https://doi.org/10.2165/11531280-000000000-00000>
24. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):715–25.
<https://doi.org/10.1038/nri2155>
25. Suzuki T, Ishii-Watabe A, Tada M, Kobayashi T, Kanayasu-Toyoda T, Kawanishi T, Yamaguchi T. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. *J Immunol*. 2010;184(4):1968–76.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903296>
26. Dirks NL, Meibohm B. Population pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(10):633–59.
<https://doi.org/10.2165/11535960-000000000-00000>
27. Kelly RL, Yu Y, Sun T, Caffry I, Lynaugh H, Brown M, et al. Target-independent variable region mediated effects on antibody clearance can be FcRn independent. *MAbs*. 2016;8(7):1269–75.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1208330>
28. Datta-Mannan A, Lu J, Witcher DR, Leung D, Tang Y, Wroblewski VJ. The interplay of non-specific binding, target-mediated clearance and FcRn interactions on the pharmacokinetics of humanized antibodies. *MAbs*. 2015;7(6):1084–93.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1075109>
29. Chiu HH, Tsai IL, Lu YS, Lin CH, Kuo CH. Development of an LC-MS/MS method with protein G purification strategy for quantifying bevacizumab in human plasma. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409(28):6583–93.
<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0607-0>

30. Irie K, Okada A, Yamasaki Y, Kokan C, Hata A, Kaji R, et al. An LC-MS/MS method for absolute quantification of nivolumab in human plasma: application to clinical therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2018;40(6):716–24.
<https://doi.org/10.1097/ftd.0000000000000558>
31. Chiu HH, Liao HW, Shao YY, Lu YS, Lin CH, Tsai IL, et al. Development of a general method for quantifying IgG-based therapeutic monoclonal antibodies in human plasma using protein G purification coupled with a two internal standard calibration strategy using LC-MS/MS. *Anal Chim Acta.* 2018;1019:93–102.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.040>
32. Willemann T, Jourdil JF, Gautier-Veyret E, Bonaz B, Stanke-Labesque F. A multiplex liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of seven therapeutic monoclonal antibodies: application for adalimumab therapeutic drug monitoring in patients with Crohn's disease. *Anal Chim Acta.* 2019;1067:63–70.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.033>
33. Iwamoto N, Takanashi M, Shimada T, Sasaki J, Hamada A. Comparison of bevacizumab quantification results in plasma of non-small cell lung cancer patients using bioanalytical techniques between LC-MS/MS, ELISA, and microfluidic-based immunoassay. *AAPS J.* 2019;21(6):101.
<https://doi.org/10.1208/s12248-019-0369-z>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.В. Смирнов, А.В. Филатов** – сбор и анализ литературных данных, написание и редактирование текста рукописи; **О.А. Петухова** – редактирование и оформление текста рукописи; **Д.А. Кудлай, М.Р. Хаитов** – обоснование концепции исследования, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. М.Р. Хаитов является заместителем главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.V. Smirnov, A.V. Filatov** selected and analysed literature data, drafted and edited the manuscript. **O.A. Petukhova** edited and formatted the manuscript. **D.A. Kudlay, M.R. Khaitov** substantiated the study concept and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. This study was carried out with no external funding.

Conflict of interest. M.R. Khaitov is the Deputy Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Смирнов Валерий Валерьевич, д-р фарм. наук, доц.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>
vall@mail.mipt.ru

Петухова Ольга Андреевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3339-2608>
tashirik@mail.ru

Филатов Александр Васильевич, д-р биол. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>
avfilat@yandex.ru

Кудлай Дмитрий Анатольевич, д-р мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>
D624254@gmail.com

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>
mr.khaitov@nrcii.ru

Valery V. Smirnov, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8232-6682>
vall@mail.mipt.ru

Olga A. Petukhova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3339-2608>
tashirik@mail.ru

Alexander V. Filatov, Dr. Sci. (Biol.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>
avfilat@yandex.ru

Dmitry A. Kudlay, Dr. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>
D624254@gmail.com

Musa R. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corr. Member of RAS
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>
mr.khaitov@nrcii.ru

Поступила 14.06.2022

После доработки 20.04.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Received 14 June 2022

Revised 20 April 2023

Accepted 7 June 2023



Особенности государственной регистрации и обеспечения качества лекарственных препаратов бактериофагов в Российской Федерации

Д.С. Давыдов^{1,✉}, Р.Л. Парфенюк¹, З.В. Дурманова¹, В.А. Меркулов^{1,2},
А.А. Мовсесянц¹

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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, 119991, Москва, Российская Федерация

✉ Давыдов Дмитрий Сергеевич; davydov@expmed.ru

Резюме

Разработка и внедрение новых лекарственных препаратов для медицинского применения на основе бактериофагов являются важным направлением сдерживания повсеместного распространения инфекционных заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами с множественной устойчивостью к лекарственным препаратам. В современной мировой практике существуют два подхода к производству препаратов бактериофагов: системный с регулирующим участием государственных органов контроля и персонализированный.

Цель работы – проанализировать особенности нормативно-правового регулирования и различия методических подходов к производству и изготовлению лекарственных препаратов бактериофагов для медицинского применения в Российской Федерации и определить основные этапы комплексного подхода к разработке препаратов бактериофагов с учетом совершенствования государственных механизмов управления и контроля для обеспечения их качества, эффективности и безопасности. В статье рассмотрен опыт применения лечебных препаратов бактериофагов в странах Европы, США и в России, отмечены основные причины, приведшие к прекращению коммерческого производства бактериофагов за рубежом и одновременно успешному развитию фаготерапии и фагопрофилактики в Советском Союзе. В настоящее время Российская Федерация является единственным государством в мире, на территории которого официально внедрены фармакопейные стандарты качества препаратов бактериофагов.

В статье представлены преимущества и недостатки системного и персонализированного подходов к производству препаратов бактериофагов, проанализированы нормативные правовые документы, регулирующие производство, изготовление лекарственных препаратов в Российской Федерации. Отмечено, что, несмотря на актуальность применения персонализированного подхода к лечению и профилактике инфекционных заболеваний человека, правовые основания для персонализированного применения бактериофагов практически отсутствуют как в России, так и в других странах мира. Для осуществления государственного контроля и надзора за качеством изготовленных лечебно-профилактических препаратов бактериофагов в случае их применения в рамках персонализированного подхода были определены основные этапы порядка изготовления препаратов бактериофагов и контроля их качества.

Ключевые слова: биологические лекарственные препараты; бактериофаги; антибиотикорезистентность; национальная система биологической безопасности Российской Федерации; биологические угрозы; инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП); антибиотикоустойчивые бактерии; лицензирование; фармакопейная статья

Для цитирования: Давыдов Д.С., Парфенюк Р.Л., Дурманова З.В., Меркулов В.А., Мовсесянц А.А. Особенности государственной регистрации и обеспечения качества лекарственных препаратов бактериофагов в Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):181–193. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-431>

Characteristic aspects of marketing authorisation and quality assurance of bacteriophage medicinal products in the Russian Federation

D.S. Davydov^{1,✉}, R.L. Parfenyuk¹, Z.V. Durmanova¹, V.A. Merkulov^{1,2}, A.A. Movsesyants¹

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

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

✉ Dmitry S. Davydov; davydov@expmed.ru

Abstract

The development and introduction of new bacteriophage-based medicinal products for human use is an important mission aimed at curbing the spread of infectious diseases caused by multi-resistant pathogens. The current global practice offers two approaches to the production of bacteriophage preparations: a systemic one, with regulatory participation of state control bodies, and a personalised one.

The aim of the study was to analyse the legal and regulatory framework and differences of the mentioned methodological approaches to commercial and personalised production of bacteriophage medicinal products for human use in the Russian Federation and to identify the main stages for a comprehensive approach to the development of such medicinal products with the view of improving the state regulation and control intended to ensure the quality, efficacy, and safety. The article considers the experience of therapeutic bacteriophage use in Europe, the USA, and Russia, highlighting the main reasons for the termination of commercial bacteriophage production abroad and the success of phage therapy and prophylaxis development in the Soviet Union. Currently, the Russian Federation is the only state in the world that officially implements compendial quality standards for bacteriophage preparations. The article presents the advantages and disadvantages of the systemic and the personalised approaches to the production of bacteriophage preparations and analyses legal and regulatory documents governing it in the Russian Federation. The authors note that despite the relevance of personalised approaches to treatment and prevention of human infectious diseases, the legal grounds for the personalised use of bacteriophages are practically absent both in the Russian Federation and in other countries. To support the state control and supervision over the therapeutic and prophylactic bacteriophage preparations produced for the use in the framework of the personalised approach, the authors determined the main production and quality control stages for bacteriophage medicinal products.

Key words: biologicals; bacteriophages; antimicrobial resistance; National System of Biological Safety of the Russian Federation; biological threats; healthcare-associated infection (HAI); antibiotic-resistant bacteria; marketing authorisation; pharmacopoeial monograph

For citation: Davydov D.S., Parfenyuk R.L., Durmanova Z.V., Merkulov V.A., Movsesyants A.A. Characteristic aspects of marketing authorisation and quality assurance of bacteriophage medicinal products in the Russian Federation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2): 181–193. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-431>

Введение

Несмотря на сложную, постоянно меняющуюся эпидемическую ситуацию в разных регионах мира, на появление вспышек новых и возвращающихся инфекций и даже возникновение в 2020 г. мировой пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), вызываемой вирусом SARS-CoV-2, одной из главных биологических угроз как на региональном, так и на мировом уровнях остается распространение устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к лекарственным препаратам (антибиотикорезистентность) и дезинфекционным средствам, а также связанные с этим рост эпидемической значимости условно-патогенных микроорганизмов, увеличение частоты инфекционных заболеваний у лиц с иммунодефицитными состояниями, распространение инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Эти факторы способствуют росту смертности и летальности, снижению доступности и эффективности медицинской помощи (в том числе высокотехнологичной), огромным человеческим и экономическим потерям.

Данная ситуация многократно отражена в декларациях, решениях и руководящих документах ВОЗ, обязательность борьбы с данными биологическими угрозами закреплена в документах стратегического планирования Российской Федерации, в том числе в Федеральном законе «О биологической безопасности в Российской Федерации»¹ и «Основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 г. и дальнейшую перспективу»². Принята Государственная стратегия предупреждения распространения устойчивости к противомикробным препаратам³. Данная стратегия в соответствии с подготовленным планом мероприятий в качестве одного из важных направлений рассматривает разработку

и создание новых биологических лекарственных препаратов, в том числе иммунобиологических и биотехнологических препаратов, отдельно выделяя производство бактериофагов [1].

Цель работы – проанализировать особенности нормативно-правового регулирования и различия методических подходов к производству и изготовлению лекарственных препаратов бактериофагов для медицинского применения в Российской Федерации и определить основные этапы комплексного подхода к разработке препаратов бактериофагов с учетом совершенствования государственных механизмов управления и контроля для обеспечения качества, эффективности и безопасности.

Опыт медицинского применения бактериофагов

Бактериофаги – это вирусы, повсеместно распространенные в большинстве известных типов биогеоценозов, которые являются симбионтами или специфическими патогенами различных прокариотических организмов, в том числе патогенных бактерий. Они относятся к более чем 10 различным крупным таксонам, общий объем их популяций в биосфере оценивается, по разным данным, примерно в 10^{30} – 10^{32} единиц⁴. Уже около 100 лет культуры бактериофагов применяются для производства лекарственных средств для медицинского применения в целях лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

После открытия бактериофагов в 1917 г. уже в 1919 г. они были внедрены в практику здравоохранения (табл. 1) [2–4].

Важно подчеркнуть 2 аспекта. Первое – применение бактериофагов не было индивидуальным, фагировали большие группы населения. Так, при сдерживании вспышек холеры в Индии, которые угрожали перерасти в масштабную эпидемию, были изготовлены сотни тысяч доз. Второе – использовались не продукты

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации».

² Основы государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу (утв. Указом Президента Российской Федерации от 11.03.2019 № 97).

³ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 11.09.2021 № 2539-р «О внесении изменений в распоряжения Правительства Российской Федерации от 25 сентября 2017 г. № 2045-р и от 30 марта 2019 г. № 604-р».

⁴ Каттер Э, Сулаквелидзе А. Введение. В кн.: Каттер Э, Сулаквелидзе А, ред. Бактериофаги: биология и практическое применение. М.: Научный мир; 2012.

Таблица 1. Применение фаговой терапии в Европе, Индии и США в 1919–1932 гг.⁵Table 1. Phage therapy in Europe, India, and the USA in 1919–1932⁵

Год начала применения <i>Year of the first use</i>	Заболевание (возбудитель) <i>Disease (causative agent)</i>	Страна <i>Country</i>
1919	Дизентерия (<i>Shigella</i> spp.) <i>Dysentery</i>	Франция <i>France</i>
1921	Фурункулез (<i>Staphylococcus</i> spp.) <i>Furunculosis</i>	Франция <i>France</i>
1922	Инфекционные поражения кожи (<i>Streptococcus</i> spp.) <i>Infectious skin lesions</i>	Франция <i>France</i>
1925	Чума (<i>Yersinia pestis</i>) <i>Plague</i>	Индия <i>India</i>
1931	Холера (<i>Vibrio cholerae</i>) <i>Cholera</i>	Индия <i>India</i>
1932	Менингит (<i>Staphylococcus</i> spp.) <i>Meningitis</i>	США <i>USA</i>

лабораторного изготовления, а коммерческие препараты. Уже к началу 1930-х гг. в США и во Франции выпускали более 10 торговых наименований препаратов бактериофагов (Ento-lysate, Colo-lysate, Staphylo-lysate, Bacté-coli-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage и другие)⁶. Успешным был и опыт применения бактериофагов в вооруженных силах США в военно-полевой медицине во время Второй мировой войны. Однако сразу после ее окончания практика медицинского применения бактериофагов в США и странах Европы, не вошедших в Организацию Варшавского договора, стала предметом крайне скептического отношения со стороны экспертного сообщества, вследствие чего коммерческое производство препаратов бактериофагов было прекращено. Причиной этого стала сложность производства и стандартизации лекарственных препаратов бактериофагов, неясная качественная и количественная характеристика активного компонента, а также явные успехи интенсивно развивавшейся индустрии производства химических антимикробных препаратов. В течение 1960–1980-х гг. в ФРГ и Франции осуществлялось спорадическое применение подобранных эмпирическим путем комбинаций литически активных бактериофагов при оказании персонализированной медицинской помощи, однако после начала распространения ВИЧ-инфекции ужесточившиеся противоэпидемические санитарные нормы поставили данную практику де-факто под запрет [5, 6].

В последние годы эта практика возобновляется в отдельных странах Европейского союза и также имеет характер персонализированного применения. До последнего времени, по разным данным, медицинскую помощь получали не более нескольких сотен пациентов в год [7].

В то же самое время в СССР существовала и развивалась ведущая научно-медицинская школа фаготерапии. В 1930–1940-е гг. разрабатывались методы и способы фагопрофилактики дизентерии и брюшного тифа, были получены бактериофаги против основных возбудителей хирургических инфекций: стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, протей, синегнойной палочки. Успешный опыт использования бактериофагов в хирургии при лечении гнойных инфекций и послеоперационных осложнений, а также купирование вспышек кишечных инфекций во время Великой Отечественной войны явились стимулом для углубленного изучения потенциала фаготерапии и фагопрофилактики инфекционно-воспалительных заболеваний⁷.

Одним из преимуществ советских разработок было проведение исследований эффективности и безопасности препаратов бактериофагов на очень больших выборках пациентов. При фаготерапии и фагопрофилактике дизентерии и брюшного тифа в группы включали от 2835 до 38000 человек⁸. В 1960–1980-е гг. хорошие результаты были получены при массовом фагировании детей дизенте-

⁵ Там же.⁶ Там же.⁷ Сутин ИА. Бактериофаги и их применение в медицинской практике. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медгиз; 1958.⁸ Там же.

рийным и коли-протейным бактериофагами, проведенном на базе детских больниц и дошкольных учреждений [8].

В настоящее время в Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации (ГРЛС)⁹ внесены 16 наименований лекарственных препаратов бактериофагов для медицинского применения отечественного производства (табл. 2).

Накопленный опыт клинического применения лечебно-профилактических бактериофагов в СССР и Российской Федерации стал основанием для включения в число показаний к медицинскому применению свыше 40 нозологических форм инфекционных заболеваний человека [9], в том числе:

- инфекции и заболевания желудочно-кишечного тракта (бактериальная дизентерия, сальмонеллез, гастроэнтероколит, холецистит, панкреатит, диспепсия, дисбактериоз кишечника) [10–12];
- воспалительные заболевания новорожденных и детей раннего возраста (гастроэнтероколит, дисбактериоз кишечника, омфалит, пемфигус, пиодермия, септицемия и септикопиемия различной локализации) [13–15];
- хирургические инфекции (нагноения ран, гнойные поражения кожи, ожоги, перитонит, плеврит, мастит, остеомиелит, фурункулез, карбункулы, гидроаденит, панариций, парапроктит, бурсит, абсцесс, флегмона) [16–22];
- урогенитальные инфекции (цистит, пиелонефрит, уретрит, эндометрит, вульвит, бартолинит, кольпит, сальпингоофорит) [23–27];
- гнойно-воспалительные заболевания уха, горла, носа, пазух носа, ротовой полости, глотки, гортани, бронхов, легких и плевры (озена, склерома, отит, ангина, фарингит, ларингит, стоматит, пародонтит, гайморит, фронтит, бронхит, пневмония, плеврит) [28–32];
- посттравматический конъюнктивит, кератоконъюнктивит, гнойная язва роговицы и иридоциклит [33];
- внутрибольничные инфекции [34, 35].

К патогенным микроорганизмам, в отношении которых доказана высокая антимикробная активность бактериофагов, входящих в состав лекарственных препаратов, относятся возбу-

дители инфекционных заболеваний человека, обладающие множественной лекарственной устойчивостью.

Возможные подходы к выпуску лекарственных препаратов бактериофагов для медицинского применения

В настоящее время применяют два основных подхода к получению препаратов бактериофагов. Первый — это разработка комбинаций большого количества литических фагов, активных в отношении широкого спектра эпидемиологически актуальных групп возбудителей. Данный системный подход практикуется в настоящее время для лекарственных препаратов, внесенных в Государственный реестр лекарственных средств. Эту группу препаратов характеризует производство в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики организацией-производителем, имеющей лицензию на производство лекарственных средств. Этот вид деятельности урегулирован Федеральным законом Российской Федерации № 61-ФЗ¹⁰. Лицензирование деятельности по производству лекарственных средств предусмотрено требованиями пункта 16 части 1 статьи 12 Федерального закона Российской Федерации № 99-ФЗ¹¹.

Второй подход заключается в том, что к выделенному возбудителю в каждом клиническом случае подбираются активные фаги. В большинстве случаев в состав готового препарата входит одна монокультура бактериофага. Источником выбора бактериофагов являются фонды официальных коллекций [36]. Данный способ является элементом персонализированной медицины и предусматривает изготовление готовой лекарственной формы в медицинской организации, что является составной частью фармацевтической деятельности¹², лицензирование которой предусмотрено на основании требований пункта 47 части 1 статьи 12 Федерального закона Российской Федерации № 99-ФЗ¹³. Таким образом, медицинская организация обязана иметь лицензию на фармацевтическую деятельность, на нее возлагается необходимость формирования фармацевтической системы качества при изготовлении лекарственного препарата.

⁹ <https://grls.rosminzdrav.ru>

¹⁰ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

¹¹ Федеральный закон Российской Федерации от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности».

¹² Постановление Правительства Российской Федерации от 22.12.2011 № 1081 «О лицензировании фармацевтической деятельности».

¹³ Федеральный закон Российской Федерации от 04.05.2011 № 99-ФЗ (ред. от 31.07.2020) «О лицензировании отдельных видов деятельности».

Таблица 2. Перечень лекарственных препаратов бактериофагов, зарегистрированных на территории Российской Федерации
Table 2. Bacteriophage medicinal products registered in the Russian Federation

№ п/п Item No.	Торговое наименование лекарственного препарата, форма выпуска <i>Trade name of the medicinal product, dosage form</i>	Специфическая направленность <i>Specific target</i>
1	Бактериофаг дизентерийный поливалентный, раствор для приема внутрь и ректального введения <i>Polyvalent dysentery bacteriophage, oral and rectal solution</i>	<i>Shigella flexneri</i> (серовары (<i>serovars</i>) 1, 2, 3, 4, 6), <i>S. sonnei</i>
2	Бактериофаг дизентерийный поливалентный, таблетки <i>Polyvalent dysentery bacteriophage, tablets</i>	<i>Shigella flexneri</i> (серовары (<i>serovars</i>) 1, 2, 3, 4, 6), <i>S. sonnei</i>
3	Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Purified klebsiella pneumoniae bacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Purified polyvalent klebsiella bacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i>
5	Бактериофаг коли, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>E. coli bacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Escherichia coli</i>
6	Бактериофаг колипротейный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Coli-proteic bacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
7	Бактериофаг протейный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Proteic bacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
8	Бактериофаг псевдомонас аэругиноза (синегнойный), раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Pseudomonas aeruginosa (pyocyanic bacillus) bacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	Бактериофаг сальмонеллезный групп А, В, С, D, Е, раствор для приема внутрь и ректального введения <i>Salmonella bacteriophage (groups A, B, C, D, E), oral and topical solution</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. heidelberg</i> , <i>S. newport</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. newlands</i>
10	Бактериофаг сальмонеллезный групп А, В, С, D, Е, таблетки <i>Salmonella bacteriophage (groups A, B, C, D, E), tablets</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. heidelberg</i> , <i>S. newport</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. newlands</i>
11	Бактериофаг стафилококковый, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Staphylococcal bacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> и другие виды коагулазонегативных стафилококков (<i>and other species of coagulase-negative staphylococci</i>))
12	Бактериофаг стрептококковый, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Streptococcal bacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Streptococcus</i> spp. (в том числе (<i>including</i>) <i>Enterococcus</i> spp.)
13	Пиобактериофаг поливалентный очищенный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Purified polyvalent pyobacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>
14	Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Sextaphage®, polyvalent pyobacteriophage, oral and topical solution</i>	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>
15	Пиофаг®, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения <i>Pyophage®, oral and topical solution</i>	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
16	Интестифаг®, раствор для приема внутрь и ректального введения <i>Intestiphage®, oral and rectal solution</i>	<i>S. flexneri</i> (серовары (<i>serovars</i>) 1, 2, 3, 4, 6), <i>S. sonnei</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i>

Преимущества системного подхода:

- стандартность;
- наличие формализованных требований к качеству препарата;
- возможность быстрого начала приема препарата при появлении симптомов инфекционного заболевания.

Недостатками системного подхода являются:

- высокие требования к условиям производства (GMP);
- высокая стоимость производства;
- существующая вероятность недостаточной эффективности по причине неоднородности популяционной структуры соответствующих возбудителей в различных регионах.

Преимущества персонализированного подхода:

- высокая эффективность;
- принципиально меньшие затраты для организации, разрабатывающей такие препараты и предоставляющей такую услугу, по сравнению с коммерческим производством.

Недостатки более существенны. К ним относятся:

- отсутствие механизмов объективного контроля/надзора эффективности и безопасности при индивидуальном применении бактериофагов в рамках медицинской деятельности;
- отсутствие стандартов контроля и надзора за соблюдением требований к условиям производств по причине отсутствия формализованных требований к условиям «клинического» или «госпитального» производства;
- отсутствие согласованного порядка пополнения коллекционных фондов и их использования при выпуске препаратов;
- повышенные риски в области безопасности продукта;
- длительность процедуры подбора литически активных вариантов бактериофага, т.е. от момента выявления возбудителя до начала приема препарата и дальнейшей оценки его эффективности проходит значительное количество дней и даже недель;
- значительно бóльшая стоимость курса лечения для пациентов (по сравнению с использованием готовых лекарственных препаратов).

Трудности нормативного правового регулирования обращения лекарственных препаратов бактериофагов

Как и все вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека, про-

никающие в органы, ткани организма человека, применяемые для диагностики или лечения заболеваний, бактериофаги должны быть отнесены к лекарственным средствам. Действующая редакция Федерального закона № 61-ФЗ¹⁴ позволяет разделить препараты бактериофагов на две группы: согласно части 5 статьи 13 это готовые лекарственные формы, подлежащие внесению в ГРЛС, и препараты, не подлежащие государственной регистрации, но только в том случае, если они относятся к лекарственным препаратам, изготовленным аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, которые имеют лицензию на фармацевтическую деятельность, по рецептам на лекарственные препараты и требованиям медицинских организаций.

Федеральный закон устанавливает приоритет государственного регулирования безопасности, качества и эффективности лекарственных средств при их обращении.

Отмеченные выше недостатки системного подхода к производству препаратов бактериофагов снижают терапевтическую эффективность лекарственного средства, когда речь идет об инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Видовое разнообразие возбудителей ИСМП (к отдельным патогенам нет зарегистрированного препарата бактериофага), ограничение способов введения в организм больного (пероральный и ректальный), формирование фагоустойчивости у возбудителей ИСМП при длительной терапии наглядно демонстрируют необходимость индивидуального подхода к лечению пациентов, у которых фаготерапия является единственной возможностью остановить инфекционный процесс [37, 38].

Однако, несмотря на очевидную актуальность задачи по расширению применения бактериофагов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний человека посредством персонализации применения лекарственных форм, порядок подтверждения эффективности и безопасности изготавливаемого для индивидуального применения лекарственного средства (медицинского продукта), нормативные правовые основания в настоящее время практически отсутствуют как в Российской Федерации, так и в других странах мира.

В качестве единственного правового основания для персонализированного применения бактериофагов в отдельных странах (США, Индия, Бельгия, Польша, ФРГ, Франция, Грузия) рассматривают Хельсинкскую декларацию

¹⁴ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Всемирной медицинской ассоциации, определяющую основы этических принципов деятельности врачей¹⁵. Статья 37 Хельсинкской декларации предполагает возможность применения в индивидуальном порядке средств и (или) методов с недоказанной эффективностью при наличии согласия пациента в случаях угрозы жизни и недостаточности иных средств и методов. На основании этого сформулирована концепция «терапии милосердия», которая предусматривает расширенный доступ пациентов к экспериментальным препаратам, в наибольшей степени – к биологическим препаратам [39–42]. Условиями такого применения являются:

- все этапы проводятся в рамках государственного контроля (надзора);
- требуется официальная процедура депонирования производственных и контрольных штаммов и фаговых культур;
- все штаммы бактериофагов регистрируются в стране их применения;
- полная характеристика каждого штамма;
- процедуры ведения мастер-банка и системы посевной культуры оцениваются регуляторными органами на соответствие требованиям надлежащей практики;
- итоговое производство активного компонента готового препарата или фармацевтической субстанции («медицинского продукта») осуществляется в строгом соответствии с утвержденными регулятором процедурами;
- вся номенклатура медицинских продуктов проходит контроль качества по фармакопейным методикам по всем показателям спецификации в независимой аккредитованной лаборатории;

- активный компонент или фармацевтическая субстанция допускается регулятором к применению в условиях стационара только на основании результатов оценки соответствия на всех этапах контроля, от посевной культуры до расфасованной продукции, передаваемой для индивидуального применения пациентом в условиях стационара;
- изготовление готовых лекарственных форм и их применение также осуществляются только в соответствии с утвержденными и одобренными регулятором протоколами.

Российская Федерация является единственным государством в мире, на территории которого официально внедрены фармакопейные стандарты качества препаратов бактериофагов.

В 2018 г. в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ) включены общая фармакопейная статья ОФС.1.7.1.0002.15 Бактериофаги¹⁶ и 12 монографий (фармакопейных статей) на отдельные бактериофаги различных МНН, которые утверждены уполномоченным федеральным органом исполнительной власти и содержат описание основных этапов технологического процесса, перечень показателей качества и методов контроля качества конкретных лекарственных форм, описание биологических, микробиологических, химических и других методов анализа лекарственного средства, а также требования к используемым в целях производства и проведения оценки качества готовых лекарственных форм штаммам патогенных микроорганизмов¹⁷.

Также на территорию стран Евразийского экономического союза распространяется действие

¹⁵ <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>

¹⁶ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0002.15 Бактериофаги. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁷ Фармакопейная статья 3.3.1.0063.18 Бактериофаг бактерий дизентерии поливалентный, раствор для приема внутрь и ректального введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0064.18 Бактериофаг бактерий клебсиелл поливалентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0065.18 Бактериофаг бактерий протей, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0066.18 Бактериофаг бактерий брюшного тифа, таблетки. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0078.18 Бактериофаг бактерий кишечной палочки монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0079.18 Бактериофаг бактерий кишечной палочки + протей поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0080.18 Бактериофаг бактерий синегнойной палочки монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0081.18 Бактериофаг бактерий стафилококка монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0082.18 Бактериофаг бактерий стрептококка монокомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0083.18 Бактериофаг бактерий стафилококка + стрептококка + протей + синегнойной палочки + клебсиеллы пневмонии + кишечной палочки поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного

Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза (утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89) в части 18 «Производство, качество, доклинические, клинические исследования лечебно-профилактических препаратов бактериофагов»¹⁸.

Заключение

Недостаточность нормативного правового регулирования не позволяет в полной мере осуществлять государственный контроль и надзор за качеством изготовленных лечебно-профилактических препаратов бактериофагов в случае их применения в рамках персонализированного подхода, а также затрудняет деятельность медицинских организаций по формированию внутренней системы управления качеством при изготовлении препаратов бактериофагов. Дополнительным сложным обстоятельством является то, что Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» не оговариваются правила доклинических и клинических исследований лекарственных средств, предназначенных для изготовления непосредственно в аптечной организации.

В настоящее время практически отсутствуют данные, позволяющие оценить эффективность и безопасность изготовленных лекарственных препаратов бактериофагов, в отличие от препаратов промышленного производства. В связи с объективной необходимостью проведения государственной регистрации и экспертизы

качества препаратов бактериофагов в рамках межведомственного взаимодействия требуется разработка порядка изготовления препаратов бактериофагов и контроля их качества, которая предусматривала бы:

- порядок ведения систем посевных культур с обеспечением требований надлежащих практик;
- правила регистрации действующих веществ, предназначенных для производства, изготовления лекарственных препаратов;
- лицензирование медицинских организаций, осуществляющих изготовление препаратов бактериофагов в рамках отдельных структурных подразделений (производственных аптек);
- внедрение процедур оценки качества готовых лекарственных форм по показателям, предусмотренным фармакопейными требованиями;
- порядок изменения состава действующих веществ готовой лекарственной формы (при необходимости), в том числе процедуры быстрого и эффективного согласования таких изменений.

Эффективность, безопасность и качество изготовленных лекарственных препаратов бактериофагов должны обеспечиваться в процессе государственной регистрации всех компонентов, необходимых для их производства, при соблюдении всех правил их изготовления, с последующими контрольными/надзорными мероприятиями в области их обращения.

Литература/References

1. Давыдов ДС. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI века. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):50–6.
Davydov DS. National Strategy of the Russian Federation for Preventing the Spread of Antimicrobial Resistance: challenges and prospects of controlling one of the global biological threats of the 21st century. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):50–6 (In Russ.).
2. Summers WC. *Félix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. New Haven, Conn: Yale University Press; 1999.
3. Eaton MD, Bayne-Jones S. Bacteriophage therapy: review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *JAMA*. 1934;23:1769–939.
4. Krueger AP, Scribner EJ. Bacteriophage therapy. II. The bacteriophage: its nature and its therapeutic use. *JAMA*. 1941;19:2160–277.
5. Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1999;47(5):267–74.

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

Фармакопейная статья 3.3.1.0084.18 Бактериофаг бактерий стафилококка + энтерококка + стрептококка + синегнойной палочки + клебсиелл + кишечной палочки + протей поликомпонентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0085.18 Бактериофаг бактерий шигелл + сальмонелл + кишечной палочки + протей + энтерококка + стафилококка + синегнойной палочки поликомпонентный, раствор для приема внутрь и ректального введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

¹⁸ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

6. Górski A, Borysowski J, Miedzybrodzki R, Weber-Dabrowska B. Bacteriophages in medicine. In: McGrath S, van Sinderen D, eds. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2007. P. 125–58.
7. Власов ВВ, Тикунова НВ, Морозова ВВ. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине. *Биохимия*. 2020;85(11):1587–600.
Vlasov VV, Tikunova NV, Morozova VV. Bacteriophages as therapeutic preparations: what restricts their application in medicine. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(11):1350–61 (In Russ.).
<https://doi.org/10.1134/S0006297920110061>
8. Алешкин АВ, Алешкин ВА, Афанасьев СС, Галимзянов ХМ, Рубальский ОВ, Теплый ДЛ и др. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть II: Современная история исследований фагопрофилактики и фаготерапии кишечных инфекций. *Астраханский медицинский журнал*. 2016;11(3):8–17.
Aleshkin AV, Aleshkin VA, Afanasiev SS, Galimzyanov KhM, Rubalsky OV, Teplyi DL, et al. Bacteriophages in infectious pathology. Part II: The modern history of studies of phagoprevention and phagotherapy of intestinal infections. *Astrakhan Medical Journal*. 2016;11(3):8–17 (In Russ.).
9. Красильников ИВ, Лыско КА, Отрашевская ЕВ, Лобастова АК. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития. *Сибирский медицинский журнал (г. Томск)*. 2011;26(2-2):33–7.
Krasilnikov IV, Lysko KA, Otrashkevskaya EV, Lobastova AK. Bacteriophage based preparations: a brief survey of current state and future development. *The Siberian Medical Journal*. 2011;26(2):33–7 (In Russ.).
10. Субботин АВ, Функнер ЕВ, Урман МГ. Применение Секстафага в комплексной антибактериальной терапии инфицированного панкреонекроза. В кн.: *Материалы Международной научно-практической конференции «Здоровье и образование»*. Пермь; 2006. С. 191–7.
Subbotin AV, Funkner EV, Urman MG. The use of Sextaphage in complex antibiotic therapy of infected pancreatic necrosis. In: *Materials of the International Scientific and Practical Conference "Health and Education"*. Perm; 2006. P. 191–7 (In Russ.).
11. Акимкин ВГ, Дарбеева ОС, Колков ВФ. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы. *Клиническая практика*. 2010;(4):48–54.
Akimkin VG, Darbeeva OS, Kolkov VF. Historical and modern aspects of bacteriophages application: experience and prospects. *Journal of Clinical Practice*. 2010;(4):48–54 (In Russ.).
12. Сигарева ЛП., Бунтовская АС. Перспективы применения бактериофагов для профилактики дисбактериоза. В кн.: *II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации»*. СПб; 2018. С. 331–4.
Sigareva LP, Buntovskaya AS. Prospects for the use of bacteriophages for the prevention of dysbiosis. In: *II All-Russian scientific-practical conference with international participation "National healthcare innovations"*. Saint Petersburg; 2018. P. 331–4 (In Russ.).
13. Балянова ЕГ, Бойков СА, Картавцева АВ, Шатохина НС. Комплексное лечение бронхообструктивных заболеваний у детей младшего возраста с использованием бактериофагов. В кн.: *Науки о человеке. Сборник статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов*, Огородова ЛМ, Капилевич ЛВ, ред. Томск: СГМУ; 2003. С. 61.
Balyanova EG, Boikov SA, Kartavtseva AV, Shatokhina AV. Comprehensive treatment of airflow obstruction diseases in young children using bacteriophages. In: *Human Sciences. Collection of articles by young scientists and specialists*, Ogorodova LM, Kapilevich LV, eds. Tomsk: SGMU; 2003. P. 61 (In Russ.).
14. Асланов БИ, Любимова АВ, Зуева ЛП, Малашенко АА, Шалаяпина НА, Рубин ГВ. Бактериофаги для купирования вспышки, вызванной *Staphylococcus aureus*, в отделении реанимации новорожденных. *Медицинский альманах*. 2015;(5):115–8.
Aslanov BI, Lyubimova AV, Zueva LP, Malashenko AA, Shalyapina NA, Rubin GV. Bacteriophages for stopping the breakout of infection caused by *Staphylococcus aureus* in resuscitation ward for the newborn. *Medical Almanac*. 2015;(5):115–8 (In Russ.).
15. Хавкин АИ, Алешкин АВ, Зейгарник МВ. Перспективы фаготерапии при болезнях органов пищеварения у детей. *Вопросы практической педиатрии*. 2018;13(4):82–90.
Khavkin AI, Aleshkin AV, Zeigarnik MV. Potential of phage therapy in digestive diseases in children. *Voprosy prakticheskoi pediatrii*. 2018;13(4):82–90 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20953/1817-7646-2018-4-82-90>
16. Брюсов ПГ, Зубрицкий ВФ, Исламов РН, Низовой АВ, Фоминых ЕМ. Фагопрофилактика и фаготерапия хирургических инфекций. *Военно-медицинский журнал*. 2011;332(4):34–9.
Bryusov PG, Zubritsky VF, Islamov RN, Nizovoy AV, Fominykh EM. Phagoprophylaxis and bacteriophage treatment of surgical infections. *Military Medical Journal*. 2011;332(4):34–9 (In Russ.).
17. Габриэлян НИ, Горская ЕМ, Цирульников ОМ. Возможности использования бактериофагов в хирургии и трансплантологии. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012;14(1):106–13.
Gabrielyan NI, Gorskaya EM, Tsurulnikova OM. Possibilities of bacteriophages application in surgery and transplantation. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2012;14(1):106–13 (In Russ.).
18. Самохин АГ, Фёдоров ЕА, Козлова ЮН, Тикунова НВ, Павлов ВВ, Морозова ВВ, Кретьен СО. Применение литических бактериофагов при хирургическом лечении парапротезной инфекции эндопротеза тазобедренного сустава (пилотное исследование). *Современные проблемы науки и образования*. 2016;(6):209.
Samokhin AG, Fedorov EA, Kozlova YN, Tikunova NV, Pavlov VV, Morozova VV, Kreten SO. Application of the lytic bacteriophages during surgical treatment

- of the periprosthetic infection of the hip joint endoprosthesis (pilot study). *Modern Problems of Science and Education. Surgery*. 2016;(6):209 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17513/spno.25851>
19. Кожарская ГВ. Применение синегнойного бактериофага при лечении гнойного осложнения после абдоминопластики. *Инфекция и иммунитет*. 2017;5:781.
Kozharskaya GV. The use of pseudomonas bacteriophage in the treatment of purulent complications after abdominoplasty. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017;5:781 (In Russ.).
 20. Бесчастнов ВВ, Леонтьев АЕ, Рябков МГ, Юданова ТН, Кичин ВВ, Павленко ИВ и др. Использование бактериофагов для профилактики инфекций области хирургического вмешательства при свободной кожной пластике. *МедиАль*. 2019;(1):19–21.
Beschastnov VV, Leontiev AE, Ryabkov MG, Yudanov TN, Kichin VV, Pavlenko IV, et al. The use of bacteriophages for prevention of infections in the surgical area at free skin grafting. *MediAl*. 2019;(1):19–21 (In Russ.).
 21. Леонтьев АЕ, Павленко ИВ, Ковалишена ОВ, Саперкин НВ, Тулупов АА, Бесчастнов ВВ. Применение фаготерапии в лечении ожоговых больных. *Современные технологии в медицине*. 2020;12(3):95–104.
Leontyev AE, Pavlenko IV, Kovalishena OV, Saperkin NV, Tulupov AA, Beschastnov VV. Application of phagotherapy in the treatment of burn patients (review). *Modern Technologies in Medicine*. 2020;12(3):95–104 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17691/stm2020.12.3.12>
 22. Бесчастнов ВВ, Юданова ТН, Бегун СМ, Лузан АС, Широкова ИЮ, Белянина НА и др. Использование гидрогелевых раневых покрытий в комбинации с бактериофагами. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2020;13(3):279–84.
Beschastnov VV, Yudanov TN, Begun SM, Luzan AS, Shirokova IYu, Belyanina NA, et al. Application of hydrogel wound dressings combined with bacteriophages. *Journal of Experimental and Clinical Surgery*. 2020;13(3):279–84 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18499/2070-478X-2020-13-3-279-284>
 23. Ворошилова НН, Алферова ЭВ, Дарбеева ОС, Майская ЛМ, Перепанова ТС, Лазарева ЕБ и др. Изучение клинической эффективности препарата бактериофага энтеробактер поливалентного очищенного. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2010;(2):31–3.
Voroshilova NN, Alferova EV, Darbeeva OS, Mayskaya LM, Perepanova TS, Lazareva EB, et al. Study of the clinical efficacy of the purified polyvalent Enterobacter bacteriophage preparation. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2010;(2):31–3 (In Russ.).
 24. Степанова НР, Геворкян МА. Бактериофаги: аспекты применения в акушерстве и гинекологии. *Медицинский совет*. 2015;(9):10–4.
Stepanova NR, Gevorkyan MA. Bacteriophages: application in obstetrics and gynecology. *Medical Council*. 2015;(9):10–4 (In Russ.).
 25. Перепанова ТС, Малова ЮА, Толордава ЭР, Круглов АН. Профилактика и терапия препаратами бактериофагов инфекций мочевых путей. В кн.: *Материалы Четвертой научно-практической конференции с международным участием «БАКТЕРИОФАГИ: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» к 70-летию профессора В.А. Алешкина*. М.; 2018. С. 57.
Perepanova TS, Malova YuA, Tolordava ER, Kruglov AN. Bacteriophage prevention and therapy of urinary tract infections. In: *Fourth International Scientific Conference "BACTERIOPHAGES: Theoretical and Practical Aspects of Their Application in Medicine, Veterinary and Food" to the 70th Anniversary of professor V.A. Aleshkin*. Moscow; 2018. P. 57 (In Russ.).
 26. Васильев АО, Зайцев АВ, Калинина НА, Ширяев АА, Ким ЮА, Пушкар ДЮ. Бактериофаги в лечении инфекций нижних мочевыводящих путей. *Consilium medicum*. 2019;21(7):38–41.
Vasilyev AO, Zaitsev AV, Kalinina NA, Shiriaev AA, Kim YuA, Pushkar DYU. Bacteriophages in treatment of low urinary tract infections. *Consilium medicum*. 2019;21(7):38–41 (In Russ.).
<https://doi.org/10.26442/20751753.2019.7.190511>
 27. Зефирова ТП, Алёшкин АВ. Вирусная польза. Бактериофаги и профилактическая медицина. *StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак*. 2019;(4):125–30.
Zefirova TP, Aleshkin AV. Viral benefits. Bacteriophages and preventive medicine. *StatusPraesens. Ginekologiya, akusherstvo, besplodnyi brak*. 2019;(4):125–30 (In Russ.).
 28. Хараева ЗФ, Блиева ЛЗ, Шорова ДХ, Эльмурзаева ДА, Накова ЛВ. Антибиотикочувствительность штаммов Staphylococcus aureus, выделенных у бактерионосителей и результаты применения препаратов бактериофагов для санации носоглотки. *Успехи современной науки и образования*. 2016;8(12):104–6.
Kharaeva ZF, Blieva LZ, Shorova DKh, Elmurzaeva JA, Nakova LV. Antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus strains isolated from bacteria carriers and the results of the use of bacteriophage for rehabilitation of the nasopharynx. *Success of Modern Science and Education*. 2016;8(12):104–6 (In Russ.).
 29. Дмитриева НА, Мишина АВ. Перспективы применения бактериофагов у пациентов клиники стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. *Стоматология*. 2018;97(6-2):33.
Dmitrieva NA, Mishina AV. Prospects for the use of bacteriophages in patients of the dental and maxillofacial surgery clinic. *Dentistry*. 2018;97(6-2):33 (In Russ.).
 30. Рязанцев СВ, Шахов АВ, Абдулкеримов ХТ. Роль и место бактериофагов в современной оториноларингологии. *Медицинский совет*. 2019;(8):72–5.
Ryzantsev SV, Shakhov AV, Abdulkherimov KhT. The role and place of bacteriophages in modern otorhinolaryngology. *Medical Council*. 2019;(8):72–5 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-8-72-75>

31. Ганненко АС, Мирошниченко ВВ, Масимов А. Применение бактериофагов для лечения воспалительных заболеваний пародонта. *Проблемы стоматологии*. 2020;16(1):64–9.
Gannenko AS, Miroshnichenko BB, Masimov A. Application of bacteriophages in inflammatory periodontal disease treatment. *Actual Problems in Dentistry*. 2020;16(1):64–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18481/2077-7566-20-16-1-64-69>
32. Талыбова ДХ, Новрузова МС, Байрамова РС, Алиева ХМ. Использование стафилококкового бактериофага при лечении хронического отита. *Медицинские новости*. 2020;(5):61–3.
Talibova JKh, Novruzova MS, Bayramova RS, Aliyeva KhM. Use of staphylococcal bacteriophage in the treatment of chronic otitis. *Meditinskie novosti*. 2020;(5):61–3 (In Russ.).
33. Сережин ИН, Даутова ЗА, Никова ГА, Фаттахов ВТ. Первые результаты применения полибактериофага поливалентного в профилактике раневой инфекции глаза. В кн.: *Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы офтальмологии»*. Уфа; 1996. С. 24.
Seryezhin IN, Dautova ZA, Nikova GA, Fattakhov VT. The first results of the use of polyvalent polybacteriophage in the prevention of eye wound infection. In: *Proceedings of the scientific and practical conference "Vital Problems of Ophthalmology"*. Ufa; 1996. P. 24 (In Russ.).
34. Асланов БИ, Любимова АВ, Зуева ЛП. Бактериофаги как эффективные противоэпидемические средства для купирования вспышек внутрибольничных инфекций. *Журнал инфектологии*. 2019;11(1):65–70.
Aslanov BI, Lubimova AV, Zueva LP. Bacteriophages as effective antiepidemic agents for control of hospital-acquired infection outbreaks. *Journal Infectology*. 2019;11(1):65–70 (In Russ.).
<https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-65-70>
35. Куракин ЭС. Применение бактериофага в профилактике и лечении госпитального шигеллеза. *Инфекция и иммунитет*. 2017;(5):724.
Kurakin ES. The use of the Shigella bacteriophage in the prevention and treatment of hospital-acquired shigellosis. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017;(5):724 (In Russ.).
36. Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, Merabishvili M, Chanishvili N, Vaneechoutte M., et al. The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure? *Pharm Res*. 2011;28(4):934–37.
<https://doi.org/10.1007/s11095-010-0313-5>
37. Алешкин АВ, Селькова ЕП, Ершова ОН, Савин ИА, Шкода АС, Бочкарева СС и др. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2018;3(2):66–74.
Aleshkin AV, Sel'kova EP, Ershova ON, Savin IA, Shkoda AS, Bochkareva SS, et al. Concept of personalized phage therapy for intensive care unit patients with healthcare-associated infections. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2018;3(2):66–74 (In Russ.).
<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2018-3-2-66-74>
38. Киселева ИА, Алешкин АВ, Ершова ОН, Воложанцев НВ, Светоч ЭА, Новикова ЛИ, Бочкарева СС. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: пути повышения эффективности. *Инфекция и иммунитет*. 2016;6(3):44.
Kiseleva IA, Aleshkin AV, Ershova ON, Volozhantsev NV, Svetoch EA, Novikova LI, Bochkareva SS. Bacteriophages in the prevention of healthcare-associated infections: ways to increase the effectiveness. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2016;6(3):44 (In Russ.).
39. McCallin S, Sacher JC, Zheng J, Chan BK. Current state of compassionate phage therapy. *Viruses*. 2019;11(4):343.
<https://doi.org/10.3390/v11040343>
40. Slater JE, Menzies SL, Bridgewater J, Mosquera A, Zinderman CE, Ou AC, et al. The US Food and Drug Administration review of the safety and effectiveness of nonstandardized allergen extracts. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):1014–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.066>
41. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. *Curr Microbiol*. 2017;74(2):277–83.
<https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x>
42. Ландышев НН, Воронько ЯГ, Тимошина ОЮ, Сулина СН, Акимкин ВГ, Мирошников КА. Обзор законодательства в области обращения персонализированных препаратов бактериофагов. *Вопросы вирусологии*. 2020;65(5):259–66.
Landyshev NN, Voronko YG, Timoshina OYu, Suslina SN, Akimkin VG, Miroshnikov KA. A review of the regulatory framework for personalized bacteriophages registration. *Problems of Virology*. 2020;65(5):259–66 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Д.С. Давыдов** — дизайн статьи, обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; **Р.Л. Парфенюк**, **З.В. Дурманова** — анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; **В.А. Меркулов** — консультативная помощь в анализе результатов, окончательное утверждение версии

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **D.S. Davydov** designed the article, processed and analysed literature data, and wrote the text of the manuscript. **R.L. Parfenyuk** and **Z.V. Durmanova** analysed literature data and edited the text of the manuscript. **V.A. Merkulov** provided advisory assistance in the analysis of the results

рукописи для публикации; **А.А. Мовсесянц** — критическое обсуждение текста рукописи, утверждение версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. В.А. Меркулов является главным редактором, А.А. Мовсесянц — членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

and approved the final version of the manuscript for publication. **A.A. Movsesyants** contributed to the critical discussion of the text of the manuscript and approved the final version for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting 121022000147-4).

Conflict of interest. Vadim A. Merkulov is the Editor-in-Chief, and A.A. Movsesyants is a member of the Editorial Board of the journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-362>
Davydov@expmed.ru

Парфенюк Римма Леонтьевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8190-9299>
Parfenuk@expmed.ru

Дурманова Зоя Владимировна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2845-1359>
Durmanova@expmed.ru

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
merkulov@expmed.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
Movsesyants@expmed.ru

Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-362>
Davydov@expmed.ru

Rimma L. Parfenyuk, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8190-9299>
Parfenuk@expmed.ru

Zoya V. Durmanova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2845-1359>
Durmanova@expmed.ru

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

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
Movsesyants@expmed.ru

Поступила 04.02.2022

После доработки 24.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Online first 23.01.2023

Received 4 February 2022

Revised 24 August 2022

Accepted 26 August 2022

Online first 23 January 2023



Обзор методов определения соединений углеводной природы в биологических лекарственных препаратах

А.С. Минеро✉, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова

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

✉ Минеро Анастасия Сальвадоровна; minero@expmed.ru

Резюме

Соединения углеводной природы широко используются в качестве наполнителей и стабилизаторов в биологических лекарственных препаратах (БЛП). Наличие данных соединений в составе лекарственного препарата гарантирует стабильность действующего вещества в процессе производства, транспортирования и хранения. При этом нормирование содержания вспомогательных веществ и их количественное определение является фармакопейным требованием к оценке качества БЛП.

Цель работы — выявление перспективных методов для разработки методик количественного определения соединений углеводной природы в биологических лекарственных препаратах.

Проведен анализ нормативных документов зарегистрированных в Российской Федерации БЛП. Показано, что наиболее часто в качестве вспомогательных веществ используются полиолы (сорбитол и маннитол), моносахариды (глюкоза), дисахариды (трегалоза, сахароза, лактоза, мальтоза) как по отдельности, так и в смесях различного состава. На основании данных научной литературы рассмотрены методы количественного определения полиолов, моно- и дисахаридов, применяемые при оценке качества БЛП. Для количественного определения стабилизаторов углеводной природы применяют титриметрические, спектрофотометрические, ферментативные, хроматографические методы. Представлен анализ достоинств и недостатков данных методов. Показаны преимущества метода ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с амперометрическим детектированием и метода гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием и испарительным детектором светорассеяния, обладающих достаточной селективностью и способностью идентификации исходных веществ без дериватизации. Сделан вывод о перспективности разработки методик определения стабилизаторов углеводной природы на основе методов ионообменной и гидрофильной ВЭЖХ.

Ключевые слова: биологические лекарственные препараты; вспомогательные вещества; сорбитол; маннитол; глюкоза; трегалоза; лактоза; сахароза; мальтоза; ВЭЖХ

Для цитирования: Минеро А.С., Рунова О.Б., Устинникова О.Б. Обзор методов определения соединений углеводной природы в биологических лекарственных препаратах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):194–202. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-442>

Quantification methods for carbohydrate compounds in biologicals: a review

A.S. Minero ✉, O.B. Rounova, O.B. Ustinnikova

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

✉ Anastasia S. Minero; minero@expmed.ru

Abstract

Carbohydrate compounds are widely used as fillers and stabilisers in biological products. When present, these compounds guarantee that the active pharmaceutical ingredient will remain stable during production, transportation, and storage. At the same time, pharmacopoeias standardise the excipient content and require that excipients should be quantified for assessing the quality of biological products.

The aim of the study was to identify promising methods for the development of quantification procedures for carbohydrate compounds in biological products.

The authors analysed regulatory documents for biological products approved in the Russian Federation. The most widely used excipients, both individually and in combinations, are polyols (sorbitol and mannitol), monosaccharides (glucose), and disaccharides (trehalose, sucrose, lactose, and maltose). Using literature data, the authors reviewed the methods used for quantifying polyols, monosaccharides, and disaccharides to assess the quality of biological products. Quantitative determination of carbohydrate stabilisers employs titrimetric, spectrophotometric, enzymatic, and chromatographic methods. This review presents an analysis of the advantages and disadvantages of these methods. It highlights the advantages of ionic HPLC with amperometric detection and hydrophilic HPLC with refractometric and evaporative light scattering detection, which are sufficiently selective and can identify substances without prior derivatisation. In conclusion, ionic and hydrophilic HPLC methods are a promising base for the development of quantification procedures for carbohydrate stabilisers.

Key words:

biological products; excipients; sorbitol; mannitol; glucose; trehalose; lactose; sucrose; maltose; HPLC

For citation:

Minero A.S., Rounova O.B., Ustinnikova O.B. Quantification methods for carbohydrate compounds in biologicals: a review. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):194–202. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-442>

Введение

Большинство биологических лекарственных препаратов (БЛП), основным действующим веществом которых является терапевтически активный белок (моноклональные антитела, факторы свертываемости крови, цитокины, субъединичные вакцины и т.д.), из-за недостаточной стабильности активных компонентов в растворе производят в лиофилизированной форме. Для сохранения структурной стабильности

и активности действующего вещества в процессе лиофилизации применяют криопротекторы и лиопротекторы [1–3], в качестве которых часто используют соединения углеводной природы (полиолы, моносахариды, дисахариды и др.). Те же соединения выполняют функции стабилизаторов и модификаторов тоничности в составе БЛП, имеющих форму растворов. Количественное определение веществ, вносимых в лекарственный препарат, является фармакопейным требованием¹.

¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0012.18 Интерфероны. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0014.18 Моноклональные антитела для медицинского применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0015.18 Филграстимы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0016.18 Эритропоэтины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0017.18 Генно-инженерные препараты инсулина человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Для каждого препарата белковой природы оптимальное соотношение белок/углевод(ы), а также состав стабилизирующей углеводной смеси будут индивидуальными [3]. При этом выбор метода количественной оценки углеводных стабилизаторов может зависеть как от структурных особенностей углевода и состава смеси, так и от технических возможностей производителя. Данные факторы при отсутствии фармакопейных требований и методических рекомендаций приводят к большому разнообразию решений со стороны производителей, что, в свою очередь, затрудняет экспертизу качества как на этапах регистрации, так и на этапах введения в гражданский оборот большой группы БЛП.

Цель работы – выявление перспективных методов для разработки методик количественного определения соединений углеводной природы в биологических лекарственных препаратах.

Основная часть

На основании анализа состава БЛП, зарегистрированных в Российской Федерации, были

определены часто используемые в качестве вспомогательных веществ соединения углеводной природы: полиолы (сорбитол и маннитол [4]), моносахариды (глюкоза²), дисахариды (трегало-за [5], сахароза [6], лактоза³, мальтоза⁴) (рис. 1).

В оценке качества БЛП с целью количественного определения стабилизаторов углеводной природы применяют методы спектрофотометрии, титриметрии, поляриметрии, рефрактометрии и хроматографии.

Спектрофотометрические и титриметрические методы используют для определения восстанавливающих углеводов, которые могут вступать в окислительно-восстановительные химические реакции с образованием осадков или цветных комплексов⁵ [7]. При этом невосстанавливающие сахара (сахароза и трегалоза) предварительно подвергают инверсии. Например, метод с антроновым реактивом⁶ основан на химическом разрушении углеводов до фурфуrolа или гидроксиметилфурфуrolа, который при реакции с антроном образует комплексное соединение синевато-зеленого цвета,

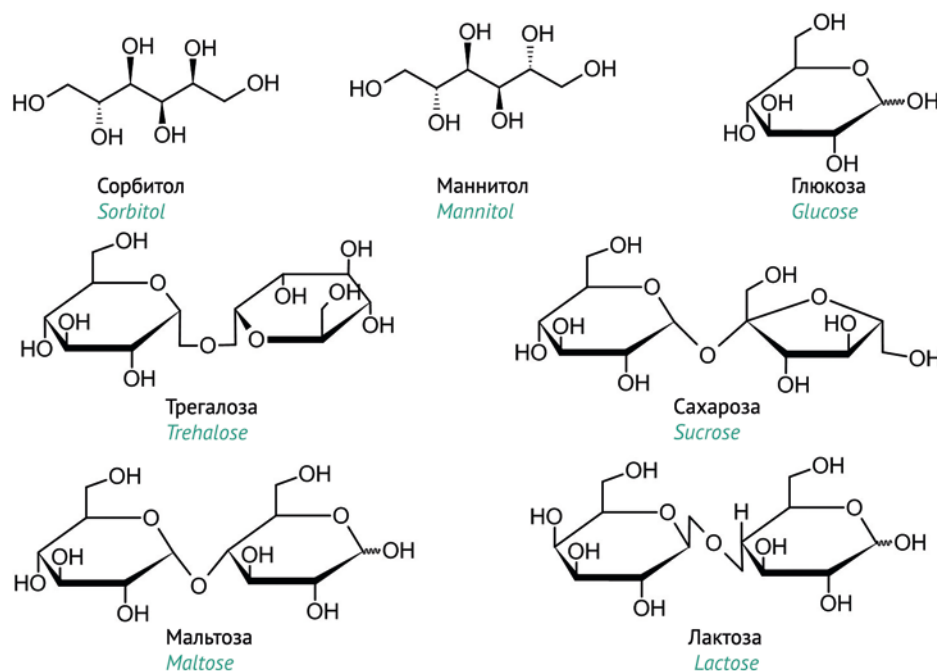


Рис. 1. Структурные формулы стабилизаторов углеводной природы.

Fig. 1. Structural formulas of carbohydrate stabilisers.

Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/monosaccharides>

³ <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/disaccharide>

⁴ Там же.

⁵ ГОСТ Р 54667-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров.

⁶ Общая фармакопейная статья 1.2.3.0019.15 Определение сахаров спектрофотометрическим методом. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

интенсивность окраски которого прямо пропорциональна содержанию углевода в реакционной среде [8]. Антроновый и другие спектрофотометрические и титриметрические методы используют в оценке качества некоторых БЛП, например для определения декстрозы и мальтозы в некоторых препаратах иммуноглобулинов.

К достоинствам спектрофотометрических и титриметрических методов можно отнести сравнительно невысокую стоимость, к недостаткам — невозможность их применения для оценки качества БЛП, в составе которых присутствуют два и более углевода, так как эти методы не обладают достаточной селективностью.

С использованием спектрофотометрического метода проводят определение глюкозы и маннитола, основанное на химических реакциях, катализируемых ферментами, например окисление маннитола до фруктозы, а глюкозы до глюконолактона⁷. Концентрация восстановленного при этом никотинамидадениндинуклеотида пропорциональна концентрации исходного углевода и определяется спектрофотометрически при длине волны (340±30) нм. Ферментативный метод определения глюкозы также можно применить для количественного определения дисахаридов (лактоза, мальтоза, сахароза, трегалоза), в составе которых есть глюкоза. Для этого дисахариды предварительно ферментативно гидролизуют до моносахаридов. Так, например, ферментативный спектрофотометрический метод определения глюкозы используют для определения содержания сахарозы в оценке качества некоторых препаратов факторов свертываемости крови, для определения лактозы в менингококковых вакцинах.

К достоинствам ферментативных методов определения относят селективность, чувствительность, наличие готовых коммерческих наборов, включающих практически все необходимые реактивы для определения того или иного углевода. Недостатком данной группы методов является невозможность применения одной унифицированной методики для количественного определения разных классов углеводов, так как для каждого углевода применяется свой уникальный фермент, невозможность автоматизации метода и возможное влияние действующего вещества и других вспомогательных веществ, входящих в состав БЛП.

Рефрактометрический и поляриметрический⁸ методы, основанные на измерении коэффициента преломления и угла вращения плоскости

поляризации монохроматического света соответственно, применяются в оценке качества некоторых препаратов вакцин, содержащих в качестве вспомогательного вещества только одно соединение углеводной природы. Существенным недостатком этих методов является отсутствие селективности и возможное влияние действующего вещества и других соединений, входящих в состав лекарственного препарата.

В случае применения хроматографических методов количественного определения полиолов, незамещенных моно- и дисахаридов следует учитывать особенности строения углеводов (рис. 1). Так, например, методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в tandem с флуориметрическим и спектрофотометрическим детектированием не могут быть использованы для определения перечисленных углеводных соединений в интактной форме, так как их молекулы не обладают собственной флуоресценцией и не имеют хромофорных групп. Газовая хроматография (ГХ) также не может быть использована, так как перечисленные соединения в интактной форме не являются летучими.

Решением проблемы может быть дериватизация исходного анализа с получением производных соединений, пригодных для соответствующего хроматографического разделения и детектирования [9]. Известно множество дериватизирующих реагентов, используемых в ВЭЖХ для определения углеводов в ультрафиолетовом и видимом диапазоне, например 2,4-динитрофенил гидразин [10], 1-фенил-3-метил-5-пиразолон [11], этиловый эфир п-аминобензойной кислоты [12]. Перечисленные реактивы не только позволяют детектировать углеводы, но также придают исходным соединениям новые свойства. Так, например, при дериватизации глюкозы 2,4-динитрофенилгидразином полученное производное становится более гидрофобным, что позволяет использовать сорбенты для обращенно-фазовой хроматографии [10]. Классические методы дериватизации, применяемые в ГХ, основаны на замещении полярных групп углеводов для повышения их летучести. Метилловые эфиры, ацетаты, трифторацетаты, метилоксимы и триметилсилиловые эфиры являются наиболее распространенными производными, используемыми для определения углеводов. Хорошие характеристики летучести и стабильности образующихся производных делают триметилсилиловые эфиры наиболее популярными производными, применяемыми для ГХ-анализа

⁷ <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.118>

⁸ ГОСТ Р 54667-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров.

сахаридов и многоатомных спиртов [13–15]. В литературе [16] описан метод определения восстанавливающих моно- и дисахаридов (глюкоза, лактоза и мальтоза) с помощью постколоночной дериватизации с реактивом неокупроин (2,9-диметил-1,10-фенантролин). Метод основан на восстановлении ионов меди с помощью восстанавливающих сахаров в присутствии неокупроина в щелочной среде с последующим измерением оптической плотности желтого хелата $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ при длине волны 450 нм. При этом для разделения углеводов используется метод гидрофильной ВЭЖХ на аминопропил-модифицированной неподвижной фазе.

Недостатком использования процедуры дериватизации является усложнение методики из-за дополнительных стадий пробоподготовки, а также влияние на воспроизводимость методики и точность полученного результата. Кроме того, среди зарегистрированных в Российской Федерации БЛП найден только один пример применения предколоночной дериватизации для определения сахарозы методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором в препарате фактора свертываемости крови. Примеры применения постколоночной дериватизации для количественной оценки стабилизаторов углеводной природы в производстве/контроле БЛП не найдены.

Для количественной оценки стабилизаторов углеводной природы производители БЛП применяют методы жидкостной хроматографии, совместимые с такими способами детекции, которые не требуют дополнительных стадий пред- или постколоночной дериватизации. К таким детекторам относятся: детектор заряженных аэрозолей, испарительный детектор светорассеяния, масс-спектрометрический, амперометрический и рефрактометрический детекторы. При этом последний совместим с несколькими техниками хроматографического разделения: гидрофильная, лигандообменная/ион-эксклюзивная и ионообменная ВЭЖХ [17–21].

Большое разнообразие сорбентов с различными привитыми фазами позволяет без особых трудностей количественно определять маннитол, сорбитол, глюкозу, трегалозу, лактозу, сахарозу и мальтозу по отдельности или в смесях определенного состава, например только дисахариды или полиолы и моносахариды. Однако перечисленные соединения углеводной природы (рис. 1) обладают похожими химическими структурами. В связи с этим хроматографическое разделение смеси этих углеводов в изократических условиях может быть затруднительным, что уменьшает вероятность использования рефрактометрического детектирования в ВЭЖХ методиках одновремен-

ного определения полиолов, моно- и дисахаридов, так как такой способ детекции не совместим с градиентными режимами элюирования.

Детектор заряженных аэрозолей [22–24] и испарительный детектор светорассеяния [20, 25, 26] совместимы с градиентным режимом элюирования, что в теории может позволить разделить смесь углеводов с похожим химическим составом. Однако данные способы детекции требуют подведения инертного газа стабильного давления, что, в свою очередь, требует дополнительных затрат. В настоящее время вышеуказанные способы детектирования постепенно внедряются в практику экспертизы качества БЛП, но пока их сложно рассматривать в качестве базового оснащения лабораторий.

Масс-спектрометрический способ детектирования в тандеме с жидкостной или газовой хроматографией [27] обладает большей чувствительностью, однако не является оптимальным с экономической точки зрения и не встречается в оценке качества БЛП для определения вспомогательных веществ углеводной природы, зарегистрированных в Российской Федерации.

Основным недостатком гидрофильной ВЭЖХ углеводов является применение высококонцентрированных растворов органических растворителей, во-первых, из-за низкой растворимости аналитов в таких подвижных фазах, а во-вторых, из-за токсичности этих растворителей.

Применение в качестве неподвижных фаз сорбентов на основе сульфированного сшитого сополимера стирола с дивинилбензолом в кальцевой, натриевой, калиевой или другой формах в методах ион-эксклюзивной/лигандообменной ВЭЖХ исключает необходимость применения органических растворителей. Однако в связи с тем, что глюкоза, мальтоза и лактоза в водных растворах существуют в виде α - и β -изомеров, хроматографическое разделение этих углеводов на таких колонках следует проводить при высоких температурах (40–85 °C), чтобы пики аналитов не раздваивались. Такие условия могут быть затруднительными для некоторых моделей хроматографического оборудования.

Кроме перечисленных методов в литературе встречается применение жидкостной хроматографии с повышенной текучестью на гидрофильной неподвижной фазе для определения углеводов [28]. В качестве подвижной фазы в методе используются органические или водно-органические растворители в смеси с большим количеством сжатых газов, например диоксида углерода. Такая подвижная фаза обеспечивает высокую скорость диффузии, низкую вязкость и высокую растворяющую способность, кроме того, использование

подвижных фаз с меньшим содержанием органических растворителей делает этот метод более экологичным по сравнению с другими хроматографическими методами. К недостаткам жидкостной хроматографии с повышенной текучестью можно отнести высокую стоимость оборудования.

Соединения углеводной природы кроме ранее перечисленных недостатков обладают свойством окисляться на поверхности электрода при приложении определенного потенциала. К тому же при высоких значениях pH они ионизируются с образованием отрицательно заряженных ионов, что позволяет применять анионообменную хроматографию для количественной оценки углеводов [29, 30]. В качестве подвижных фаз используются водные растворы гидроксидов, ацетатов и других соединений щелочных металлов. Основными достоинствами метода ионной хроматографии с амперометрическим детектированием являются высокая чувствительность, минимизация возможного влияния других вспомогательных веществ в анализируемом БЛП (например, аминокислот) за счет программируемого изменения потенциалов на электродах, а также возможность использования автоматического генератора элюентов, который позволяет исключить ручное приготовление растворов подвижных фаз. К недостаткам метода можно отнести необходимость коррозионностойкого исполнения жидкостных трактов хроматографической системы и колонки, а также чувствительность растворов подвижной фазы к углекислому газу воздуха, что требует подведения инертного газа.

В настоящее время метод анионообменной ВЭЖХ применяется в оценке качества препаратов факторов свертывания крови для определения маннитола и сахарозы, препаратов иммуноглобулинов для определения мальтозы.

Таким образом, для количественного определения стабилизаторов углеводной природы производители БЛП применяют как сравнительно простые методы, например титриметрические, так и высокотехнологичные, требующие наличия дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала, например методы ВЭЖХ. При этом и те, и другие методы имеют свои достоинства и недостатки (табл. 1).

На основании представленных данных можно сделать вывод о преимуществе метода ионообменной ВЭЖХ с амперометрическим детектированием и метода гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием и испарительным детектором светорассеяния, обладающих достаточной селективностью и способностью идентификации исходных веществ без дериватизации.

Заключение

Рассмотрены методы определения стабилизаторов углеводной природы в составе биологических лекарственных препаратов (сорбитол, маннитол, моно- и дисахариды) как в модельных растворах, так и в сложных смесях, содержащих различные сопутствующие компоненты. Показано, что для количественной оценки содержания соединений углеводной природы

Таблица 1. Преимущества и недостатки методов определения стабилизаторов углеводной природы, применяемых в оценке качества биологических лекарственных препаратов (БЛП)

Table 1. Advantages and disadvantages of methods used for quantifying carbohydrate stabilisers to assess the quality of biological products

Метод <i>Method</i>	Преимущества <i>Advantages</i>	Недостатки <i>Disadvantages</i>
Спектрофотометрический и титриметрический <i>Spectrophotometry and titrimetry</i>	Сравнительно невысокая стоимость реактивов и оборудования <i>Relatively low cost of reagents and equipment</i>	– Трудоемкость. – Возможное неспецифическое влияние действующего вещества или других вспомогательных веществ БЛП. – Невозможность определения индивидуальных углеводов в смеси <i>– High labour input.</i> <i>– Possible non-specific effects of an active ingredient or other excipients in the biological product.</i> <i>– Inability to quantify individual carbohydrates in a mixture</i>
Поляриметрический и рефрактометрический <i>Polarimetry and refractometry</i>	– Сравнительно невысокая стоимость реактивов и оборудования. – Простота и быстрота анализа <i>– Relatively low cost of reagents and equipment.</i> <i>– Simplicity and speed of analysis</i>	– Возможное неспецифическое влияние действующего вещества или других вспомогательных веществ БЛП. – Невозможность определения индивидуальных углеводов в смеси <i>– Possible non-specific effects of an active ingredient or other excipients in the biological product.</i> <i>– Inability to quantify individual carbohydrates in a mixture</i>
Ферментативный <i>Enzymatic method</i>	Высокая специфичность <i>High specificity</i>	– Необходимость применения уникального фермента для каждого углевода. – Необходимость использования коммерческих наборов/тест-систем <i>– Need for a unique enzyme for each carbohydrate.</i> <i>– Need for commercial kits / test-systems</i>

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Метод <i>Method</i>	Преимущества <i>Advantages</i>	Недостатки <i>Disadvantages</i>
Метод газовой хроматографии <i>Gas chromatography</i>	– Чувствительность. – Высокая специфичность и селективность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа – <i>Sensitivity.</i> – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Необходимость предколоночной дериватизации – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Need for pre-column derivatisation</i>
Метод гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием <i>Hydrophilic HPLC with refractive index detection</i>	– Высокая специфичность и селективность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа. – Большое разнообразие неподвижных фаз – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability.</i> – <i>Wide variety of stationary phases available</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Применение токсичных растворителей. – Низкая чувствительность по сравнению с другими хроматографическими методами. – Несовместимость с градиентным режимом элюирования – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Toxic solvents.</i> – <i>Low sensitivity compared to other chromatographic methods.</i> – <i>Incompatibility with gradient elution</i>
Метод гидрофильной ВЭЖХ с детектором светорассеяния <i>Hydrophilic HPLC with light scattering detection</i>	– Высокая специфичность и селективность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа. – Большое разнообразие неподвижных фаз. – Совместимость с градиентным режимом элюирования – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability.</i> – <i>Wide variety of stationary phases available.</i> – <i>Compatibility with gradient elution</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Применение токсичных растворителей – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Toxic solvents</i>
Метод ион-эксклюзионной ВЭЖХ <i>Ion-exclusion HPLC</i>	– Высокая специфичность и селективность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа. – Не используются токсичные растворители – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability.</i> – <i>Non-toxic solvents</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Как правило, существует необходимость проводить разделение при высоких температурах (около 70 °C). – Несовместимость с градиентным режимом элюирования – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Need for high-temperature (~70 °C) separation (generally).</i> – <i>Incompatibility with gradient elution mode</i>
Метод ионообменной ВЭЖХ с амперометрическим детектированием <i>Ion-exchange HPLC with amperometric detection</i>	– Высокая специфичность и селективность. – Чувствительность. – Максимальная автоматизация процесса. – Обеспечение прослеживаемости анализа. – Возможность автоматического генерирования элюента – <i>High specificity and selectivity.</i> – <i>Sensitivity.</i> – <i>Maximum process automation.</i> – <i>Analysis traceability.</i> – <i>Possibility of automatic eluent generation</i>	– Высокая стоимость оборудования и материалов. – Необходимость защиты растворов подвижных фаз от углекислого газа воздуха – <i>High cost of equipment and materials.</i> – <i>Need for protecting mobile phase solutions from atmospheric carbon dioxide</i>

применяют разнообразныe методы: титриметрические, спектрофотометрические, ферментативные, хроматографические. Рассмотрены достоинства и недостатки указанных методов. Сделан вывод, что методы ионообменной и гидрофильной ВЭЖХ являются перспективными

для разработки методик количественной оценки стабилизаторов углеводной природы в силу их селективности и способности прямого определения аналита.

Литература/References

1. Tonnis WF, Mensink MA, De Jager A, Van der Voort Maarschalk K, Frijlink HW, Hinrichs WL. Size and molecular flexibility of sugars determine the dosage stability of freeze-dried proteins. *Mol Pharm.* 2015;12(3):684–94. <https://doi.org/10.1021/mp500423z>
2. Блынская ЕВ, Тишков СВ, Алексеев КВ, Минаев СВ. Создание лиофилизата ГК-2 для приготовления раствора для инъекций с применением полиолов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018;2:26–31. Blynskaya EV, Tishkov SV, Alekseyev KV, Minaev SV. Creation of liophilisate of GK-2 for preparation of solution for injections with use of polyols. *Drug Development & Registration.* 2018;(2):26–31 (In Russ.).
3. Chang L, Shepherd D, Sun J, Ouellette D, Grant KL, Tang XC, Pikal MJ. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *J Pharm Sci.* 2005;94(7):1427–44. <https://doi.org/10.1002/jps.20364>
4. Manas MG, Campos J, Sharninghausen LS, Lin E, Crabtree RH. Selective catalytic oxidation of sugar alcohols to lactic acid. *Green Chemistry.* 2015;17(1):594–600. <https://doi.org/10.1039/C4GC01694G>
5. Tarpan MA, De Cooman H, Sagstuen E, Waroquier M, Callens F. Identification of primary free radicals in trehalose dihydrate single crystals X-irradiated at 10 K. *Phys Chem Chem Phys.* 2011;13(23):11294–302. <https://doi.org/10.1039/c0cp02616f>
6. Amchara FZ, Faiz C, Chaouqi S, Khiraoui A, Benhmimou A, Guedira M, Guedira T. Effect of *Stevia rebaudiana*, sucrose and aspartame on human health: a comprehensive review. *J Med Plants Stud.* 2018;102(61):102–8.
7. Hernández-López A, Sánchez Félix DA, Zuñiga Sierra Z, García Bravo I, Dinkova TD, Avila-Alejandre AX. Quantification of reducing sugars based on the qualitative technique of Benedict. *ACS Omega.* 2020;5(50):32403–10. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04467>
8. Pons A, Roca P, Aguiló C, Garcia FJ, Alemany M, Palou A. A method for the simultaneous determinations of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the antrone reagent. *J Biochem Biophys Methods.* 1981;4(3–4):227–31. [https://doi.org/10.1016/0165-022x\(81\)90060-9](https://doi.org/10.1016/0165-022x(81)90060-9)
9. Haas M, Lamour S, Trapp O. Development of an advanced derivatization protocol for the unambiguous identification of monosaccharides in complex mixtures by gas and liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2018;1568:160–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.015>
10. Alzweiri M, Al-Marabeh S, Bardaweel SK, Alfar R, Al-Hiari YM. Stability determination for cyclized 2,4-dinitrophenyl hydrazone derivative of glucose. *J Anal Sci Technol.* 2017;8:9. <https://doi.org/10.1186/s40543-017-0117-x>
11. Gonzalez NM, Fitch A, Al-Bazi J. Development of a RP-HPLC method for determination of glucose in *Shewanella oneidensis* cultures utilizing 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization. *PLoS One.* 2020;15(3):e0229990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229990>
12. Debebe A, Temesgen S, Redi-Abshiro M, Chandranshi BS, Ele E. Improvement in analytical methods for determination of sugars in fermented alcoholic beverages. *J Anal Methods Chem.* 2018;4010298. <https://doi.org/10.1155/2018/4010298>
13. Schenk J, Nagy G, Pohl NLB, Leghissa A, Smuts J, Schug KA. Identification and deconvolution of carbohydrates with gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy. *J Chromatogr A.* 2017;1513:210–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.052>
14. Ruiz-Matutea AI, Hernández-Hernández O, Rodríguez-Sánchez S, Sanz ML, Martínez-Castro I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(17–18):1226–40. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>
15. Mechri B, Tekaya M, Cheheb H, Hammami M. Determination of mannitol sorbitol and myo-inositol in olive tree roots and rhizospheric soil by gas chromatography and effect of severe drought conditions on their profiles. *J Chromatogr Sci.* 2015;53(10):1631–8. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv066>
16. Akyüza E, Başkan KS, Tütem E, Apak R. High performance liquid chromatographic method with post-column detection for quantification of reducing sugars in foods. *J Chromatogr A.* 2021;1660:462664. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462664>
17. Hadjikinova R, Petkova N, Hadjikinov D, Denev P, Hrusavov D. Development and validation of HPLC–RID method for determination of sugars and polyols. *J Pharm Sci Research.* 2017;9(8):1263–9.
18. Liu W, Xiao X, Song Z, Cheng X, Wei F, Liu Y, Zhang Y. Research on determination of mannitol in Bailing capsules by HPLC–RID instead of titration. *Chin J Pharm Anal.* 2014;34(1):159–62.
19. Forget R, Spagnoli S. Excipient quantitation and drug distribution during formulation optimization. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(3):1051–5. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.039>
20. Simonzadeh N, Ronsen B. An isocratic HPLC method for the determination of sorbitol and glycerol in pharmaceutical formulations. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(7):644–7. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms044>

21. Fang T, Cai Y, Yang Q, Ogutu CO, Liao L, Han Y Analysis of sorbitol content variation in wild and cultivated apples. *J Sci Food Agric*. 2020;100(1):139–44. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10005>
22. Sławińska A, Jabłońska-Ryś E, Stachniuk A. High-performance liquid chromatography determination of free sugars and mannitol in mushrooms using corona charged aerosol detection. *Food Anal Meth*. 2021;14:209–16. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01863-8>
23. Pitsch J, Weghuber J. Hydrophilic interaction chromatography coupled with charged aerosol detection for simultaneous quantitation of carbohydrates, polyols and ions in food and beverages. *Molecules*. 2019;24(23):4333. <https://doi.org/10.3390/molecules24234333>
24. Cintrón JM, Risley DS. Hydrophilic interaction chromatography with aerosol-based detectors (ELSD, CAD, NQAD) for polar compounds lacking a UV chromophore in an intravenous formulation. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;78–79:14–8. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.01.022>
25. Koh DW, Park JW, Lim JH, Yea MJ, Bang DY. A rapid method for simultaneous quantification of 13 sugars and sugar alcohols in food products by UPLC-ELSD. *Food Chem*. 2018;240:694–700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.142>
26. Risley DS, Yang WQ, Peterson JA. Analysis of mannitol in pharmaceutical formulations using hydrophilic interaction liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J Sep Sci*. 2006;29(2):256–64. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500253>
27. Pissmannöi D, Kiritsenko V, Marhivka J, Kütt ML, Vilu R. Development and optimisation of HILIC-LC-MS method for determination of carbohydrates in fermentation samples. *Molecules*. 2021;26(12):3669. <https://doi.org/10.3390/molecules26123669>
28. Bennett R, Olesik SV. Gradient separation of oligosaccharides and suppressing anomeric mutarotation with enhance-fluidity liquid hydrophilic interaction chromatography. *Anal Chim Acta*. 2017;960:151–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.006>
29. Chen H, Chen W, Hong B, Zhang Y, Hong Z, Yi R. Determination of trehalose by ion chromatography and its application to a pharmacokinetic study in rats after intramuscular injection. *Biomed Chromatogr*. 2018;32(12):e4355. <https://doi.org/10.1002/bmc.4355>
30. Pico J, Martínez MM, Martín MT, Gómez M. Quantification of sugars in wheat flours with an HPAEC-PAD method. *Food Chem*. 2015;173:674–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.103>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Минеро** — анализ и обобщение данных, изложенных в нормативных документах и научной литературе, написание текста рукописи; **О.Б. Рунова** — редактирование текста рукописи; **О.Б. Устинникова** — концепция и дизайн исследования, редактирование текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 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. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.S. Minero** analysed and summarised literature and regulatory data and drafted the manuscript. **O.B. Rounova** edited the manuscript. **O.B. Ustinnikova** conceptualised and designed the study, edited the manuscript, and approved the final version for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting 121022000147-4).

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

Об авторах / Authors

Минеро Анастасия Сальвадоровна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>
minero@expmed.ru

Рунова Ольга Борисовна, канд. хим. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
runova@expmed.ru

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
ustinnikova@expmed.ru

Anastasia S. Minero

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>
minero@expmed.ru

Olga B. Rounova, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
runova@expmed.ru

Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
ustinnikova@expmed.ru

Поступила 05.07.2022

После доработки 14.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Online first 04.04.2023

Received 5 July 2022

Revised 14 February 2023

Accepted 13 March 2023

Online first 4 April 2023



Разработка и валидация методики пептидного картирования инновационного препарата ингибитора C1 эстеразы

Е.В. Зубарева[✉], М.Б. Дегтерев, М.Ю. Неронова, М.А. Смолов, Р.Р. Шукуров

Акционерное общество «Генериум», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Зубарева Екатерина Валерьевна; zubareva@ibcgenerium.ru

Резюме

Пептидное картирование является одним из ключевых методов изучения первичной структуры белка. Метод чувствителен даже к малейшим изменениям в ковалентной структуре белка, что позволяет использовать его для проверки подлинности препарата на стадии контроля и мониторинга стабильности производственного процесса.

Цель работы: разработка и валидация методики пептидного картирования для подтверждения подлинности инновационного высокогликозилированного рекомбинантного белка — ингибитора C1 эстеразы.

Материалы и методы: рекомбинантный ингибитор C1 эстеразы человека, трипсин. 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. Методику валидировали по показателям: специфичность, прецизионность и устойчивость.

Результаты: апробированы разные варианты пробоподготовки трипсинолизатов, включая дополнительную обработку белка N-гликаназой и полное дегликозилирование. Подобраны условия пробоподготовки и хроматографического разделения пептидов ингибитора C1 эстеразы с получением стабильного профиля пептидной карты. Разработаны и определены реперные пики, а также диапазоны их относительных времен удерживания и относительной площади. Абсолютное время удерживания второго (референтного) пика составило 16,5–16,9 мин. Относительное время удерживания пика 9 — 2,14–2,21, пика 12 — 2,55–2,64, пика 14 — 2,97–3,14, пика 15 — 3,11–3,29 и пика 28 — 6,20–6,63.

Выводы: разработана методика пептидного картирования ингибитора C1 эстеразы. Оптимизация условий методики позволила сократить время пробоподготовки более чем на 18 ч. Разработанная методика по валидационным характеристикам специфичности, прецизионности и устойчивости соответствовала установленным критериям приемлемости.

Ключевые слова: ингибитор C1 эстеразы; рекомбинантный белок; валидация аналитической методики; пептидное картирование; ОФ ВЭЖХ

Для цитирования: Зубарева Е.В., Дегтерев М.Б., Неронова М.Ю., Смолов М.А., Шукуров Р.Р. Разработка и валидация методики пептидного картирования инновационного препарата ингибитора C1 эстеразы. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):203–218. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-203-218>

Development and validation of a peptide-mapping procedure for a novel C1 esterase inhibitor

E.V. Zubareva[✉], M.B. Degterev, M.Yu. Neronova, M.A. Smolov, R.R. Shukurov

Generium JSC, 14 Vladimirskaia St., Volginsky, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Ekaterina V. Zubareva; zubareva@ibcgenerium.ru

Abstract

Peptide mapping is a key method for studying the primary structure of proteins. With its sensitivity to the slightest changes in the covalent structure of a protein, this method is applicable both to medicinal product identification at the control stage and to production process stability monitoring. **The aim of the study** was to develop and validate a peptide-mapping procedure for the identification of a novel highly glycosylated recombinant C1 esterase inhibitor.

Materials and methods. The authors studied recombinant human C1 esterase inhibitor products and trypsin. The study involved peptide mapping using reverse-phase high-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. The following statistics were calculated to evaluate the results: mean, standard deviation, and coefficient of variation. The validation parameters included specificity, precision, and robustness.

Results. The authors tested several variants of sample preparation for tryptic digests, including additional N-glycanase treatment and complete deglycosylation, and established the optimal conditions for sample preparation and chromatographic separation of C1 esterase inhibitor peptides to obtain consistent chromatographic profiles (peptide maps). The authors identified characteristic peaks and the corresponding relative retention time and area ranges. The absolute retention time of the second (characteristic) peak was approximately 16.5–16.9 minutes. The relative retention times were 2.14–2.21 for peak 9, 2.55–2.64 for peak 12, 2.97–3.14 for peak 14, 3.11–3.29 for peak 15, and 6.20–6.63 for peak 28.

Conclusions. The authors developed a peptide-mapping procedure for C1 esterase inhibitors and optimised the conditions to achieve an over 18-hour reduction in sample preparation time. This procedure met the established acceptance criteria for specificity, precision, and robustness.

Key words: C1 esterase inhibitor; recombinant protein; analytical method validation; peptide mapping; RP-HPLC

For citation: Zubareva E.V., Degterev M.B., Neronova M.Yu., Smolov M.A., Shukurov R.R. Development and validation of a peptide-mapping procedure for a novel C1 esterase inhibitor. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):203–218. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-203-218>

Введение

В настоящее время разработка биотерапевтических препаратов осуществляется все быстрее, причем более половины из них составляют моноклональные антитела [1]. С другой стороны, препараты для ферментозаместительной терапии, обладая не меньшей терапевтической значимостью, не так распространены в силу их большей, в сравнении с моноклональными антителами, сложностью и гетерогенностью. Этими же причинами определяется и некоторый недостаток публикаций о разработке и валидации аналитических методик контроля качества таких белков.

Оценка подлинности рекомбинантных лекарственных препаратов является необходимым критерием контроля их качества¹. Одним из вариантов методик, используемых для под-

тверждения подлинности, является пептидное картирование, позволяющее подтвердить первичную структуру белка и ее соответствие ожидаемой, что является фундаментальным требованием контроля качества². Ввиду многообразия получающихся вариантов молекулы эффективная идентификация, мониторинг и контроль первичной структуры имеют решающее значение при разработке биопрепаратов [2].

Типичный протокол подготовки образцов для пептидного картирования предусматривает денатурацию белка, восстановление дисульфидных связей и алкилирование свободных тиолов с последующим трипсинолизом. Полученные пептиды хроматографически разделяют и анализируют. После подбора условий пробоподготовки и последующего хроматографического разделения пики пептидов иденти-

¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

ICH Q6B. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. EMA; 1999.

² Общая фармакопейная статья 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

фицируют с помощью масс-спектрометрии (МС). Для дальнейшего рутинного контроля метод МС может не использоваться, а вместо него применяют детектор УФ-диапазона.

Основные проблемы разработки методики пептидного картирования — это вариативность процедур пробоподготовки, вариативность хроматографических условий разделения пептидов, включая выбор колонки, подвижной фазы, скорости потока и др., а также отличия между системами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) разных производителей, увеличивающие погрешность методики. Существует необходимость индивидуального подхода к подбору условий пробоподготовки, что обусловлено природой конкретного белка, притом что данный подход может быть основан на базе общих правил. Так, например, эффективное обессоливание образца перед трипсинолизом повышает эффективность последнего [3]. В этом случае особенно важно удалить ионы гуанидина, являющегося конкурентным ингибитором связывания трипсина. Другим примером является подбор буферного раствора для трипсинолиза: например, часто применяемый для этого бикарбонат аммония, который хоть и обладает оптимальным диапазоном pH для трипсина (7,0–8,5), не может обеспечить его максимальной активности, что требует увеличения времени инкубации и, как следствие, может приводить к появлению дополнительных дезамидированных форм [4]. С другой стороны, трис(гидроксиметил)-аминометан гидрохлоридный и другие буферные растворы [5–7] обеспечивают значительно более быстрый протеолиз, минимизируя появление артефактных модификаций.

В настоящей работе представлена разработка и валидация методики пептидного картирования инновационной молекулы — рекомбинантного ингибитора C1 эстеразы человека (rh-C1inh). Данная молекула была разработана российской фармацевтической компанией АО «Генериум» в качестве замены существующих препаратов ингибитора C1 эстеразы (C1 ингибитора) зарубежных производителей. Инновационность разработанного препарата заключается в способе получения белка — на рынке не существует аналогов C1 ингибитора, получаемых с применением культуры клеток яичника китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary, CHO). Молекула имеет сложную двудоменную структуру. Молекула ингибитора C1 эстеразы человека представляет собой одноцепочечную линейную последовательность из 478 аминокислот,

включая С-концевой серпиновый домен и уникальный несерпиновый N-концевой домен, состоящий из 113 аминокислот. Теоретическая молекулярная масса составляет 52849 Да [8]. Четыре цистеина образуют две дисульфидные связи между серпиновым и несерпиновым доменами: Cys101–Cys406 и Cys108–Cys183. Другой посттрансляционной модификацией, обуславливающей высокую гетерогенность исследуемого белка, является гликозилирование, что связано с наличием большого количества сайтов и разнообразия гликанов. Всего было идентифицировано более двенадцати сайтов O-гликозилирования и шесть сайтов N-гликозилирования (рис. 1). В связи с этим выбор продуцента играет ключевую роль в правильном формировании гликопрофиля, непосредственно влияющего на терапевтическую эффективность и безопасность препарата.

В мире представлено несколько препаратов C1 ингибитора, в том числе препарат Беринерт®, получаемый из плазмы крови, и рекомбинантный Руконест®, выделяемый из молока трансгенных кроликов. При помощи разработанной нами методики была оценена сопоставимость препаратов C1 ингибитора (инновационного и коммерчески доступных) с помощью пептидного картирования.

Цель работы — разработка и валидация методики пептидного картирования для подтверждения подлинности инновационного высокогликозилированного рекомбинантного белка — ингибитора C1 эстеразы.

Материалы и методы

Препараты:

- исследуемый образец — инновационный препарат, рекомбинантный ингибитор C1 эстеразы (C1 ингибитор, rh-C1inh), 150 МЕ/мл (18,0 мг/мл), производства АО «Генериум»;
- Руконест® (конестат альфа) производства Pharming Group N.V., Нидерланды; рекомбинантный препарат, получаемый из молока трансгенных кроликов⁴;
- Беринерт® производства CSL BEHRING, GmbH, Германия; плазменный препарат, получаемый из крови человека [9].

Реактивы и материалы

Для приготовления денатурирующих растворов использовали гуанидин гидрохлорид (PanReac, кат. № A3240), мочевины (Sigma-Aldrich, кат. № U5128), трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид (PanReac, кат. № A3452). Вос-

³ <https://www.uniprot.org/uniprot/P05155/protvista>

⁴ Rucnec. EMA; 2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rucnec>

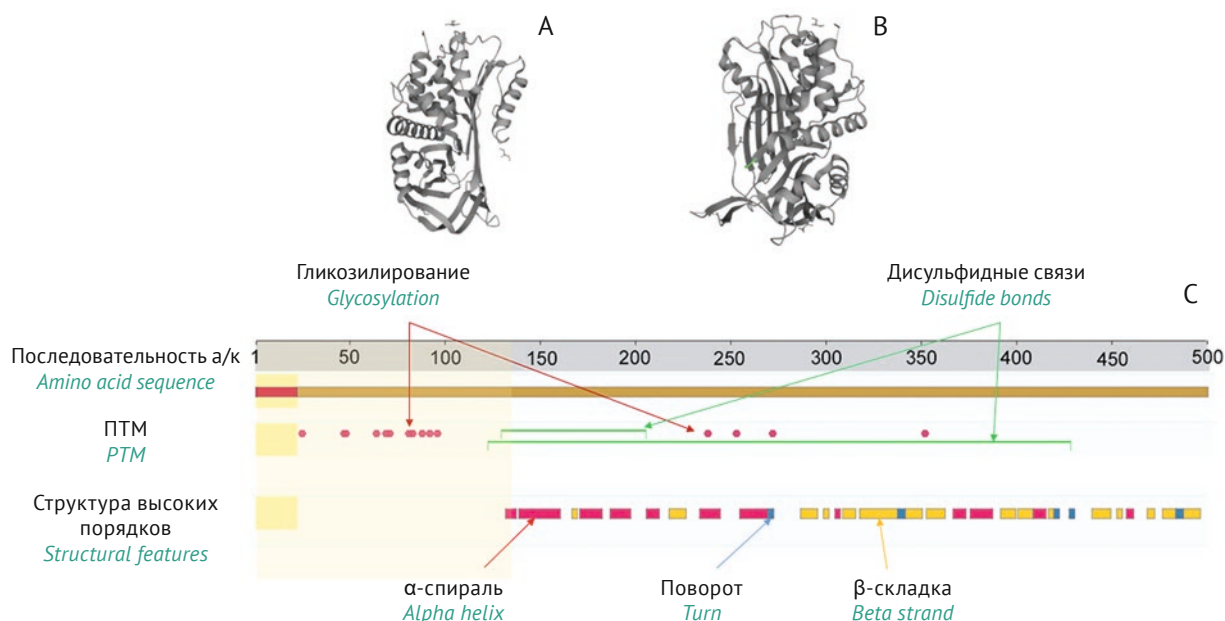


Рис. 1. Структура C1 ингибитора³: А и В — пространственная организация; С — схематическое изображение. Красным отрезком обозначен сигнальный пептид (1–22 аминокислоты, а/к), желтым полупрозрачным квадратом обозначен N-концевой домен. ПТМ — посттрансляционная модификация.

Fig. 1. C1 inhibitor structure: A and B, spatial organisation; C, schematic representation³. The red segment represents the signal peptide (amino acids 1–22), and transparent yellow rectangles mark the N-terminal domain. PTM, post-translational modification.

становление дисульфидных связей проводили дитиотреитолом (Sigma-Aldrich, кат. № D0632), алкилирование — йодацетамидом (PanReas, кат. № A1666,0025). Для перевода белка в другой буферный раствор использовали гель-фильтрационные колонки для обессоливания Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific, B2162579). При подборе подвижных фаз использовали модификаторы: муравьиную кислоту (Acros Organics, кат. № 147930010) или дифторуксусную кислоту (Waters, США, кат. № 186009201) в комбинации с формиатом аммония (Fisher Chemical, кат. № A115) и ацетонитрилом (J.T. Baker, кат. № 9012; Merck, кат. № 1.00030.2500). При обработке белка использовали ферменты N-гликаназа (Sigma-Aldrich, кат. № P7367), трипсин (Promega, кат. № V5111), химотрипсин (Promega, кат. № V1062), эндопротеаза Lys-N (Promega, кат. № VA1180), эндопротеаза Glu-C (Promega, кат. № V1651), эндопротеаза Asp-N (Promega, кат. № V1621), OpeRATOR® (Genovis, Швеция, кат. № G2-OP1-020).

Оборудование

Разработку и валидацию методики ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа Alliance e2695 (Waters, США), оснащенного детектором поглощения в УФ-области, с помощью программного обеспечения Empower (Waters). Идентификацию пептидов проводили с использованием хроматографа Nexera X2 (Shimadzu,

Япония), оснащенного масс-спектрометрическим детектором Q Exactive HF Biopharma (Thermo Fisher Scientific, США).

Методы

Пептидное картирование с использованием ОФ ВЭЖХ с УФ-детектором. Исследуемые образцы разбавляли денатурирующим буфером (100 мМ трис-гидрохлорид pH 7,8, 6 М гуанидин, 1 мМ ЭДТА) до расчетной концентрации целевого белка 1 мг/мл. Проводили восстановление дисульфидных связей в присутствии 5 мМ дитиотреитола в течение 1 ч при температуре 5 °С. После восстановления образцы алкилировали обработкой раствором 5 мМ йодацетамида в течение 1 ч при 5 °С в темноте. С помощью гель-фильтрационных колонок Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific) образцы переводили в реакционный буфер (100 мМ трис-гидрохлорид pH 7,8). К образцам элюатов объемом 500 мкл добавляли по 20 мкг раствора трипсина, перемешивали и инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч. Реакцию останавливали внесением 5 мкл муравьиной кислоты. Растворы центрифугировали в течение 3–5 мин при скорости 13500±50 g, после чего отбирали 300 мкл супернатанта и анализировали при помощи ОФ ВЭЖХ.

Хроматографические условия были подобраны индивидуально для каждого эксперимента и приведены в разделе «Результаты и обсуждение».

ВЭЖХ-МС/МС для анализа первичной структуры. Анализ проводили с помощью системы ВЭЖХ Nexera X2 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором Q Exactive HF Biopharma (Thermo Fisher Scientific, США), используя программное обеспечение Chromeleon v.7.2.10 (Thermo Fisher Scientific, США).

Восстановление и алкилирование дисульфидных связей 50 мкг rh-C1inh проводили в присутствии 0,025 М триэтиламмония бикарбоната, 0,01 М ТСЕР и хлорацетамида в соотношении 1:25. Полученную смесь инкубировали при температуре 80 °С при встряхивании в течение 30 мин. После инкубации образцы высушивали на вакуумном концентраторе CentriVar (Labconco, США). Сухой остаток растворяли в объеме 20 мкл 0,05 М раствора триэтиламмония бикарбоната. Далее полученный раствор разделяли на пять частей. Ферментативную обработку проводили по схеме, приведенной в таблице 1. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл муравьиной кислоты.

Хроматографические условия приведены в разделе «Результаты и обсуждение» (программа градиента 3). Разделение пептидов проводили на колонке AdvanceBio Peptide Map (2,1×150 мм, с размером частиц 2,7 мкм, кат. № 653750-902, Agilent Technologies, США) с использованием подвижных фаз: фаза А — 0,1% дифторуксусная кислота в воде; фаза Б — 0,1% дифторуксусная кислота в ацетонитриле; элюирование в режиме линейного градиента (0–40% фазы Б за 95 мин и 40–60% фазы Б за 10 мин); регистрация сигналов — в режиме положительной ионизации и дата-зависимого тандемного сканирования. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение Biopharma Finder v.3.2 (Thermo Fisher Scientific) и Peaks AB

v.2.0 (Bioinformatics Solutions). При этом учитывали химические (карбамидометилирование, образование аддуктов с ионами натрия, формилирование, отщепление воды) и посттрансляционные (гликозилирование, деградация аспарагина и деаминарование глутамина, гликирование, окисление метионина и триптофана) модификации.

Статистическая обработка результатов.

Для оценки результатов валидации (прецизионности) использовали статистические методы анализа⁵ с вычислением среднего арифметического, среднеквадратичного отклонения *SD* и относительного стандартного отклонения *RSD*, %.

Расчет интервала значений относительного времени удерживания и относительной площади проводили для каждого реперного пика. Для этого, используя статистику валидационных измерений, рассчитывали среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Интервал значений относительных величин представляет собой величину среднего арифметического значения с учетом отклонений в большую и меньшую сторону на величину *3SD*.

Результаты и обсуждение

Разработку и валидацию методики пептидного картирования C1 ингибитора для подтверждения подлинности выполняли с учетом требований регламентирующих документов: общей фармакопейной статьи (ОФС) 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV), монографий Европейской фармакопеи (10 изд.)⁶ и Фармакопеи США (USP 43–NF 38)⁷. Особое внимание было уделено следующим критериям:

- соответствию исследуемых образцов нормам существующей спецификации;
- контролю полноты проведения трипсинолиза;

Таблица 1. Схема ферментативной обработки образцов C1 ингибитора для масс-спектрометрической идентификации
Table 1. Enzyme treatment of C1 inhibitor samples for mass-spectrometry identification

Вариант обработки <i>Treatment variant</i>	Проба 1 <i>Sample 1</i>	Проба 2 <i>Sample 2</i>	Проба 3 <i>Sample 3</i>	Проба 4 <i>Sample 4</i>	Проба 5 <i>Sample 5</i>
Фермент <i>Enzyme</i>	химотрипсин <i>chymotrypsin</i>	трипсин <i>trypsin</i>	Asp-N	Glu-C	Lys-N
Вносимый объем, мкл <i>Added volume, µL</i>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Температура, время <i>Temperature, time</i>	37 °C, 3 ч <i>37 °C, 3 h</i>	37 °C, 16 ч <i>37 °C, 16 h</i>	37 °C, 16 ч <i>37 °C, 16 h</i>	37 °C, 16 ч <i>37 °C, 16 h</i>	37 °C, 16 ч <i>37 °C, 16 h</i>

Примечание. Asp-N — эндопротеаза Asp-N; Glu-C — эндопротеаза Glu-C; Lys-N — эндопротеаза Lys-N. Концентрация для каждого фермента — 1 мг/мл.

Note. Asp-N, endoproteinase Asp-N; Glu-C, endoproteinase Glu-C; Lys-N, endoproteinase Lys-N. The concentration of each enzyme was 1 mg/mL.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ 2.2.55 Peptide mapping. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2021.

⁷ <1055> Biotechnology-derived articles — Peptide mapping. USP 43–NF 38; 2009.

- выбору реперных пиков для оценки пригодности системы (они должны быть интенсивными, хорошо отделимыми от соседних, наиболее стабильными среди независимых повторностей; при выборе реперных пиков отдавали предпочтение пикам фрагментов белка, отвечающих за каталитическую способность);
- идентификации не менее 95% аминокислотной последовательности молекулы⁸.

Критериями оценки профиля хроматографического разделения в процессе разработки методики являлись:

- количество критических пар/областей (неразделенных пиков) не более 30% от всех пиков;
- минимизация количества и интенсивности пиков холостой пробы;
- минимальная асимметричность пиков;
- перекрестное загрязнение не более 1% по суммарной площади пиков.

После выбора условий хроматографического разделения проводили масс-спектрометрическую идентификацию пиков пептидов.

Разработка методики

При разработке методики пептидного картирования С1 ингибитора проводили подбор условий пробоподготовки и хроматографирования. В качестве примера типичного протокола пробоподготовки использовали данные из работы Т. Mouchaioir и J.E. Schiel [4]. Однако ввиду того что исследуемая молекула rh-C1inh характеризуется крайне высокой гетерогенностью, достижение заданных хроматографических параметров потребовало снижения сложности смеси протеолитических пептидов. Самым простым способом достижения этого стало дополнение пробоподготовки стадией тотального отщепления N-гликанов. Для этого белок обрабатывали 50 Ед раствора N-гликаназы в течение 16 ч. Далее пробоподготовку осуществляли по схеме, приведенной в разделе «Пептидное картирование с использованием ОФ ВЭЖХ с УФ-детектором».

Таблица 2. Программа градиента 1

Table 2. Gradient programme 1

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза Б, % <i>Mobile phase B, %</i>
0→60	1→40
60→61	40→99
61→65	99
65→70	99→1
70→80	1

На рисунке 2 представлена хроматограмма дегликозилированного образца С1 ингибитора (deN-Glc rh-C1inh), полученная при использовании программы градиента 1 (табл. 2). При проведении подбора хроматографических колонок начинали с колонки Delta Pack C18 (2,1×150 мм, с размером частиц 5 мкм, кат. № WAT023650, Waters, США). Использовали следующие хроматографические условия:

- подвижная фаза А: 0,1 % муравьиная кислота в воде;
- подвижная фаза Б: 0,1 % муравьиная кислота в ацетонитриле;
- скорость потока: 0,3 мл/мин;
- температура колонки: 45±2 °С;
- температура образцов: от 2 до 8 °С;
- УФ-детектор: 210 нм (с применением фильтра MBF);
- объем инъекции: 20 мкл.

Полученный хроматографический профиль (рис. 2) представлял собой набор плохо разделяемых компонентов, формирующих большое количество критических пар и затрудняющих выбор реперных пиков. Наблюдалось не более семи интенсивных пиков с высоким разрешением, причем два из них (с временами удерживания 50 и 60 мин) в случае незначительных изменений в условиях анализа могли либо сливаться с соседними пиками, либо элюироваться за пределами аналитического градиента — на стадии промывания колонки.

Предполагая, что пик, появляющийся на стадии отмычки колонки (рис. 2, пик указан красной стрелкой), содержит наиболее гидрофобные пептиды, далее были внесены изменения в программу градиента для увеличения его крутизны и финального содержания ацетонитрила (подвижная фаза Б) в системе до максимально возможного уровня (градиент 2, табл. 3).

Однако было показано, что на более крутом градиенте пика гидрофобные пептиды обнаружить не удалось (рис. 3). Кроме того, наблюдалось дальнейшее ожидаемое снижение хроматографического разрешения. Было отмечено наличие двух групп гидрофобных компонентов в виде крайне размытых хроматографических пиков на 54–66 мин хроматограммы (на рис. 3 указаны красной стрелкой). Дальнейшая коррекция хроматографических условий на данной колонке не привела к улучшению результатов.

Таким образом, наличие большого количества низкоинтенсивных пиков и неудовлетворительное хроматографическое разрешение (рис. 2, 3)

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2.; 2018.

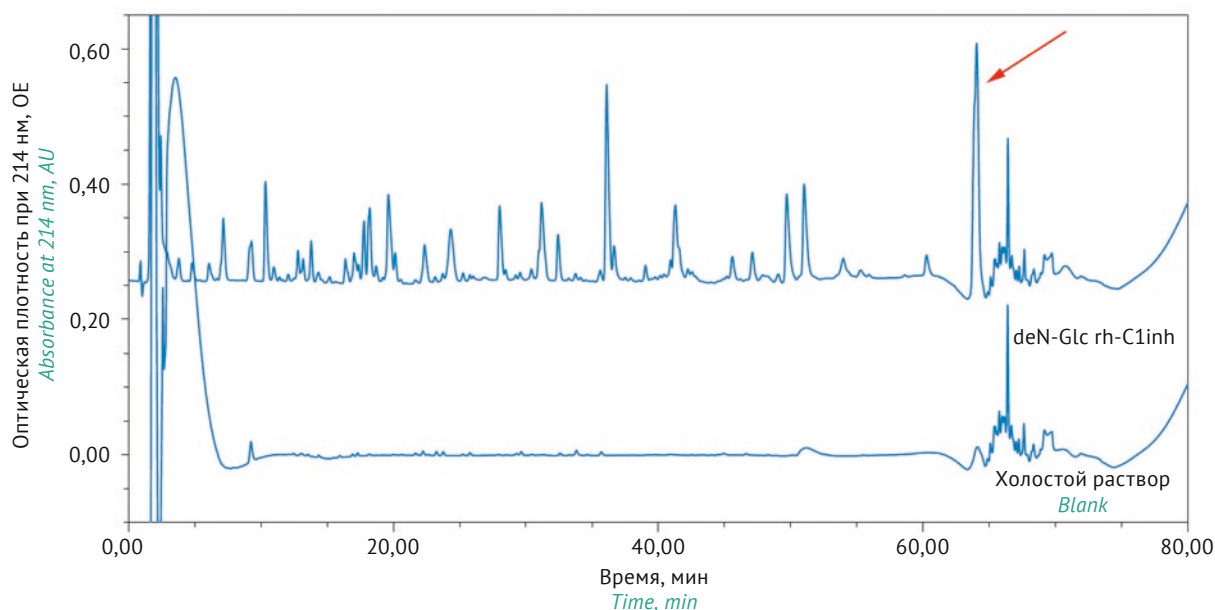


Рис. 2. Хроматограмма дегликозилированного при помощи N-гликаназы C1 ингибитора (deN-Glc rh-C1inh), полученная с использованием колонки Delta Pack C18 по программе градиента 1. Красной стрелкой отмечены сильно удерживаемые компоненты, элюирующиеся на стадии промывания колонки.

Fig. 2. Chromatogram of a de-N-glycosylated C1 inhibitor (deN-Glc rh-C1inh) obtained on a Delta Pack C18 column using gradient programme 1. The red arrow indicates highly retained components eluting during the column wash step.

привели к решению исключить колонку Delta Pack C18 из разработки методики.

Для дальнейших испытаний была выбрана колонка AdvanceBio Peptide Map. Учитывая большое количество пиков пептидов и гидрофобные варианты, изменили программу градиента (градиент 3, табл. 4).

Полученная хроматограмма характеризовалась более подходящим профилем разделения пиков по сравнению с предыдущими результатами (рис. 2). Среди пиков можно было выбрать семь потенциальных реперных (рис. 4). Удалось сфокусировать пики гидрофобных пептидов (на рис. 4 указаны красной стрелкой). Однако проблема большого количества малоинтенсивных пиков все еще не была разрешена. Более того, на хроматограмме холостого раствора были детектированы пики, коэлюирующие с пиками пептидов исследуемого белка (на рис. 4 обозначены серой стрелкой), возможно, являющиеся фрагментами N-гликаназы или результатами автолиза трипсина.

Принимая во внимание, что исследуемая молекула rh-C1inh гликозилирована и по N-, и по O-типу, было сделано предположение о том, что причиной большого количества пиков могут быть гликоформы не только N-типа, но и O-типа гликанов. Чтобы проверить эту гипотезу, для дальнейшего снижения гетерогенности образец rh-C1inh был полностью дегликозилирован (deN/O-Glc rh-C1inh) с помощью набора OPERATOR®. Кроме этого,

для дополнительного повышения хроматографического разрешения в состав подвижной фазы А был введен дополнительный компонент в виде 20 мМ формиата аммония (рис. 5).

Результаты анализа показали, что изменение состава подвижной фазы А не привело к улучшению разрешения пиков дегликозилированного образца. Пептидная карта белка даже после полного дегликозилирования не имела существенных преимуществ перед предыдущими картами. В связи с этим следующим шагом в разработке стала оценка необходимости дегликозилирования rh-C1inh перед трипсинолизом.

Среди представленных хроматограмм наиболее приемлемой оказалась карта гликозилированного rh-C1inh. Этот факт опроверг предыдущую гипотезу вклада гликопептидов в многообразие пиков. Поскольку само присутствие модификации гликозилирования C1 ингибитора является важным для ингибирующей

Таблица 3. Программа градиента 2
Table 3. Gradient programme 2

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза Б, % <i>Mobile phase B, %</i>
0→120	1→99
120→125	99
125→130	1→99
130→135	1

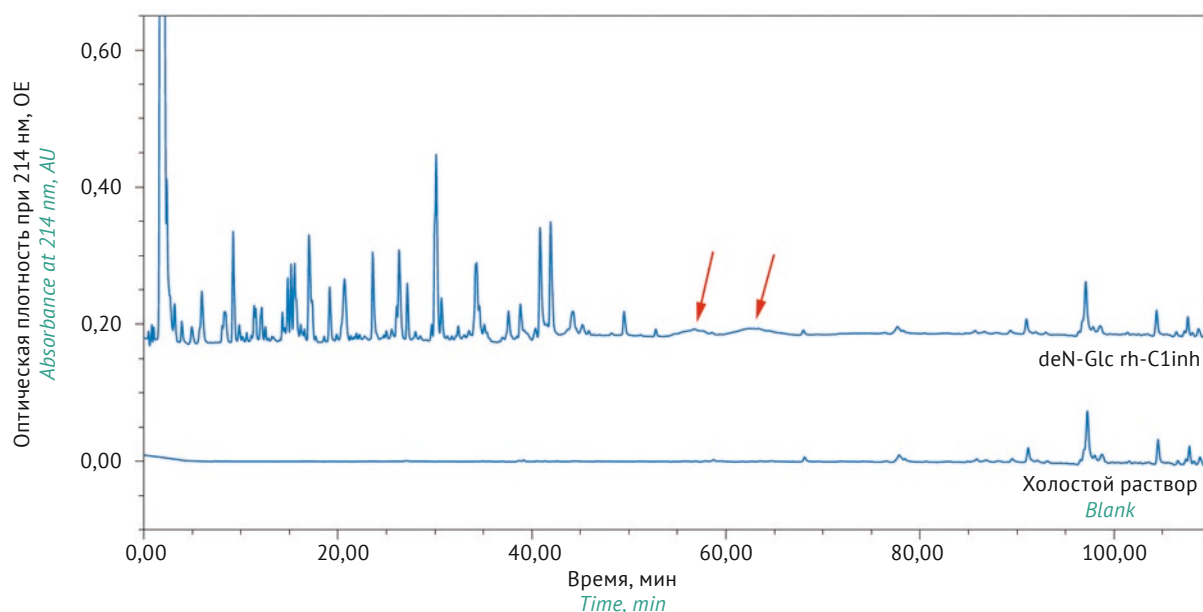


Рис. 3. Хроматограмма N-дегликозилированного C1 ингибитора (deN-Glc rh-C1inh), полученная с использованием колонки Delta Pack C18 по программе градиента 2. Красной стрелкой обозначена область элюирования наиболее гидрофобных пептидов.

Fig. 3. Chromatogram of an N-deglycosylated C1 inhibitor (deN-Glc rh-C1inh) obtained on a Delta Pack C18 column using gradient programme 2. Red arrows indicate the elution region of the most hydrophobic peptides.

активности, то наличие характеристических областей (рис. 5) является показательным. Так, области 1, 2 и 3 (рис. 5), очевидно, содержат гликопептиды, так как после последовательной обработки N-гликаназой, сиалидазой и O-гликаназой наблюдали значительное снижение интенсивности соответствующих пиков. То есть, несмотря на наличие зон неразделенных пиков, пептидная карта гликозилированного rh-C1inh оказалась наиболее информативной.

На хроматограмме гликозилированного rh-C1inh можно отметить восемь потенциальных реперных пиков преимущественно с высокой интенсивностью и хорошо отделяемых от соседних на всем диапазоне градиента. Количество низкоинтенсивных пиков при введении в водную фазу буферного агента формиата аммония су-

щественно сократилось. Проблема присутствия «шума» была решена.

Исходя из результатов эксперимента, стадия дегликозилирования rh-C1inh перед трипсинолизом была исключена из протокола пробоподготовки методики пептидного картирования, что сократило его время более чем на 18 ч.

Для разделения критических пар пиков можно изменять как длительность, так и наклон градиента. Однако в данном случае увеличение длительности градиента привело бы к неоправданному увеличению времени анализа. С другой стороны, изменение наклона градиента могло непредсказуемо повлиять на разрешение уже хорошо разделенных пиков и интенсивность пиков гидрофобных пептидов, как это было в начале исследования (рис. 2). Исходя из этих ограничений, далее проводили варьирование других параметров: состав подвижных фаз, скорость потока и температура колонки. Муравьиная кислота была заменена другим ион-парным реагентом – дифторуксусной кислотой (ДФА), обладающей большей ионной силой и при этом не подавляющей ионизацию аналитов при использовании масс-спектрометрического детектора. Скорость потока фазы была снижена с 0,3 до 0,25 мл/мин. Температура колонки для усиления массообмена была увеличена с 45 до 65 °C. Крутизну градиента тоже скорректировали, чтобы улучшить разделение

Таблица 4. Программа градиента 3

Table 4. Gradient programme 3

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза Б, % <i>Mobile phase B, %</i>
0→3	0
3→120	0→59
120→125	59→100
125→135	100→0
135→140	0

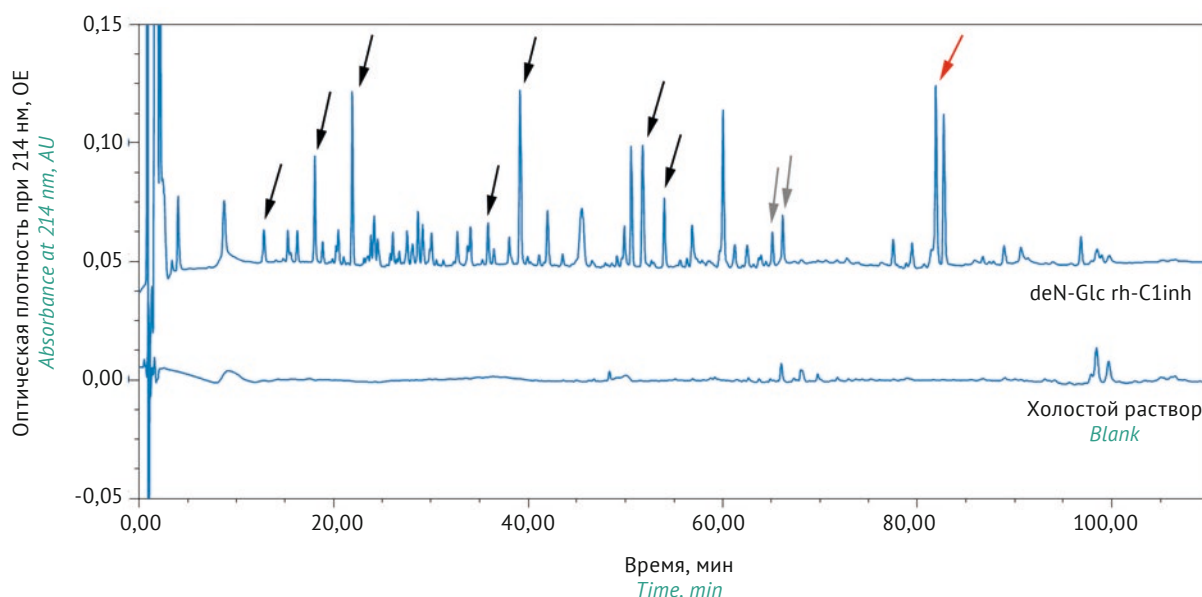


Рис. 4. Хроматограмма N-дегликозилированного C1 ингибитора (deGlc rh-C1inh), полученная с использованием колонки AdvanceBio Peptide Map по программе градиента 3. Черная стрелка — потенциальные реперные пики; серая стрелка — пики пептидов C1 ингибитора, коэлюирующие с примесными пиками холостого раствора; красная стрелка — пики гидрофобных пептидов.

Fig. 4. Chromatogram of an N-deglycosylated C1 inhibitor (deGlc rh-C1inh) obtained on an AdvanceBio Peptide Map column using gradient programme 3. Black arrows show potential characteristic peaks. Grey arrows indicate the peaks of C1 inhibitor peptides co-eluting with the impurity peaks in the blank chromatogram. The red arrow marks the most hydrophobic peptides.

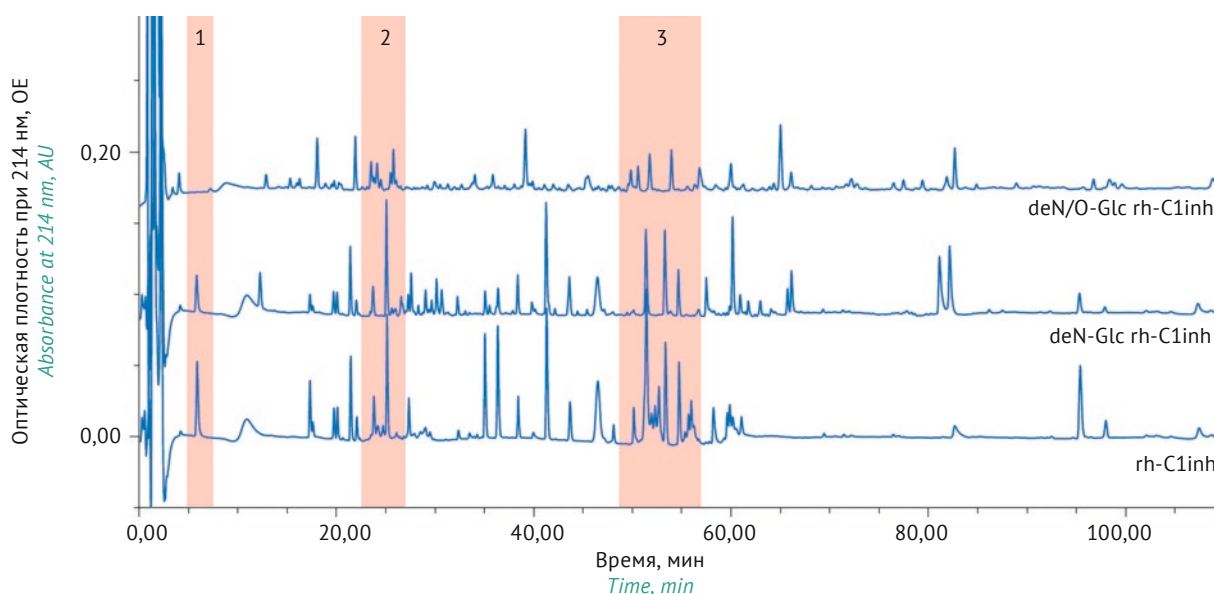


Рис. 5. Сравнение хроматограмм интактного C1 ингибитора (rh-C1inh), N-дегликозилированного (deN-Glc rh-C1inh) и полностью дегликозилированного rh-C1inh (deN/O-Glc rh-C1inh), полученных с использованием колонки AdvanceBio Peptide Map по программе градиента 3. Красным цветом выделены наиболее вариативные области.

Fig. 5. Comparison of chromatograms of intact (rh-C1inh), N-deglycosylated (deN-Glc rh-C1inh), and fully deglycosylated (deN/O-Glc rh-C1inh) C1 inhibitor forms obtained on an AdvanceBio Peptide Map column using gradient programme 3. The most variable regions are highlighted in red.

пиков (градиент 4, табл. 5). Использовали следующие хроматографические условия:

- подвижная фаза А: 0,1% ДФА в воде;
- подвижная фаза Б: 0,1% ДФА в ацетонитриле;
- скорость потока: 0,25 мл/мин;
- температура колонки: 65 ± 2 °C.

Полученные результаты (рис. 6) соответствовали требованиям приемлемости к оценке пептидной карты. Разработанные условия хроматографирования подходили для рутинного анализа. Таким образом, благодаря оптимизации условий хроматографирования и пробоподготовки уда-

лось не только улучшить хроматографическое разделение пиков высокогликозилированного белка rh-C1inh, но и сократить длительность пробоподготовки с одних суток до 5–6 ч.

На следующем этапе проводили выбор реперных пиков. Для их обоснования, помимо стабильности, интенсивности и удовлетворительного разрешения, необходима идентификация пептидов⁹. Наиболее информативным исследованием в данном случае является определение аминокислотной последовательности пептидов методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения с последующим сопоставлением результатов с известной первичной структурой белка. В таблице 6 приведена расшифровка пептидных фрагментов.

Суммарно идентифицированные пептидные фрагменты составили 82,5% аминокислотной последовательности rh-C1inh [10]. Необходимо отметить, что использование только трипсина для получения пептидных фрагментов с целью 100% покрытия аминокислотной последовательности rh-C1inh на ВЭЖХ-МС/МС проблематично. Это связано, во-первых, с наличием более 12 сайтов О-гликозилирования (рис. 1, 7), одной из функций которых является защита от протеолитической деградации С1 ингибитора [11], а во-вторых – с отсутствием специфических сайтов рестрикции трипсином (лизин, К, и аргинин, R) на довольно протяженном участке (рис. 7, последовательность аминокислот 59–96). Это придает данному фрагменту высокую гетерогенность, выражающуюся в наличии множества частично коэлюирующих пептидных вариантов, не формирующих интенсивного хроматографического пика, трудно детектируемых даже при помощи масс-спектрометрии, а также вызывает сложности с масс-спектрометрической идентификацией как по значениям молекулярных масс, так и по спектрам фрагментных ионов.

Для полного покрытия первичной последовательности был проведен анализ с использованием разных ферментов (рис. 7). Благодаря такой пробоподготовке было обеспечено 100% покрытия. Данные результаты могут быть исполь-

зованы при аттестации анализируемого образца как стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры [12].

В отдельном эксперименте со стадией восстановления дисульфидных связей и алкилирования цистеинов методом Элмана [13–15] было подтверждено наличие дисульфидных связей между цистеинами, находящимися в положениях 101 и 406, а также 108 и 183. Было также подтверждено, что пики 7, 19–21 и 24 включают сайты гликозилирования N3, N231, N47 и N330 соответственно, что обуславливает наличие нескольких пиков у каждого из этих пептидов на хроматограммах. О разнообразии гликоформ более подробно описано в публикации Е. Zubareva с соавт. [16]. Каталитически важные аминокислоты входят в состав пептидов, элюирующихся в составе пиков 7, 9, 12, 24, 25, 26 и 28 (рис. 6).

Для выбора реперных пиков были проанализированы экспериментальные данные трипсинолизатов трех серий препарата С1 ингибитора по три инъекции каждой. Среди всех пиков по их соответствию описанным ранее требованиям к реперным пикам и хроматографическому разделению были выбраны кандидаты (табл. 6, выделены оранжевой заливкой).

В исследовании анализировали серии препарата С1 ингибитора, соответствующие нормам спецификации. На основании масс-спектрометрических данных (табл. 6) было показано, что все пики пептидов не содержат дополнительных сайтов, специфических для трипсина (аминокислоты R и K). Полнота проведения трипсинолиза была подтверждена. Идентификация аминокислотной последовательности составила не менее 95%.

В качестве кандидатов реперных пиков, в первую очередь, рассматривались наиболее воспроизводимые и интенсивные пики. Для этого выбрали такие варианты, где показатель *RSD* выборки по значению абсолютной площади трех серий не превышал 8%, а содержание пика (относительная площадь) было не менее 2% ($n=9$). Разрешение между пиками (*Rs*) выбрали не менее 4,0 (табл. 7, опубликована на сайте журнала¹⁰). Также в кандидаты реперных пиков не рассматривали пики, являющиеся частью критической пары, как, например, пики 7, 17–24. Пик 1, несмотря на подходящие требованиям результаты, не выбрали реперным ввиду наличия в нем очень короткого пептида (ISR), а следовательно, данный пик не может являться характеристичным.

Кандидатами реперных пиков были выбраны 2, 9, 12, 14, 15 и 28.

Таблица 5. Программа градиента 4

Table 5. Gradient programme 4

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза Б, % <i>Mobile phase B, %</i>
0→5	0
5→100	0→40
100→110	40→60
110→115	60→100
115→120	100→0
120→130	0

⁹ 2.2.55 Peptide mapping. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2021.

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-461-tabl7910>

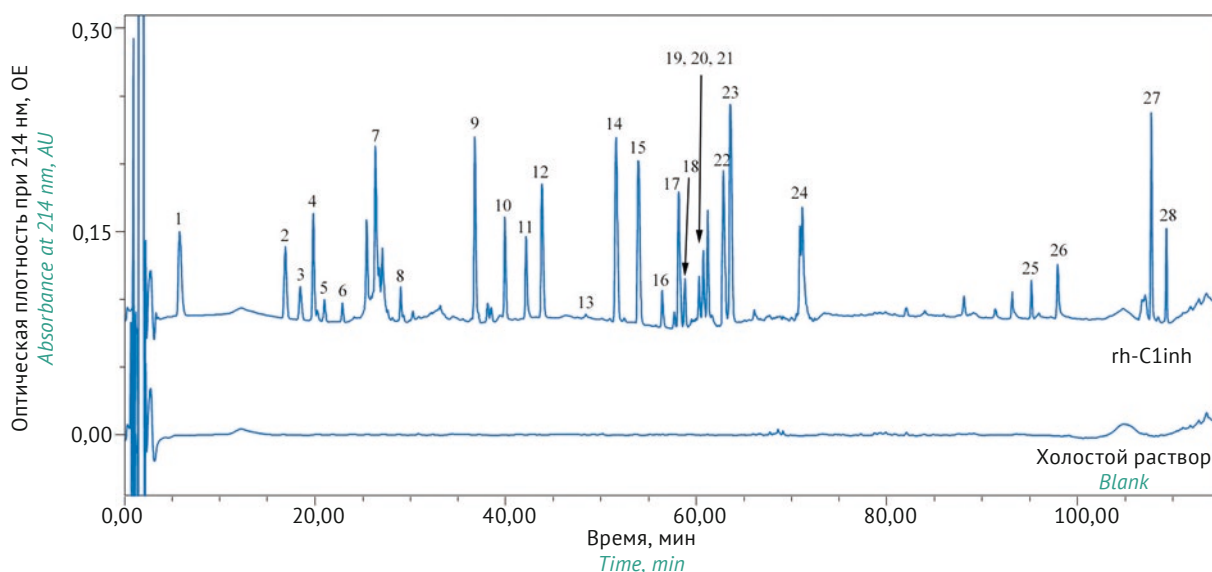


Рис. 6. Хроматограммы C1 ингибитора (rh-C1inh) и холостого раствора, полученные с использованием колонки AdvanceBio Peptide Map по программе градиента 4.

Fig. 6. Chromatograms of a C1 inhibitor (rh-C1inh) and a blank solution obtained on an AdvanceBio Peptide Map column using gradient programme 4.

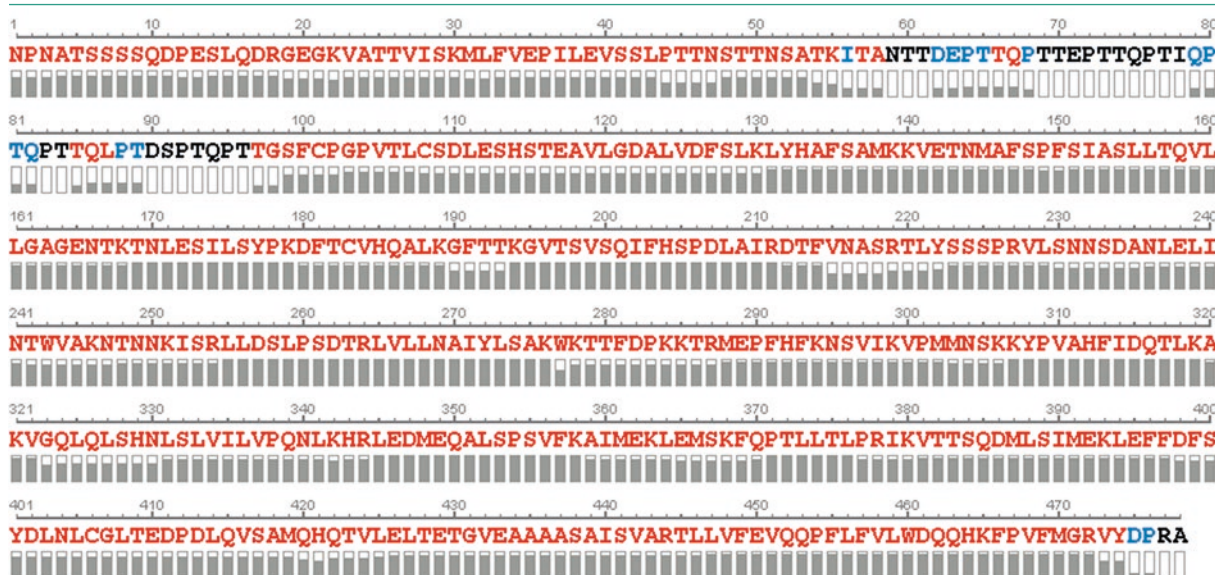


Рис. 7. Карта первичной структуры C1 ингибитора (rh-C1inh). Идентифицированные аминокислоты выделены жирным шрифтом; красным цветом отмечены аминокислоты с *b*- и *y*-ионами; синим — аминокислоты с одним *b*- или *y*-ионом; черным — аминокислоты без отдельных осколочных ионов (последние располагаются преимущественно в гипергликозилированной части). Серые прямоугольники являются графическим представлением надежности идентификации конкретного аминокислотного остатка, включая количество ионов-фрагментов и их интенсивность.

Fig. 7. Map of the primary structure of a C1 inhibitor (rh-C1inh). The identified amino acids are highlighted in bold; amino acids with both *b*- and *y*-ions in red; amino acids with one *b*- or *y*-ion in blue; amino acids with no individual fragment ions (the latter are located preferably at the hyperglycosylated part) in black. Grey rectangles are a graphical representation of the identification reliability for a particular amino acid residue, including the number of fragment ions and their intensities.

Пик 2 был выбран в качестве референтного для расчета относительных значений ввиду его приемлемой интенсивности и удобства расположения — в начале хроматограммы (для вычисления целых относительных величин). Пики 9, 12 и 28 выбраны не только из-за

соответствия требованиям к реперным пикам, но и из-за присутствия каталитически важных аминокислот. Пики 14 и 15 характеризуются высокой интенсивностью и разрешением с соседними пиками по сравнению с другими вариантами.

Таблица 6. Перечень идентифицированных пиков C1 ингибитора

Table 6. List of identified C1 inhibitor peaks

Номер пика <i>Peak number</i>	Номер аминокислот <i>Amino acid position</i>	Аминокислотная последовательность <i>Amino acid sequence</i>	Модификация <i>Modification</i>
1	252–254	ISR	Нет <i>No</i>
2	190–194	GFTTK	Нет <i>No</i>
3	295–299	NSVIK	Нет <i>No</i>
4	473–477 364–368	VYDPR LEMSK	Нет <i>No</i> Окисление <i>Oxidation</i>
5	364–368	LEMSK	Нет <i>No</i>
6	279–285	TTFDPKK	Нет <i>No</i>
7	279–284 220–227 19–30 212–219 300–306	TTFDPK TLYSSSPR GEGKVATTVISK DTFVNASR VPMMSK	Нет <i>No</i> Нет <i>No</i> Нет <i>No</i> Гликозилирование <i>Glycosylation</i> Нет <i>No</i>
8	23–30	VATTVISK	Нет <i>No</i>
9	180–189	DFTCVHQALK	Карбамидометилирование <i>Carbamidomethylation</i>
10	131–139	LYHAFSAMK	Нет <i>No</i>
11	255–264	LLDSLPSDTR	Нет <i>No</i>
12	288–294	MEPFHFK	Нет <i>No</i>
13	295–306	NSVIKVPMMNSK	Нет <i>No</i>
14	307–319	KYPVAHFIDQTLK	Нет <i>No</i>
15	343–358	HRLEDMEQALSPSVFK	Нет <i>No</i>
16	379–393	IKVTTSQDMLSIMEK	Нет <i>No</i>
17	169–179	TNLESILSYPK	Нет <i>No</i>
18	345–358	LEDMEQALSPSVFK	Нет <i>No</i>
19	228–246	VLSNNSDANLELINTWVAK	Гликозилирование <i>Glycosylation</i>
20	228–246	VLSNNSDANLELINTWVAK	Гликозилирование <i>Glycosylation</i>
21	228–246	VLSNNSDANLELINTWVAK	Гликозилирование <i>Glycosylation</i>
22	369–378	FQPTLLTLPR	Нет <i>No</i>
23	195–211	GVTSVSQIFHSPDLAIR	Нет <i>No</i>
24	265–276 322–342	LVLLNAIYLSAK VGQLQLSHNLSLVLPQNLK	Нет <i>No</i> Гликозилирование <i>Glycosylation</i>
25	445–472	TLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGR	Нет <i>No</i>
26	394–444	LEFFDFSVDLNLCLGTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTETG VEAAAASISVAR	Карбамидометилирование <i>Carbamidomethylation</i>
27	140–168	KVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTK	Нет <i>No</i>
28	141–168	VETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTK	Нет <i>No</i>

Примечание. Оранжевым выделены потенциальные реперные пики.

Note. Potential characteristic peaks are highlighted in orange.

Валидация методики

Валидацию методики пептидного картирования C1 ингибитора проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование и ОФС 1.1.0012.15 Валидация

аналитических методик ГФ РФ XIV¹¹. Согласно требованиям отечественных регуляторных органов, для подтверждения валидности методики по показателю подлинности достаточно подтвердить специфичность, однако, обращаясь

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2.; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

к опыту зарубежных регуляторных органов¹², в работе также проводилась оценка методики по показателям прецизионности и устойчивости. Данное решение не противоречит ГФ РФ XIV, так как ОФС 1.7.2.0035.18 подчеркивает важность воспроизводимости методики.

Специфичность. Оценка специфичности проводилась путем визуального сравнения хроматограмм при анализе препаратов C1 ингибитора. Для этого были проанализированы препараты C1 ингибитора, получаемые разными производителями, отличающиеся технологией получения (рис. 8, опубликован на сайте журнала¹³). Хроматографические профили гидролизованных растворов rh-C1inh, препаратов Руконост® и Беринерт®, должны были отличаться в интервале времени удерживания пептидов от 5 до 110 мин. На хроматограмме раствора плацебо с трипсином (холостой раствор) должны были отсутствовать значимые пики, соответствующие пикам 1–28 на хроматограммах гидролизованных растворов.

Несмотря на то что у сравниваемых препаратов C1 ингибитора аминокислотная последовательность одинакова, визуальное сравнение хроматограмм (рис. 8)¹³ выявило ряд отличий, очевидно, обусловленных разными профилями посттрансляционных модификаций, в первую очередь — гликозилирования [16]. Пики гликопептидов были подтверждены результатами масс-спектрометрической идентификации (табл. 6). На хроматограмме холостого раствора не было обнаружено пиков с временами удерживания, совпадающими с таковыми для пиков исследуемого белка.

Таким образом, специфичность методики была подтверждена.

Прецизионность. Прецизионность методики характеризуется сходимостью, воспроизводимостью и точностью. Методики пептидного картирования относятся к качественному анализу, поэтому их прецизионность оценивали по сходимости и воспроизводимости.

Оценка сходимости проводилась путем визуального сравнения хроматограмм и с расчетом значения *RSD* абсолютных и относительных значений площадей и времен удерживания реперных пиков, выбранных ранее при разработке методики. Статистическую обработку проводили по результатам измерения шести независимых проб одной серии препарата с индивидуальной

пробоподготовкой в один день одним аналитиком в одних условиях хроматографирования (рис. 9, опубликован на сайте журнала¹⁴).

Значение показателя *RSD* при оценке сходимости работы аналитика 1 ($n=6$) составило:

- по абсолютной площади — не более 6,9%;
- по абсолютному времени удерживания — не более 0,4%;
- по относительным значениям площадей — не более 4,5%;
- по относительным значениям времен удерживания — не более 0,5%.

Оценка воспроизводимости проводилась путем визуального сравнения хроматограмм и с расчетом значения *RSD* абсолютной и относительной площадей и времен удерживания реперных пиков и референтного. Измерения выполнялись вторым аналитиком в другой день на другой единице оборудования с выполнением девяти независимых опытов по проведению процедуры пробоподготовки. Таким образом, воспроизводимость оценивали по результатам пятнадцати независимых опытов по проведению процедуры пробоподготовки (рис. 10, опубликован на сайте журнала¹⁵).

Значение показателя *RSD* при оценке сходимости работы аналитика 2 ($n=9$) составило:

- по абсолютной площади — не более 8,1%;
- по абсолютному времени удерживания — не более 0,9%;
- по относительным значениям площадей — не более 6,0%;
- по относительным значениям времен удерживания — не более 0,1%.

Значения *RSD* относительных площадей и времен удерживания реперных пиков составили во всех случаях не более 5,0%, что соответствует ожидаемому допустимому разбросу значений (рис. 11, 12 опубликованы на сайте журнала¹⁶).

Таким образом, прецизионность методики была подтверждена.

Рассматривая в совокупности результаты, полученные при оценке валидационных характеристик специфичности и прецизионности, были выбраны диапазоны и критерии приемлемости реперных пиков для оценки пептидных карт рутиного анализа (табл. 8) [17, 18].

Устойчивость. Устойчивость методики оценивали путем варьирования времени

¹² Bioanalytical method validation. Guidance for Industry. HHS, FDA, CDER, CVM; 2018.

ICH Topic Q 2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95). EMA; 1995.

Ederveen J. A practical approach to biological assay validation. Progress. Project Management and Engineering; 2010.

Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2). EMA; 2011.

¹³ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-461-fig8-14>

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Там же.

инкубирования C1 ингибитора с трипсином (60, 90, 180 мин и при номинальном времени 120 мин, *рис. 13*, опубликован на сайте журнала¹⁷⁾ и использования разных колонок (*рис. 14*, опубликован на сайте журнала¹⁸⁾ для хроматографического разделения пептидов C1 ингибитора: AdvanceBio Peptide Map разных лотов и аналогичной по параметрам колонки Aeris Peptide XB-C18, 2,1×150 мм, размер частиц 2,6 мкм (кат. № 00F-4506-AN, Phenomenex, США). Устойчивость оценивали по соответствию относительных площадей и времен удерживания допустимому диапазону, установленному по результатам валидации (*табл. 8*). Результаты оценки устойчивости представлены в *таблицах 9, 10* (опубликованы на сайте журнала¹⁹⁾).

Было показано отклонение по абсолютной площади реперного пика 9 только при инкубации с трипсином в течение 60 мин. В других вариантах инкубации значимых отклонений не было. Также методика оказалась устойчива при использовании колонок разных лотов одного производителя.

Хроматограмма пептидной карты, полученная с использованием колонки Aeris Peptide XB-C18, визуально схожа с эталонной хроматограммой (AdvanceBio Peptide Map). Потенциально такая колонка может быть использована в качестве альтернативной при условии определения новых диапазонов приемлемости и ревалидации методики.

Таким образом, была показана устойчивость методики при варьировании времени инкубирования с трипсином от 90 до 180 мин, а также при использовании разных лотов идентичных колонок.

Заключение

Разработана методика пептидного картирования высокогликозилированного белка — препарата рекомбинантного ингибитора C1 эстеразы rh-C1inh, содержащая как подбор приемлемых условий разделения и обоснование выбора хроматографической колонки, так и оптимизацию этапа пробоподготовки. Экспериментально показана возможность оптимизации традиционного протокола пробоподготовки гликозилированных белков за счет исключения стадии дегликозилирования, что позволило сократить время анализа, снизить его стоимость и зависимость от поставок коммерческих реагентов зарубежных производителей. Кроме того, длительность анализа была сокращена благодаря оптимизации условий хроматографирования.

Методом масс-спектрометрии высокого разрешения проведена идентификация (расшифровка) пептидных фрагментов с суммарным покрытием 82,5% аминокислотной последовательности rh-C1inh, при этом все пептидные фрагменты содержали пять и более аминокислотных остатков (за исключением пика 1), что является дополнительным подтверждением специфичности выбранного протокола пробоподготовки. Проведена верификация аминокислотной последовательности исследуемого белка с покрытием около 100% и подтверждено наличие дисульфидных связей между цистеинами 103–108 и 183–406.

Проведено сравнение пептидной карты исследуемого белка с пептидными картами существующих препаратов ингибитора C1 эстеразы человека: Беринерт® и Руконост®, получаемых

Таблица 8. Реперные пики C1 ингибитора и критерии приемлемости для оценки пептидных карт

Table 8. C1 inhibitor characteristic peaks and acceptance criteria for peptide maps

Реперные пики и соответствующие им фрагменты молекулы <i>Characteristic peaks and corresponding molecule fragments</i>	Интервал значений относительного времени удерживания <i>Relative retention time range</i>	Интервал значений относительной площади пика <i>Relative peak area range</i>
2 GFTTK (190–194) Референтный пик <i>Characteristic peak</i>	1,0 RT≈17 мин <i>RT ≈17 min</i>	1,0
9 DFTCVHQALK (180–189)	2,14–2,21	1,74–2,18
12 MEPFHFK (288–294)	2,55–2,64	1,59–2,15
14 KYPVANHFDQTLK (307–319)	2,97–3,14	2,52–2,84
15 HRLEDMEQALSPSVFK (343–358)	3,11–3,29	2,20–2,80
28 VETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTK (141–168)	6,20–6,63	2,35–2,92

Примечание. RT — время удерживания.

Note. RT, retention time.

¹⁷⁾ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-461-fig8-14>

¹⁸⁾ Там же.

¹⁹⁾ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-461-tabl7910>

из разных источников. Выявленные различия могут быть предметом дальнейшего исследования особенностей посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков одной заявленной активности, но полученных различными производителями и с использованием разных технологий.

Валидационные характеристики разработанной методики (специфичность, прецизионность,

устойчивость) соответствовали установленным критериям приемлемости.

Разработанную методику с учетом ее валидационных характеристик возможно рассматривать как основу для аттестации стандартного образца и для последующего применения в комплексе с данным образцом для контроля качества rh-C1inh по показателю подлинности.

Литература/References

1. Lalonde ME, Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol.* 2017;251:128–40.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>
2. Qian C, Niu B, Jimenez R, Wang J, Albarghouthi M. Fully automated peptide mapping multi-attribute method by liquid chromatography-mass spectrometry with robotic liquid handling system. *J Pharm Biomed Anal.* 2021;198:113988.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113988>
3. Bongers J, Cummings JJ, Ebert MB, Federici MM, Gledhill L, Gulati D, et al. Validation of a peptide mapping method for a therapeutic monoclonal antibody: what could we possibly learn about a method we have run 100 times? *J Pharm Biomed Anal.* 2000;21(6):1099–128.
[https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(99\)00181-8](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(99)00181-8)
4. Mouchahoir T, Schiel JE. Development of an LC-MS/MS peptide mapping protocol for the NISTmAb. *Anal Bioanal Chem.* 2018;410(8):2111–26.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0848-6>
5. Allen D, Baffi R, Bausch J, Bongers J, Costello M, Dougherty J Jr, et al. Validation of peptide mapping for protein identity and genetic stability. Biologics and Biotechnology Section, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. *Biologicals.* 1996;24(3):255–74.
<https://doi.org/10.1006/biol.1996.0034>
6. Andersen N, Vampola L, Jain R, Alvarez M, Chamberlain S, Hilderbrand A, et al. Rapid UHPLC-HRMS peptide mapping for monoclonal antibodies. *American Pharmaceutical review.* 2014.
7. Xu CF, Wang Y, Bryngelson P, Sosic Z, Zang L. Sequence variant and posttranslational modification analysis during cell line selection via high-throughput peptide mapping. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1140:225–36.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4_12
8. Beinrohr L, Harmat V, Dobó J, Loörincz Z, Gál P, Závodszky P. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem.* 2007;282(29):21100–9.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700841200>
9. Keating GM. Human C1-esterase inhibitor concentrate (Berinert). *BioDrugs.* 2009;23(6):399–406.
<https://doi.org/10.2165/11201100-000000000-00000>
10. Ruddy S, Manning MC, Holcomb RE. C1-INH compositions and methods for the prevention and treatment of disorders associated with C1 esterase inhibitor deficiency. Patent of the USA US9616111B2; 2015.
11. Stavenhagen K, Kayili HM, Holst S, Koeleman CAM, Engel R, Wouters D, et al. N- and O-glycosylation analysis of human C1-inhibitor reveals extensive mucin-type O-glycosylation. *Mol Cell Proteomics.* 2018;17(6):1225–38.
<https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000240>
12. Устинникова ОБ, Волкова РА, Мовсисянц АА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(2):218–25.
Ustinnikova OB, Volkova RA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Bondarev VP. Recommendations on the certification of reference standards for structure identification of recombinant therapeutic proteins. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2022;22(2):218–25 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-218-225>
13. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70–7.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
14. Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem.* 2002;373(4–5):266–76.
<https://doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>
15. Winther JR, Thorpe C. Quantification of thiols and disulfides. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(2):838–46.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.031>
16. Zubareva E, Degterev M, Kazarov A, Zhiliaeva M, Ulyanova K, Simonov V, et al. Physicochemical and biological characterization of rhC1INH expressed in CHO cells. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(11):1180.
<https://doi.org/10.3390/ph14111180>
17. Голощапова ЕО, Минеро АС, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Разработка методики пептидного картирования для оценки подлинности рекомбинантного интерферона бета-1b. *Биофармацевтический журнал.* 2021;13(1):21–6.
Goloshchapova EO, Minero AS, Rounova OB, Ustinnikova OB. Development of a peptide mapping technique to evaluate the authenticity of recombinant interferon beta-1b. *Russian Journal of Biopharmaceuticals.* 2021;13(1):21–6 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-1-21-26>

18. Устинникова ОБ, Голощапова ЕО, Рунова ОБ, Коротков МГ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартного образца метионин-ной формы интерферона альфа-2b для подтверждения подлинности методом пептидного картирования. *Медицинская иммунология*. 2018;20(4):543–50.

Ustinnikova OB, Goloshchapova EO, Runova OB, Korotkov MG, Volkova RA. Development of a qualification procedure for methionine form of interferon alfa-2b standard to confirm its authenticity by means of a peptide mapping method. *Medical Immunology (Russia)*. 2018;20(4):543–50 (In Russ.).

<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-4-543-550>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Зубарева** — планирование экспериментов, выполнение экспериментальных работ и статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, написание текста рукописи; **М.Б. Дегтерев** — хромато-масс-спектрометрические исследования, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **М.Ю. Неронова** — выполнение экспериментальных работ; **М.А. Смолов** и **Р.Р. Шукуров** — обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи.

Благодарности. АО «Генериум» является спонсором разработок инновационного терапевтического белка C1 ингибитора. Работа выполнена на базе лаборатории физико-химических методов Департамента фармацевтического анализа АО «Генериум». Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории, принимавшим участие в работе.

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Zubareva** planned and performed the experiments, carried out statistical analysis of the data, discussed the study results, and drafted the manuscript. **M.B. Degterev** conducted liquid chromatography–mass-spectrometry measurements, discussed the study results, and edited the manuscript. **M.Yu. Neronova** performed the experiments. **M.A. Smolov** and **R.R. Shukurov** discussed the study results and edited the manuscript.

Acknowledgements. Generium JSC sponsored the development of the novel C1 inhibitor therapeutic protein. This study was conducted in the laboratory of physico-chemical methods of the Pharmaceutical Analysis Department of Generium JSC. The authors express their gratitude to the colleagues in the laboratory who took part in the study.

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

Об авторах / Authors

Зубарева Екатерина Валерьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6178-0050>
zubareva@ibcgenerium.ru

Дегтерев Максим Борисович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>
degterev@ibcgenerium.ru

Неронова Мария Юрьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6029-4563>
myneronova@ibcgenerium.ru

Смолов Максим Александрович, канд. хим. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2935-7655>
smolov@ibcgenerium.ru

Шукуров Рахим Рахманкулович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
shukurov@ibcgenerium.ru

Ekaterina V. Zubareva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6178-0050>
zubareva@ibcgenerium.ru

Maksim B. Degterev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>
degterev@ibcgenerium.ru

Maria Yu. Neronova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6029-4563>
myneronova@ibcgenerium.ru

Maksim A. Smolov, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2935-7655>
smolov@ibcgenerium.ru

Rakhim R. Shukurov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
shukurov@ibcgenerium.ru

Поступила 23.09.2022

После доработки 10.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 23 September 2022

Revised 10 February 2023

Accepted 13 March 2023

УДК 604.4

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-219-230>

Научная статья | Scientific article



Оптимизация условий индукции синтеза проинсулина аспарт в клетках бактериального штамма-продуцента

И.А. Корнаков[✉], З.Р. Хасаншина, Д.А. Сеничкина, А.А. Филипенко, И.С. Лунев, Р.В. Драй

Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг», ул. Связи, д. 34, лит. А, пос. Стрельна, Санкт-Петербург, 198515, Российская Федерация

✉ Корнаков Игорь Александрович; Igor.Kornakov@geropharm.com

Резюме

Сахарный диабет несет серьезную угрозу здоровью людей во всем мире, в связи с чем в 2021 г. Всемирная организация здравоохранения учредила Глобальный пакт по борьбе с диабетом — инициативу, направленную на обеспечение улучшений в области лечения и профилактики диабета. Быстрый рост числа больных диабетом увеличивает потребность в инсулине. Применение аналогов инсулина человека ультракороткого действия, в том числе инсулина аспарт, способствует повышению эффективности инсулинотерапии. Одним из способов получения инсулина аспарт является его биосинтез в виде проинсулина в клетках *Escherichia coli*, однако выход рекомбинантного белка в значительной степени определяется оптимизацией процесса производства.

Цель работы: оптимизация условий индукции синтеза рекомбинантного проинсулина аспарт в клетках штамма-продуцента *E. coli* с помощью подхода математического планирования эксперимента (Design of Experiment, DoE) для повышения продуктивности.

Материалы и методы: использовали штамм-продуцент проинсулина аспарт на основе клеток *E. coli*. Эксперимент планировали с помощью программного обеспечения MODDE с использованием дизайна, который позволяет оценить взаимодействие факторов и в дальнейшем построить проектные поля (reduced central composite design, face-centred, CCF). Культивирование штамма-продуцента проводили в биореакторе Biostat® объемом 5,0 л. Определение концентрации проинсулина аспарт осуществляли методом капиллярного гель-электрофореза. Обработку результатов выполняли с помощью программы GraphPad Prism 6.

Результаты: проведена оптимизация условий роста штамма-продуцента и биосинтеза проинсулина аспарт с применением подхода DoE. На основании данных графиков поверхности отклика (для параметров — концентрация влажной биомассы, удельная продуктивность и объемная продуктивность) и построенных моделей были определены проектные поля процесса индукции проинсулина аспарт в клетках штамма-продуцента *E. coli*. Показано, что построенные модели характеризуются высокой прогностической способностью и высокой воспроизводимостью полученных результатов. Проведена успешная валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт в оптимизированных условиях в биореакторе. Значение показателя объемной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт увеличено с $3,06 \pm 0,16$ г/л (стандартные условия) до $4,93 \pm 0,80$ г/л (оптимизированные условия).

Выводы: достигнуто увеличение объемной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт на 60%. Полученные результаты исследования могут быть использованы для интенсификации промышленного производства инсулина аспарт.

Ключевые слова: диабет; проинсулин; инсулин аспарт; условия индукции; *Escherichia coli*; планирование эксперимента

Для цитирования: Корнаков И.А., Хасаншина З.Р., Сеничкина Д.А., Филипенко А.А., Лунев И.С., Драй Р.В. Оптимизация условий индукции синтеза проинсулина аспарт в клетках бактериального штамма-продуцента. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):219–230. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-219-230>

© И.А. Корнаков, З.Р. Хасаншина, Д.А. Сеничкина, А.А. Филипенко, И.С. Лунев, Р.В. Драй, 2023

Optimisation of induction conditions for a bacterial strain producing proinsulin aspart

I.A. Kornakov✉, Z.R. Khasanshina, D.A. Senichkina, A.A. Filipenko, I.S. Lunev, R.V. Drai

Pharmholding CJSC, Svyazi St., 34, Strelina, St Petersburg 198515, Russian Federation

✉ Igor A. Kornakov; Igor.Kornakov@geropharm.com

Abstract

Diabetes poses a serious threat to the health of people around the world. Therefore, in 2021, the World Health Organisation launched the Global Diabetes Compact, an initiative aimed at improving the management and prevention of diabetes. The rapid growth in the number of diabetic patients has increased the need for insulin. Rapid-acting human insulin analogues, including insulin aspart, improve the efficacy of insulin therapy. Methods for insulin aspart production include its biosynthesis in the proinsulin form in *Escherichia coli*. However, the yield of the recombinant protein largely depends on the optimisation of the production process.

The aim of the study was to optimise the induction conditions for an *E. coli* strain expressing recombinant proinsulin aspart through applying the Design of Experiment (DoE) approach to enhance bacterial cell productivity.

Materials and methods. The study focused on a strain of *E. coli* producing proinsulin aspart. The authors planned the experiment using MODDE software and the reduced face-centred central composite design (CCF) enabling the assessment of factor interactions and the creation of design spaces. The authors carried out fermentations of the producing strain in a 5 L Biostat® B bioreactor and measured proinsulin aspart concentrations by capillary gel electrophoresis. The results were analysed using GraphPad Prism 6.

Results. Using the DoE approach, the authors optimised the conditions for the growth of the producer strain and the biosynthesis of proinsulin aspart. Based on data from response surface plots for wet biomass concentration, specific productivity, and volumetric productivity, as well as plotted models, the authors established design spaces for the induction of proinsulin aspart expression in *E. coli*. The plotted models demonstrated high predictive power and high reproducibility of the results. The authors successfully validated the induction process for the synthesis of proinsulin aspart in a bioreactor under optimised conditions. The volumetric productivity of the strain producing proinsulin aspart increased from 3.06 ± 0.16 g/L (conventional conditions) to 4.93 ± 0.80 g/L (optimised conditions).

Conclusions. The authors achieved a 60% increase in the volumetric yield of proinsulin aspart. The study results may be used to intensify the industrial production of insulin aspart.

Key words: diabetes; proinsulin; insulin aspart; induction conditions; *Escherichia coli*; design of experiments

For citation: Kornakov I.A., Khasanshina Z.R., Senichkina D.A., Filipenko A.A., Lunev I.S., Drai R.V. Optimisation of induction conditions for a bacterial strain producing proinsulin aspart. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):219–230. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-219-230>

Введение

В 2021 г. Всемирная организация здравоохранения учредила инициативу, направленную на обеспечение улучшений в области лечения и профилактики диабета (Глобальный пакт по борьбе с диабетом, WHO Global Diabetes Compact)¹. К 2020 г. около 420 млн человек имели диагноз диабета, по прогнозам к 2045 г. их число вырастет до 783 млн². Рост числа пациентов с диабетом приведет к последующему увеличению потребности в инсулине и его аналогах. В связи с этим важным направлением развития

фармацевтической биотехнологии является разработка и производство препаратов рекомбинантного инсулина. Следует отметить необходимость обеспечения пациентов как аналогами инсулина человека ультракороткого действия, так и препаратами длительного действия. Известно, что совместное применение указанных аналогов позволяет имитировать двухфазную физиологическую секрецию инсулина, характерную для здоровых лиц [1]. Кроме этого, совместное применение препаратов инсулина с различной скоростью действия способствует снижению

¹ <https://www.who.int/initiatives/the-who-global-diabetes-compact>

² <https://www.diabetesatlas.org>

частоты развития гипогликемии. Разработка эффективных аналогов инсулина является стратегической задачей для развития фармацевтической отрасли в Российской Федерации.

Инсулин аспарт — рекомбинантный аналог инсулина человека ультракороткого действия. Он идентичен человеческому инсулину, за исключением замены пролина в положении 28 В-цепи на аспарагиновую кислоту. В результате замены инсулин аспарт приобретает меньшую склонность к самоассоциации и, как следствие, быстрее всасывается после подкожной инъекции по сравнению с человеческим инсулином [1]. Инсулин аспарт вызывает снижение риска развития стойкой постпрандиальной гипогликемии за счет соответствия его действия физиологически раннему пику секреции инсулина [1, 2].

В настоящее время одним из способов получения инсулина аспарт является его биосинтез в виде проинсулина в клетках *Escherichia coli* [3]. Использование *E. coli* в качестве экспрессионной системы для крупномасштабного производства рекомбинантного инсулина имеет ряд преимуществ: высокая скорость роста клеток, изученные подходы к получению рекомбинантных штаммов-продуцентов, возможность использования простых сред, высокая продуктивность и экономическая эффективность [3–5]. Для разработки штаммов-продуцентов инсулинов применяют традиционные подходы к постановке экспериментов, основанные на методах однофакторного анализа [6]. Данная методология не учитывает взаимодействие факторов и требует проведения большого количества экспериментов для выявления истинного оптимума [6, 7]. Эффекты взаимодействия отдельных параметров, влияющих на экспрессию рекомбинантного белка, могут оказывать воздействие на продукцию целевой молекулы [6, 8]. Для оценки процесса важным представляется использование подхода математического планирования эксперимента (Design of Experiment, DoE), основанного на контролируемой статистике [6]. Подход базируется на полнофакторном анализе, позволяющем изменять несколько параметров одновременно, систематизировать обнаружение взаимодействий, что имеет важное значение для фармацевтической разработки [6, 8]. В основе подхода лежит построение поверхности отклика (response surface), представляющей собой математическую модель, которая описывает зависимость выходных параметров от входных.

Известно, что в наибольшей степени на показатель выхода рекомбинантного белка влияют условия индукции синтеза: температура культивирования, концентрация индуктора, pH,

значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм (OD_{600}). Достижение оптимального значения данных параметров способствует повышению продуктивности на 20% и более [7–12].

Цель работы — оптимизация условий индукции синтеза рекомбинантного проинсулина аспарт в клетках штамма-продуцента *E. coli* с помощью подхода математического планирования эксперимента (DoE) для повышения продуктивности. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи: определение оптимальных параметров для роста клеток штамма-продуцента и биосинтеза проинсулина аспарт в условиях культивирования в колбах с применением подхода DoE; построение проектных полей процесса ферментации; проведение ферментации в условиях биореактора объемом 5,0 л в стандартных и оптимизированных условиях для валидации процесса индукции синтеза проинсулина аспарт.

Материалы и методы

Материалы

В работе использовали штамм-продуцент *E. coli* BL21/pF644 (ЗАО «Фарм-Холдинг», Россия), продуцирующий гибридный белок, в котором лидерная последовательность связана через линкер с аминокислотной последовательностью проинсулина аспарт. Синтез белка находится под контролем гибридного *tac*-промотора.

В качестве компонентов питательной среды использовали пептоны растительного происхождения (ЗАО «Фарм-Холдинг», Россия), дрожжевой экстракт (ООО «Диаэм», Россия), гидроортофосфат калия трехводный (ООО «Диаэм», Россия), глюкозу (АО «Ленреактив», Россия), в качестве селективного маркера — канамицин (PanReas AppliChem, Германия), индуктор — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (PanReas AppliChem, Германия), соляную кислоту и гидроксид натрия (АО «Ленреактив», Россия).

Методы

Подготовка посевного материала. Схема подготовки посевного материала была идентична для культивирования в колбах и в ферментере. Клеточную культуру растили в стерильной питательной среде, содержащей пептоны растительного происхождения и дрожжевой экстракт в концентрации 7 и 1% соответственно, 6,0 г/л гидроортофосфата калия трехводного, 50 мг/л канамицина. Инкубацию проводили в термошейкере (Ecotron, Швейцария) при скорости перемешивания 180 об/мин при 37°C в течение 16±2 ч.

Оптимизация условий культивирования в колбах. Математическое планирование экспери-

мента проведено с помощью программного обеспечения MODDE (v12.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Германия)³ и методологии поверхности отклика с использованием дизайна, который позволяет оценить взаимодействие факторов и в дальнейшем построить проектные поля (reduced central composite design, face-centred, CCF⁴) [6, 13]. Центральная точка оценивалась в трех повторностях.

Для оптимизации условий культивирования были выбраны пять параметров: pH, температура, длительность индукции синтеза, концентрация индуктора, значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм (OD_{600}), диапазоны значений которых представлены в таблице 1.

В качестве откликов (выходная переменная – результат изменения параметров) использовали удельную и объемную продуктивность, а также концентрацию влажной биомассы. Культивирование клеток проводили в питательной среде, аналогичной по составу среде для посевного материала. pH доводили до требуемых значений с использованием растворов соляной кислоты и гидроксида натрия.

Оценку воспроизводимости и прогностической способности модели проводили с помощью множественного линейного регрессионного анализа согласно формуле (1):

$$Y_{CCF} = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i X_i + \sum_{i < j}^3 \alpha_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} X_i^2, \quad (1)$$

где Y_{CCF} – значение отклика, определяемое с помощью CCF дизайна; X_i и X_j – анализируемые параметры (факторы); α_0 – константа; α_i , α_{ij} , и α_{ii} – линейные коэффициенты регрессии, коэффициенты взаимодействия и квадратичные коэффициенты регрессии соответственно.

Качество модели оценивали с помощью двух критериев: коэффициента детерминации (R^2), показывающего воспроизводимость полученных результатов в построенной модели, и коэффициента точности прогнозирования (Q^2), показывающего способность модели предсказывать результат при проведении новых экспериментов [13]. Качество модели считается удовлетворительным, если значения $R^2 > 0,75$ и $Q^2 > 0,50$. Разница между значениями R^2 и Q^2 должна быть менее 0,3. Модель не рекомендуется использовать, если R^2 и Q^2 менее 0,5.

Валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт в биореакторе. Культивирование штамма-продуцента проводили в трех повторностях в биореакторе Biostat B (Sartorius Stedim,

Германия) объемом 5,0 л в стандартных условиях, подобранных с помощью традиционной методологии однофакторного анализа, и в оптимизированных условиях, подобранных с помощью полнофакторного анализа с использованием подхода DoE, в рамках валидации процесса индукции синтеза проинсулина аспарт.

Состав питательной среды был идентичен для стандартных и оптимизированных условий и содержал пептоны растительного происхождения, дрожжевой экстракт и гидроортофосфат калия трехводный в количестве 7, 1 и 0,01% соответственно. Дополнительно в среду добавляли глюкозу до конечной концентрации 0,1% и канамицин до 50 мг/л. Стартовый объем питательной среды в биореакторе составлял 2,7 л. Посевной материал вносили в ферментер в соотношении 1:10. Исходные условия культивирования были следующими: скорость перемешивания 400 об/мин, аэрация – 3 л/мин, температура культивирования – 37°C, pH среды от 6,0 до 7,2. Ферментацию проводили в периодическом режиме до истощения глюкозы в среде (начало роста значений pH) и затем подключили подачу раствора 55% глюкозы в режиме pH-стат. Данный режим предполагает подачу источника углерода по потребностям микробной культуры. pH культуральной жидкости поддерживается без корректоров pH за счет равновесия метаболических процессов, в ходе которых образуются соединения с кислотными и основными свойствами. Ферментацию продолжали в течение 8 ч после внесения индуктора. В ходе ферментации отбирали пробы для измерения показателя OD_{600} (начиная с 0 ч культивирования), массы влажного осадка и концентрации проинсулина аспарт (начиная с 0 ч после индукции). Параметры процесса культивирования, различающиеся для стандартных и оптимизированных условий, представлены в таблице 2.

Измерение оптической плотности культуральной суспензии. Концентрацию клеточной биомассы в процессе эксперимента оценивали по показателю оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм (OD_{600}). Измерение оптической плотности проводили с использованием спектрофотометра P300 (Implen, Германия). Для измерения показателя OD_{600} суспензию клеток разбавляли водой очищенной до получения значений 0,1–0,8. Измерение оптической плотности проводили в трех повторностях против воды очищенной. Среднее значение OD_{600} рассчитывали по произведению среднего арифметического значения трех разведений на фактор разведения.

³ <https://www.sartorius.com/download/544636/modde-12-user-guide-en-b-00090-sartorius-data.pdf>

⁴ User guide to MODDE. User Guides and Tutorials. Umetrics; 2014.

Таблица 1. Схема эксперимента по оптимизации условий культивирования
Table 1. Experimental design for optimising culture conditions

№	pH	Температура, °C <i>Temperature, °C</i>	Время индукции, ч <i>Induction time, h</i>	Концентрация ИПТГ, мМ <i>IPTG concentration, mM</i>	OD ₆₀₀	Удельная продуктивность, мг/г <i>Specific productivity, mg/g</i>
1	5,0	32	2,0	0,050	3,00	21,12
2	8,0	32	2,0	0,050	0,50	1,18
3	5,0	42	2,0	0,050	0,50	25,64
4	8,0	42	2,0	0,050	3,00	17,12
5	5,0	32	6,0	0,050	0,50	28,19
6	8,0	32	6,0	0,050	3,00	28,22
7	5,0	42	6,0	0,050	3,00	21,41
8	8,0	42	6,0	0,050	0,50	24,18
9	5,0	32	2,0	1,000	0,50	15,31
10	8,0	32	2,0	1,000	3,00	12,97
11	5,0	42	2,0	1,000	3,00	24,57
12	8,0	42	2,0	1,000	0,50	13,24
13	5,0	32	6,0	1,000	3,00	42,74
14	8,0	32	6,0	1,000	0,50	22,80
15	5,0	42	6,0	1,000	0,50	35,79
16	8,0	42	6,0	1,000	3,00	49,14
17	5,0	37	4,0	0,525	1,75	46,06
18	8,0	37	4,0	0,525	1,75	43,15
19	6,5	32	4,0	0,525	1,75	41,44
20	6,5	42	4,0	0,525	1,75	41,32
21	6,5	37	2,0	0,525	1,75	38,80
22	6,5	37	6,0	0,525	1,75	53,62
23	6,5	37	4,0	0,050	1,75	44,50
24	6,5	37	4,0	1,000	1,75	44,20
25	6,5	37	4,0	0,525	0,50	42,72
26	6,5	37	4,0	0,525	3,00	33,42
27	6,5	37	4,0	0,525	1,75	45,77
28	6,5	37	4,0	0,525	1,75	35,93
29	6,5	37	4,0	0,525	1,75	39,11

Примечание. OD₆₀₀ — значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм; ИПТГ — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

Note. OD₆₀₀, culture broth optical density at 600 nm; IPTG, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside.

Определение концентрации влажной биомассы. Для определения массы влажного осадка 2 мл пробы культуральной жидкости помещали в предварительно взвешенные микропробирки, центрифугировали два раза в течение 5 мин при 15000 об/мин (21000 g) при 4°C при использовании центрифуги Eppendorf 5424 (Eppendorf, Германия). Супернатант удаляли при помощи аспиратора.

Количественное определение содержания проинсулина аспарт. Определение концентрации проинсулина аспарт осуществляли методом капиллярного гель-электрофореза в денатурирующих условиях с помощью системы для капиллярного электрофореза SCIEX PA 800 plus (SCIEX, США) [14].

Статистическая обработка результатов. Проверка моделей и определение значимости параметров в рамках подхода математического планирования эксперимента DoE выполняли с использованием программы MODDE с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), таблицы соответствия данных модели и диаграммы Парето. Для статистического анализа результатов использовали программу GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Применяли одно-

факторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

Оптимизация условий индукции биосинтеза проинсулина аспарт в колбах с использованием подхода математического планирования эксперимента DoE

После проведения экспериментов по культивированию штамма-продуцента в колбах и анализа полученных данных были разработаны модели для определения оптимальных условий индукции биосинтеза проинсулина аспарт в штамме-продуценте с использованием методологии поверхности отклика. Значения критериев R^2 и Q^2 для параметров отклика составили: для удельной продуктивности — 0,83 и 0,58; для концентрации влажной биомассы — 0,97 и 0,86; для объемной продуктивности — 0,87 и 0,73 соответственно. Разница между значениями R^2 и Q^2 была менее 0,3 для каждой модели. Полученные данные указывают на приемлемое соответствие моделей экспериментальным данным и их прогностическую способность, следовательно, их можно использовать в дальнейшей работе.

Таблица 2. Параметры процесса культивирования в стандартных и оптимизированных условиях индукции синтеза проинсулина аспарт**Table 2.** Cultivation process parameters for proinsulin aspart production under conventional and optimised induction conditions

Параметр <i>Parameter</i>	Стандартные условия <i>Conventional conditions</i>	Оптимизированные условия <i>Optimised conditions</i>
Время начала индукции <i>Induction start</i>	Переходная фаза роста культуры <i>Transition to the exponential phase of culture growth</i>	Начало экспоненциальной фазы роста культуры <i>Beginning of the exponential phase of culture growth</i>
Концентрация индуктора ИПТГ, мМ <i>IPTG inducer concentration, mM</i>	0,1	0,05

Таким образом, по итогам анализа были предложены квадратичные модели для каждого из исследованных откликов согласно формулам (2–4):

$$Y_1 = 44,6 - 2,71 \times X_1 + 7,56 \times X_3 + 2,73 \times X_4 + 2,31 \times X_5 - 8,34 \times X_2^2 - 11,65 \times X_3^2 + 2,97 \times X_3 \times X_4, \quad (2)$$

$$Y_2 = 7,12 + 0,89 \times X_1 - 0,83 \times X_2 + 0,86 \times X_3 - 0,25 \times X_4 + 1,55 \times X_5 - 0,84 \times X_1^2 - 0,69 \times X_3^2 + 0,56 \times X_4^2 - 0,44 \times X_2 \times X_3 - 0,38 \times X_2 \times X_5 - 0,25 \times X_3 \times X_4 - 0,36 \times X_3 \times X_5, \quad (3)$$

$$Y_3 = 0,32 + 0,01 \times X_1 - 0,02 \times X_2 + 0,07 \times X_3 - 0,05 \times X_5 - 0,07 \times X_5^2 + 0,02 \times X_1 \times X_2 - 0,02 \times X_1 \times X_3, \quad (4)$$

где Y_1 — удельная продуктивность, мг/г; Y_2 — концентрация влажной биомассы, г/л; Y_3 — объемная продуктивность, г/л; X_1 — pH среды; X_2 — температура, °C; X_3 — время индукции, ч; X_4 — концентрация ИПТГ, мМ; X_5 — значение показателя OD_{600} .

С использованием программного обеспечения MODDE получены уравнения для прогнозирования оптимальных значений исследованных параметров для каждого отклика.

Валидация оптимизированного процесса индукции проинсулина аспарт проводилась в биореакторе. Валидация считалась успешно проведенной при воспроизведении прогнозируемой удельной продуктивности культуры. Ранее было определено, что удельная продуктивность является критерием эффективности масштабирования при переходе от культивирования в колбах в биореактор.

Влияние параметров процесса на исследованные отклики считалось статистически значимым при $p < 0,05$. На основании полученных квадратичных моделей были построены трехмерные графики поверхности для каждого из откликов — удельная и объемная продуктивность, концентрация влажной биомассы (рис. 1–3).

Было показано, что на удельную продуктивность влияют такие параметры, как pH среды, длительность индукции и концентрация индуктора ИПТГ (рис. 1А). При этом на удельную продуктивность оказывало влияние взаимодействие таких параметров, как длительность индукции и концентрация ИПТГ. Такие параме-

тры, как температура культивирования и показатель OD_{600} , являлись незначимыми факторами ($p < 0,05$). Однако данные параметры не могут быть исключены из эксперимента, так как наблюдается статистически значимое квадратичное взаимодействие ($p < 0,01$) (формулы 2 и 4).

В случае значений параметра pH среды, равных 6,0 и ниже, влияние на удельную продуктивность было отрицательным, то есть наблюдалось более низкое значение отклика при увеличении значений параметра (рис. 1А). Известно, что pH питательной среды влияет на качество телец включения, которое определяется титром продукта и размером телец [15, 16].

Было определено, что для достижения максимальной удельной продуктивности оптимальным временем начала индукции является середина экспоненциальной фазы роста — значение OD_{600} составляло 1,5–2,5 (рис. 1D). Температура культивирования в диапазоне 35–39 °C, который является оптимальным для роста клеток *E. coli*, способствует накоплению проинсулина в тельцах включения (рис. 1C). Максимальная удельная продуктивность штамма-продуцента в отношении проинсулина аспарт достигается при высоких концентрациях ИПТГ в среде — 0,8 мМ и выше (рис. 1C, 1E).

Было продемонстрировано, что на концентрацию влажной биомассы влияют все исследованные параметры, также наблюдается квадратичное влияние pH, времени индукции и концентрации ИПТГ (рис. 2А). На концентрацию влажной биомассы отрицательно влияют взаимодействие температуры и длительность индукции, температуры и показателя оптической плотности индукции, длительности индукции и концентрации ИПТГ, длительности индукции и показателя OD_{600} . Показано, что концентрация ИПТГ отрицательно влияет на рост клеток. Этот эффект можно объяснить токсичностью ИПТГ для клеток *E. coli*, о чем имеются данные в литературе [17, 18]. Также выявлено негативное влияние на рост клеток температуры 34 °C и ниже (рис. 2). При низких температурах культивирования биосинтез замедляется, что способствует накоплению биомассы (рис. 2B).

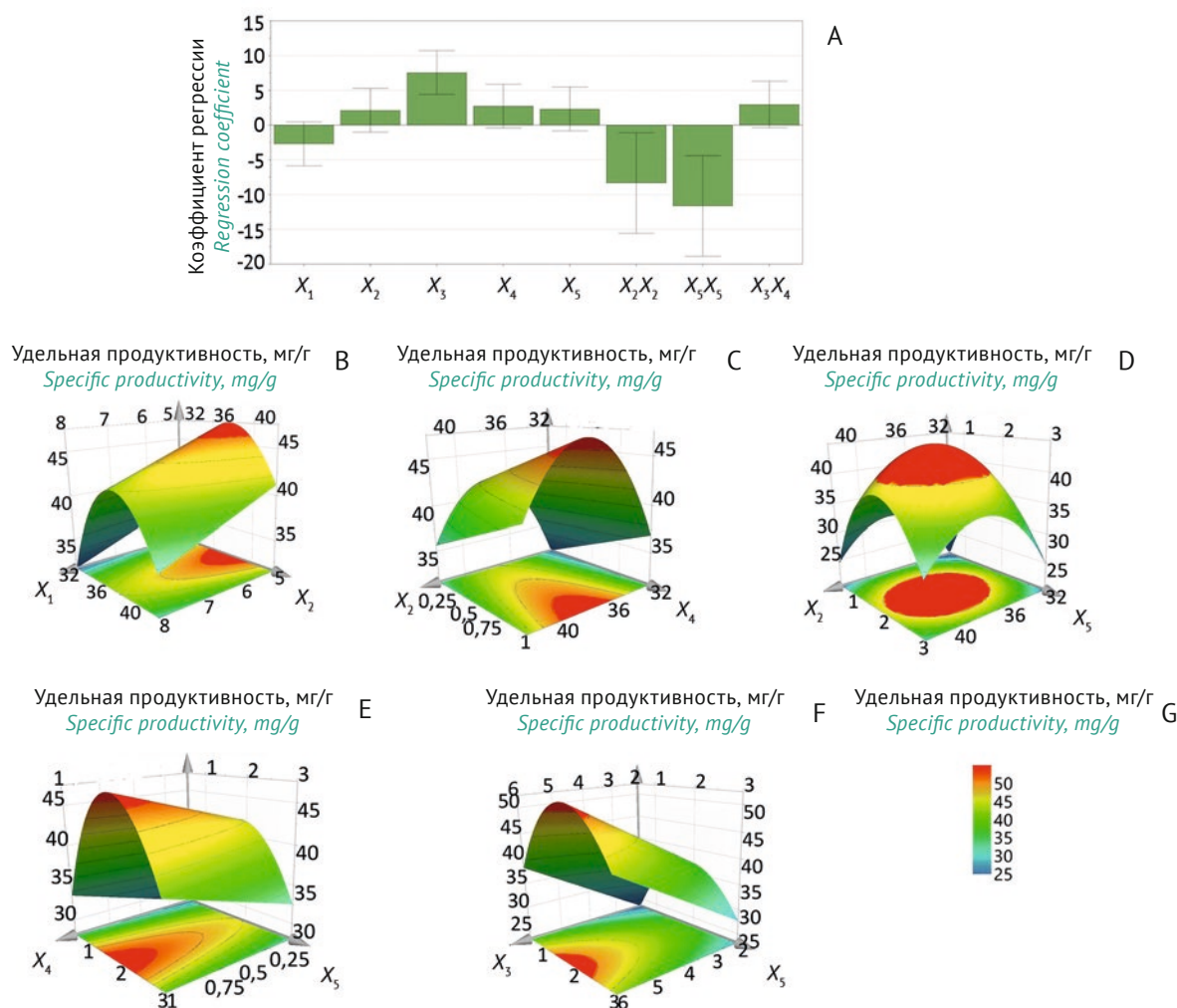


Рис. 1. Коэффициенты регрессии и трехмерные графики поверхностей отклика для удельной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт. А – коэффициенты регрессии, рассчитанные по результатам ССФ дизайна для отклика – удельная продуктивность, где X_1 – pH среды, X_2 – температура, X_3 – длительность индукции, X_4 – концентрация ИПТГ, X_5 – значение показателя OD₆₀₀ (значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм). В – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты pH среды и температуры (°C) при постоянном значении показателя OD₆₀₀ – 1,75, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, длительности индукции – 4 ч. С – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты концентрации ИПТГ (мМ) и температуры (°C) при постоянном значении показателя OD₆₀₀ – 1,75, pH среды – 6,5, длительности индукции – 4 ч. D – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD₆₀₀ и температуры (°C) при постоянном значении концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, pH среды – 6,5, длительности индукции – 4 ч. E – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD₆₀₀ и концентрации ИПТГ (мМ) при постоянном значении температуры – 37°C, pH среды – 6,5, длительности индукции – 4 ч. F – трехмерный график поверхности отклика для удельной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD₆₀₀ и времени индукции (ч) при постоянном значении температуры – 37°C, pH среды – 6,5, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ. G – цветовая шкала значений удельной продуктивности.

Fig. 1. Regression coefficients and 3D response surface plots for the specific productivity of the strain producing proinsulin aspart. A, regression coefficients calculated from the results obtained using the CCF design for the specific productivity as a response variable, where X_1 is the medium pH, X_2 is the temperature, X_3 is the induction time, X_4 is the IPTG concentration (mM), and X_5 is the OD₆₀₀ value (culture broth optical density at 600 nm). B, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the medium pH and the temperature (°C) at a constant OD₆₀₀ value (1.75), IPTG concentration (0.525 mM), and induction time (4 h). C, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the IPTG concentration (mM) and the temperature (°C) at a constant OD₆₀₀ value (1.75), medium pH (6.5), and induction time (4 h). D, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the OD₆₀₀ value and the temperature (°C) at a constant IPTG concentration (0.525 mM), medium pH (6.5), and induction time (4 h). E, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the OD₆₀₀ value and the IPTG concentration (mM) at a constant temperature (37°C), medium pH (6.5), and induction time (4 h). F, 3D response surface plot for the specific productivity depicting interaction effects of the OD₆₀₀ value and the induction time (h) at a constant temperature (37°C), medium pH (6.5), and IPTG concentration (0.525 mM). G, colour range of specific productivity values.

Было определено, что для достижения максимальной концентрации влажной биомассы оптимальным временем начала индукции является окончание экспоненциальной фазы роста (значение OD_{600} составляло 2,75 и выше), а концентрация ИПТГ – 0,25 мМ и ниже (рис. 2С, 2D). Известно, что низкая концентрация ИПТГ и позднее время начала индукции способствуют накоплению биомассы, а не рекомбинантного белка [19].

Значение параметра объемной продуктивности рассчитывается из значений удельной продуктивности и концентрации влажной биомассы. Выявлено, что на объемную продуктивность положительно влияют такие параметры, как длительность индукции и оптическая плотность индукции (рис. 3А). При этом pH среды и температура культивирования не влияют на данный отклик, однако наблюдается статистически зна-

чимое влияние взаимодействия друг с другом ($p < 0,02$) и взаимодействия температуры с временем индукции ($p < 0,02$). Также обнаружено отрицательное квадратичное влияние оптической плотности индукции (рис. 3А).

Было показано, что концентрация ИПТГ не влияет на удельную продуктивность, также не наблюдается взаимодействие данного параметра с другими исследованными параметрами. Возможно, отрицательное влияние концентрации ИПТГ на рост клеток и положительное влияние на удельную продуктивность нивелируют друг друга при расчете объемной продуктивности. В связи с этим было принято решение исключить концентрацию индуктора ИПТГ из данной модели. Кроме того, было показано, что ИПТГ является незначимым параметром во всем исследованном диапазоне concentra-

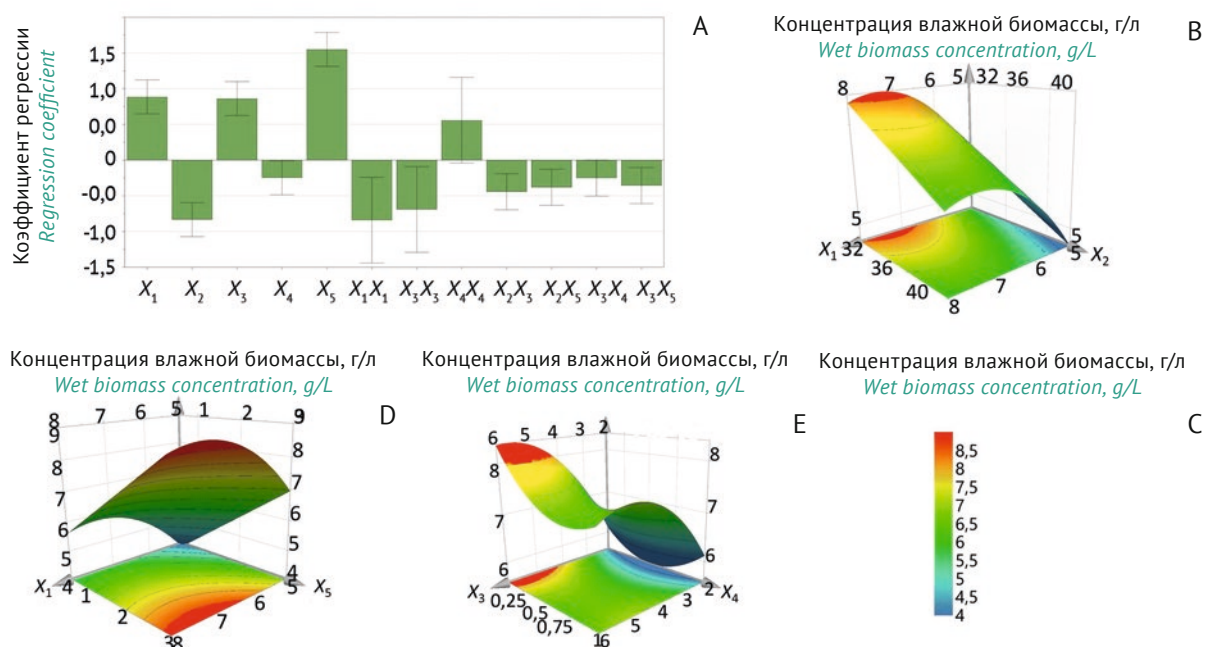


Рис. 2. Коэффициенты регрессии и трехмерные графики поверхностей отклика для концентрации влажной биомассы. А – коэффициенты регрессии, рассчитанные по результатам CCF для отклика – концентрация влажной биомассы, где X_1 – pH среды, X_2 – температура, X_3 – длительность индукции, X_4 – концентрация ИПТГ, X_5 – значение показателя OD_{600} (значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм). В – трехмерный график поверхности отклика для концентрации влажной биомассы, показывающий взаимодействующие эффекты pH среды и температуры ($^{\circ}C$) при постоянном значении показателя OD_{600} – 1,75, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, длительности индукции – 4 ч. С – трехмерный график поверхности отклика для концентрации влажной биомассы, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD_{600} и pH среды при постоянном значении концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, температуры – $37^{\circ}C$, длительности индукции – 4 ч. D – трехмерный график поверхности отклика для концентрации влажной биомассы, показывающий взаимодействующие эффекты концентрации ИПТГ (мМ) и времени индукции (ч) при постоянном значении показателя OD_{600} – 1,75, pH среды – 6,5, температуры – $37^{\circ}C$. Е – цветовая шкала значений концентрации влажной биомассы.

Fig. 2. Regression coefficients and 3D response surface plots for the wet biomass concentration. A, regression coefficients calculated from the results obtained using the CCF design for the wet biomass concentration as a response variable, where X_1 is the medium pH, X_2 is the temperature, X_3 is the induction time, X_4 is the IPTG concentration (mM), and X_5 is the OD_{600} value (culture broth optical density at 600 nm). B, 3D response surface plot for the wet biomass concentration depicting interaction effects of the medium pH and the temperature ($^{\circ}C$) at a constant OD_{600} value (1.75), IPTG concentration (0.525 mM), and induction time (4 h). C, 3D response surface plot for the wet biomass concentration depicting interaction effects of the OD_{600} value and the medium pH at a constant IPTG concentration (0.525 mM), temperature ($37^{\circ}C$), and induction time (4 h). D, 3D response surface plot for the wet biomass concentration depicting interaction effects of the IPTG concentration (mM) and the induction time (h) at a constant OD_{600} value (1.75), medium pH (6.5), and temperature ($37^{\circ}C$). E, colour range of wet biomass concentrations.

ций (рис. 3С). Незначительный эффект влияния изменения концентрации ИПТГ дополнительно подчеркивает значимость длительности индукции на объемную продуктивность, так как необходимо достижение максимальных значений удельной продуктивности и концентрации массы влажного осадка.

Для достижения максимальной объемной продуктивности оптимальным являются следующие значения параметров: температура 39°C и ниже, pH в диапазоне 6,0–8,0 и время начала индукции, соответствующее значению OD_{600} , равному 1,75–2,25 (рис. 3В, С, D).

Таким образом, на основании данных графиков поверхности отклика и построенных моделей были рассчитаны проектные поля процесса индукции проинсулина аспарт в клетках штамма-продуцента *E. coli*: температура куль-

тивирования 35–39°C; pH среды 6,0–7,2; значение показателя OD_{600} – 1,8–2,25; концентрация ИПТГ – 0,05–1,0 мМ; время индукции – 5,5–6,0 ч.

На следующем этапе работы проводилась валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт. Критическим параметром валидации процесса индукции являлась удельная продуктивность. Ее расчетное значение составило 50 мг/г.

Ранее было определено, что для штамма-продуцента BL21 при росте клеток при культивировании в колбах интервал значений показателя OD_{600} от 2,0 до 3,0 соответствовал началу экспоненциальной фазы роста культуры. Данный интервал значений при масштабировании процесса культивирования в условиях биореактора Biostat В соответствует значению показателя OD_{600} от 18,0 до 30,0, что является началом экспоненциальной фазы роста культуры.

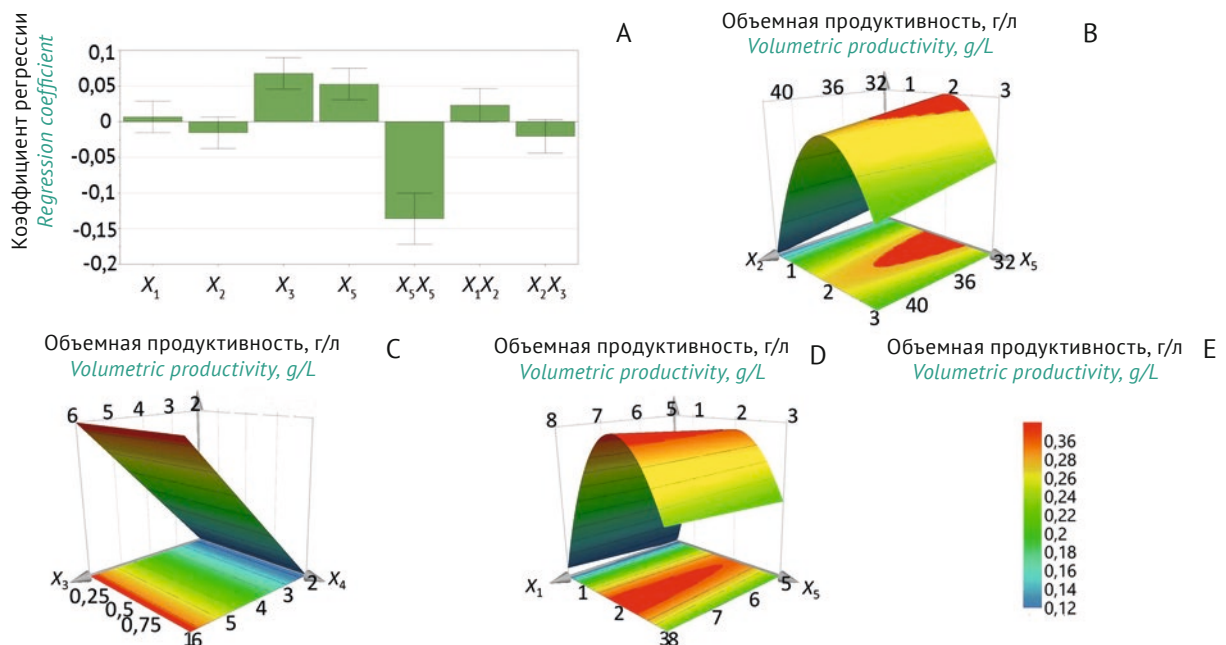


Рис. 3. Коэффициенты регрессии и трехмерные графики поверхностей отклика для объемной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт. А – коэффициенты регрессии, рассчитанные по результатам CCF для отклика – объемная продуктивность, где X_1 – pH среды, X_2 – температура, X_3 – длительность индукции, X_4 – концентрация ИПТГ, мМ, X_5 – значение показателя OD_{600} (значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм). В – трехмерный график поверхности отклика для объемной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты показателя OD_{600} и температуры (°C) при постоянном значении pH среды – 6,5, концентрация ИПТГ – 0,525 мМ, длительности индукции – 4 ч. С – трехмерный график поверхности отклика для объемной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты длительности индукции (ч) и концентрации ИПТГ (мМ) при постоянном значении pH среды – 6,5, температуры – 37°C, показателя OD_{600} – 1,75. D – трехмерный график поверхности отклика для объемной продуктивности, показывающий взаимодействующие эффекты pH среды и показателя OD_{600} при постоянном значении длительности индукции – 4 ч, концентрации ИПТГ – 0,525 мМ, температуры – 37°C. Е – цветовая шкала значений объемной продуктивности.

Fig. 3. Regression coefficients and 3D response surface plots for the volumetric productivity of the strain producing proinsulin aspart. A, regression coefficients calculated from the results obtained using the CCF design for the volumetric productivity as a response variable, where X_1 is the medium pH, X_2 is the temperature, X_3 is the induction time, X_4 is the IPTG concentration (mM), and X_5 is the OD_{600} value (culture broth optical density at 600 nm). B, 3D response surface plot for the volumetric productivity depicting interaction effects of the OD_{600} value and the temperature (°C) at a constant medium pH (6.5), IPTG concentration (0.525 mM), and induction time (4 h). C, 3D response surface plot for the volumetric productivity depicting interaction effects of the induction time (h) and the IPTG concentration (mM) at a constant medium pH (6.5), temperature (37°C), and OD_{600} value (1.75). D, 3D response surface plot for the volumetric productivity depicting interaction effects of the medium pH and the OD_{600} value (h) at a constant induction time (4 h), IPTG concentration (0.525 mM), and temperature (37°C). E, colour range of volumetric productivity values.

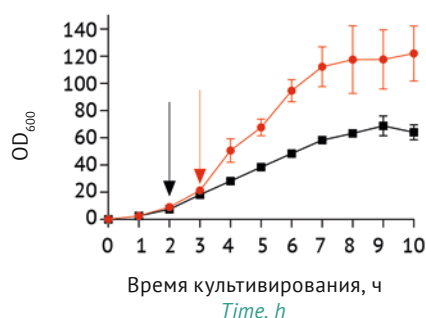


Рис. 4. Кинетика роста клеток *E. coli* в стандартных (черная линия) и в оптимизированных условиях (красная линия) процесса культивирования. OD₆₀₀ — значение оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 600 нм. Стрелками показано время начала индукции. Разбросы на кривых обозначают стандартное отклонение.

Fig. 4. Time course of *E. coli* culture growth under conventional (black line) and optimised (red line) conditions. OD₆₀₀ — culture broth optical density at 600 nm. Arrows indicate the start of induction; error bars show the standard deviation.

Валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт в ферментере

В рамках проведения валидации проводили по три ферментации в стандартных и оптимизированных условиях. Культивирование штамма-продуцента описывалось классическими кривыми роста в обоих исследованных процессах (рис. 4). В период лаг-фазы графики зависимости показателя OD₆₀₀ от времени не отличались.

В стандартных условиях индуктор вносили в переходную фазу роста культуры клеток, в оптимизированных условиях — в начале экспоненциальной фазы роста. Внесение ИПТГ не повлияло на переход культуры в экспоненциальную фазу роста, которая длилась с 3 по 7 ч культивирования. Снижение скорости роста клеток в экспоненциальной фазе в стандартных условиях культивирования обусловлено ранним внесением индуктора в период переходной фазы роста от лаг-фазы к экспоненциальной. При культивировании в оп-

тимизированных условиях снижения скорости роста не наблюдается, вероятно, из-за индукции в начале экспоненциальной фазы роста. Известно, что индукция оказывает метаболическую нагрузку на клетки [17, 18]. Чем выше концентрация клеток, тем ниже отношение ИПТГ к количеству клеток. Стоит отметить, что поздняя индукция, начиная от середины экспоненциальной фазы роста, может негативно влиять на продуктивность из-за превращения большинства ресурсов в биомассу [20]. Кроме того, снижение концентрации индуктора ИПТГ в оптимизированных условиях (0,05 мМ против 0,1 мМ в стандартных условиях), вероятно, уменьшает его токсическое действие на клетки, способствуя достижению большего значения показателя OD₆₀₀ и снижает себестоимость процесса культивирования.

После 7 ч культивирования и в стандартных, и оптимизированных условиях было продемонстрировано замедление скорости роста клеток и выход в стационарную фазу с достижением значений OD₆₀₀ 68,8±7,1 и 122,0±20,3 опт. ед. соответственно (рис. 4).

Кинетику накопления проинсулина аспарт оценивали по изменению удельной и объемной продуктивности в течение периода индукции (рис. 5А, В). Длительность индукции составила 7 ч. С момента внесения индуктора наблюдался рост величины удельной продуктивности с последующим выходом на плато. Максимальные значения удельной продуктивности составили 55,95±4,54 и 49,13±8,67 мг/г для стандартных и оптимизированных условий культивирования соответственно. Статистически значимого отличия между значениями удельной продуктивности в стандартных и в оптимизированных условиях не наблюдалось. Также не выявлены статистически значимые различия между значениями удельной продуктивности при культивировании в колбах и в ферментере. Таким образом, учи-

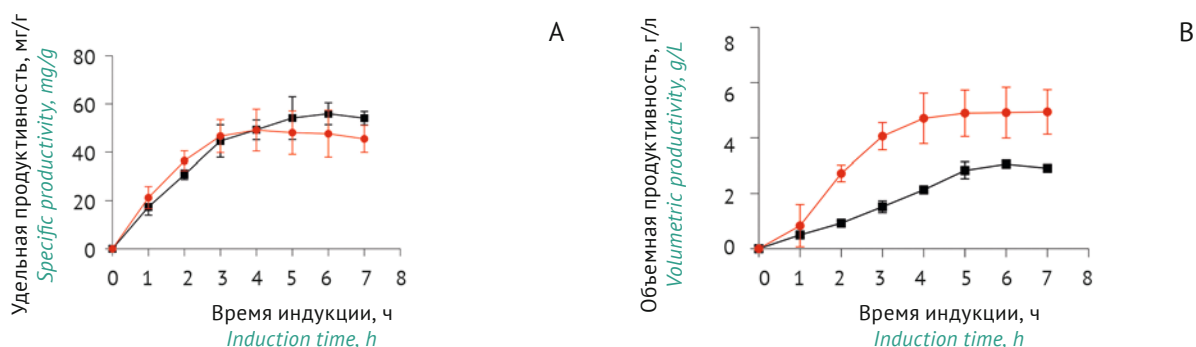


Рис. 5. Удельная (А) и объемная (В) продуктивность культуры в отношении проинсулина аспарт для стандартных (черная линия) и оптимизированных (красная линия) условий.

Fig. 5. Specific (A) and volumetric (B) productivity of the cell culture producing proinsulin aspart under conventional (black line) and optimised (red line) conditions

тая отсутствие различий между значениями удельной продуктивности в стандартных и в оптимизированных условиях, можно сделать вывод о том, что валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт прошла успешно.

В стандартных условиях максимальное значение объемной продуктивности составляло $3,06 \pm 0,16$ г/л на 6 ч индукции, в то время в оптимизированных условиях этот показатель составлял $4,94 \pm 0,80$ г/л на 7 ч индукции. Графики, описывающие биосинтез проинсулина аспарт, коррелируют с соответствующими кривыми роста.

Таким образом, проведенные исследования позволили подобрать оптимальные условия культивирования штамма-продуцента проинсулина аспарт, которые увеличивают его продуктивность на 60%. Повышение продуктивности обусловлено определением оптимальных параметров для роста клеток. Можно предположить, что наибольшее влияние на выход рекомбинантного проинсулина аспарт оказывает снижение метаболической нагрузки на клетки за счет установления оптимального соотношения концентрации ИПТГ и количества клеток в момент индукции.

Выводы

1. Применение подхода математического планирования эксперимента (DoE) позволило

определить оптимальные условия для роста штамма-продуцента *E. coli* и биосинтеза проинсулина аспарт.

2. Показано, что построенные модели для следующих откликов: концентрация влажной биомассы, удельная продуктивность и объемная продуктивность — характеризуются высокой прогностической способностью и соответствуют экспериментальным данным (разница между значениями R^2 и Q^2 менее 0,3 для каждой модели).
3. Составлены проектные поля процесса индукции биосинтеза проинсулина аспарт клетками штамма-продуцента.
4. Продемонстрирована успешная валидация процесса индукции синтеза проинсулина аспарт в ферментере объемом 5,0 л.
5. Показано, что снижение концентрации индуктора ИПТГ в два раза не влияет на удельную продуктивность штамма-продуцента.
6. Достигнуто увеличение значений объемной продуктивности штамма-продуцента проинсулина аспарт на 60%: с $3,06 \pm 0,16$ до $4,94 \pm 0,80$ г/л.
7. Полученные результаты исследования могут быть использованы для повышения эффективности производства инсулина аспарт в промышленных условиях.

Литература/References

1. Chapman TM, Noble S, Goa KL. Insulin aspart: a review of its use in the management of type 1 and 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2002;62(13):1945–81. <https://doi.org/10.2165/00003495-200262130-00014>
2. Valerio LG, Jr. Tenth anniversary of Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(6):767–8. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.920007>
3. Siew YY, Zhang W. Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from *E. coli* inclusion bodies. *Bioresour Bioprocess*. 2021;8(1):65. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00419-w>
4. Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, et al. Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact*. 2014;13:141. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
5. Mikiewicz D, Bierzynska-Krzyzik A, Sobolewska A, Stadnik D, Bogiel M, Pawłowska M, et al. Soluble insulin analogs combining rapid- and long-acting hypoglycemic properties — from an efficient *E. coli* expression system to a pharmaceutical formulation. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172600>
6. Uhoraningoga A, Kinsella GK, Henehan GT, Ryan BJ. The Goldilocks approach: a review of employing design of experiments in prokaryotic recombinant protein production. *Bioengineering (Basel)*. 2018;5(4):89. <https://doi.org/10.3390/biengineering5040089>
7. Haider MA, Pakshirajan K. Screening and optimization of media constituents for enhancing lipolytic activity by a soil microorganism using statistically designed experiments. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007;141(2–3):377–90. <https://doi.org/10.1007/BF02729074>
8. Gutiérrez-González M, Fariás C, Tello S, Pérez-Etcheverry D, Romero A, Zúñiga R, et al. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2019;9(1):16850. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53200-7>
9. Ashayeri-Panah M, Eftekhari F, Kazemi B, Joseph J. Cloning, optimization of induction conditions and purification of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1733c protein expressed in *Escherichia coli*. *Iran J Microbiol*. 2017;9(2):64–73.
10. Azaman SN, Ramakrishnan NR, Tan JS, Rahim RA, Abdullah MP, Ariff AB. Optimization of an induction strategy for improving interferon- α 2b production in the periplasm of *Escherichia coli* using response surface methodology. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010;56(4):141–50. <https://doi.org/10.1042/BA20100104>
11. Huang Y, Lu X, Wang J, Jin X, Zhu J. Optimization of expression conditions of an induction strategy for improving liver targeted interferon (IFN-CSP) production in *E. coli*. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2014;31(2):432–8.
12. Larentis AL, Corrêa Argondizzo AP, dos Santos Esteves G, Jessouron E, Galler R, Medeiros MA. Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expr Purif*. 2011;78(1):38–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.02.013>
13. Mandenius CF, Brundin A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnol Prog*. 2008;24(6):1191–203. <https://doi.org/10.1002/btpr.67>
14. Dolnik V. Capillary electrophoresis of proteins 2005–2007. *Electrophoresis*. 2008;29(1):143–56. <https://doi.org/10.1002/elps.200700584>
15. Castellanos-Mendoza A, Castro-Acosta RM, Olvera A, Zavala G, Mendoza-Vera M, García-Hernández E, et al. Influence of pH control in the formation of inclusion bodies

- during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2014;13:137. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0137-9>
16. Slouka C, Kopp J, Hutwimmer S, Strahammer M, Strohm D, Eitenberger E, et al. Custom made inclusion bodies: impact of classical process parameters and physiological parameters on inclusion body quality attributes. *Microb Cell Fact*. 2018;17(1):148. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0997-5>
 17. Chen H, Jiang P, Li F, Wu H. Improving production of thermostable and fluorescent holo- β -allophycocyanin by metabolically engineered *Escherichia coli* using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*. 2015;45(7):730–41. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.943374>
 18. Einsfeldt K, Severo Júnior JB, Corrêa Argondizzo AP, Medeiros MA, Alves TL, Almeida RV, Larentis AL. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*. 2011;29(41):7136–43. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.073>
 19. Marini G, Luchese MD, Corrêa Argondizzo AP, Magalhães Andrade de Góes AC, Galler R, Moitinho Alves TL, et al. Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process. *BMC Biotechnol*. 2014;14:1. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-1>
 20. Mühlmann M, Forsten E, Noack S, Büchs J. Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Microb Cell Fact*. 2017;16(1):220. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0832-4>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.А. Корнаков** — идея исследования, планирование и проведение экспериментов, анализ данных, написание текста рукописи; **З.Р. Хасаншина** — планирование и анализ данных экспериментов, написание текста рукописи; **Д.А. Сеничкина** — проведение экспериментов по культивированию; **А.А. Филипенко** — проведение капиллярного электрофореза; **И.С. Лунев** — интерпретация и анализ данных; **Р.В. Драй** — определение основного направления исследования, утверждение окончательной версии статьи.

Благодарности. Исследование проводилось при спонсорской поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Авторы выражают признательность коллегам, которые оказывали помощь в выполнении исследования, сотрудникам лаборатории генной инженерии и ферментации.

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.A. Kornakov** suggested the study idea, planned and carried out experiments; analysed data; and drafted the manuscript. **Z.R. Khasanshina** planned experiments, analysed experimental data, and drafted the manuscript. **D.A. Senichkina** carried out cultivation experiments. **A.A. Filipenko** performed capillary electrophoresis. **I.S. Lunev** interpreted and analysed data. **R.V. Drai** set the main research direction and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study was supported by GEROPHARM. The authors are grateful to their colleagues who helped them with this study and to the staff of the Laboratory for genetic engineering and fermentation.

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

Об авторах / Authors

Корнаков Игорь Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0207-5244>

Igor.Kornakov@geropharm.com

Хасаншина Зухра Рамилевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>

Zuhra.hasanshina@geropharm.com

Сеничкина Дина Александровна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2220-0591>

Dina.Senichkina@geropharm.com

Филипенко Антон Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9985-9573>

Anton.Filipenko@geropharm.com

Лунев Иван Сергеевич

inav.lunev96@gmail.com

Драй Роман Васильевич, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

roman.drai@geropharm.com

Igor A. Kornakov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0207-5244>

Igor.Kornakov@geropharm.com

Zukhra R. Khasanshina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>

Zuhra.hasanshina@geropharm.com

Dina A. Senichkina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2220-0591>

Dina.Senichkina@geropharm.com

Anton A. Filipenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9985-9573>

Anton.Filipenko@geropharm.com

Ivan S. Lunev

inav.lunev96@gmail.com

Roman V. Drai, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

roman.drai@geropharm.com

Поступила 22.06.2022

После доработки 05.05.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Received 22 June 2022

Revised 5 May 2023

Accepted 7 June 2023



Оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляреминого (Тулярина) по показателю «Подлинность»

И.В. Касина[✉], С.А. Алексеева, Т.И. Немировская

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

✉ Касина Ирина Владимировна; kasina@expmed.ru

Резюме

Определение показателя качества «Подлинность», согласно требованиям нормативной документации на вакцину чумную живую и аллерген туляреминый жидкий (Тулярин), проводится иммунофлуоресцентным методом, однако серьезным недостатком метода является его трудоемкость. Альтернативным методом испытания данных препаратов является иммунохроматографический (ИХ) метод, обладающий рядом преимуществ, в том числе высокой скоростью проведения испытания и простотой учета результатов.

Цель работы: оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляреминого (Тулярина) по показателю «Подлинность».

Материалы и методы: испытание показателя качества «Подлинность» проводили на образцах фармакопейного стандартного образца вакцины чумной живой и трех коммерческих серий вакцины; аллергена туляреминого жидкого (Тулярин) двух серий. Исследование показателя качества «Подлинность» препаратов ИХ методом проводили с помощью следующих наборов реагентов: ИХ тест-система для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *Yersinia pestis* «ИХ тест-система *Y. pestis*» и ИХ тест-система для экспресс-выявления и идентификации *Francisella tularensis* «ИХ тест-система *F. tularensis*» производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Результаты: показано, что ИХ метод является эффективным экспресс-методом для видоспецифического подтверждения наличия *Y. pestis* в вакцине чумной живой и *F. tularensis* в аллергене туляремином жидком (Тулярин). Установлена рекомендуемая концентрация вакцины чумной живой для проведения испытания по показателю «Подлинность» ИХ методом — 10^9 м.к./мл. Испытание аллергена туляреминого жидкого (Тулярина) по показателю «Подлинность» ИХ методом рекомендовано проводить с использованием цельного препарата.

Выводы: полученные результаты могут служить основанием для внесения ИХ метода с использованием указанных наборов реагентов в нормативную документацию на вакцину чумную живую и на аллерген туляреминый жидкий (Тулярин) в качестве альтернативного метода определения показателя «Подлинность».

Ключевые слова: вакцина чумная живая; *Yersinia pestis*; аллерген туляреминый жидкий (Тулярин); *Francisella tularensis*; подлинность; иммунохроматографический метод; иммунохроматографическая тест-система; фармакопейный стандартный образец мутности бактериальных взвесей 10 МЕ; нормативная документация

Для цитирования: Касина И.В., Алексеева С.А., Немировская Т.И. Оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена тулярийного (Тулярина) по показателю «Подлинность». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):231–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-231-240>

Evaluation of the applicability of immunochromatography to the identification of live plague vaccines and the tularaemia allergen (Tularin)

I.V. Kasina✉, S.A. Alekseeva, T.I. Nemirovskaya

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

✉ Irina V. Kasina; kasina@expmed.ru

Abstract

The regulatory standards require that the identification of live plague vaccines and the liquid tularaemia allergen (Tularin) should be performed by immunofluorescence. A major drawback of the recommended method is its labour intensive nature. However, immunochromatography represents an alternative method that offers a number of advantages, including rapid testing and easy result interpretation.

The aim of the study was to assess the applicability of immunochromatography to the identification of live plague vaccines and the liquid tularaemia allergen (Tularin).

Materials and methods. The authors performed identification tests using samples of the pharmacopoeia standard for live plague vaccines, three commercial batches of a live plague vaccine, and two batches of the liquid tularaemia allergen (Tularin). These samples were tested using immunochromatographic assay (ICA) reagent kits for rapid detection and identification of *Yersinia pestis* (ICA System for *Y. pestis*) and *Francisella tularensis* (ICA System for *F. tularensis*) manufactured by the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology.

Results. The findings show that immunochromatography is an effective, rapid, and species-specific method to confirm the presence of *Y. pestis* in a sample of a live plague vaccine or *F. tularensis* in a sample of the liquid tularaemia allergen (Tularin). To perform identification tests by immunochromatography, the authors recommend diluting live plague vaccine samples to a concentration of 10^9 bacterial cells/mL and using undiluted samples of the liquid tularaemia allergen (Tularin).

Conclusions. The study results may support the inclusion of ICA into the regulatory standards for live plague vaccines and the liquid tularaemia allergen (Tularin) as an alternative identification method.

Key words: live plague vaccine; *Yersinia pestis*; liquid tularaemia allergen (Tularin); *Francisella tularensis*; identification; immunochromatographic method, immunochromatographic test system; 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity; regulatory standards

For citation: Kasina I.V., Alekseeva S.A., Nemirovskaya T.I. Evaluation of the applicability of immunochromatography to the identification of live plague vaccines and the tularaemia allergen (Tularin). *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):231–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-231-240>

Введение

В соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) — ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты¹ подлинность лекарственного препарата определяется с помощью различных лабораторных методов, позволяющих специфически его идентифицировать. Определение показателя качества «Подлинность», согласно требованиям нормативной документации (НД) на вакцину чумную живую² и аллерген туляремиальный жидкий (Тулярин)³, проводится иммунофлуоресцентным методом. Результаты контроля оценивают при микроскопии мазков из препарата, окрашенных специфическими флуоресцирующими иммуноглобулинами. В качестве недостатков метода иммунофлуоресценции следует отметить его трудоемкость, обусловленную необходимостью проведения довольно длительной пробоподготовки, и наличие специального дорогостоящего оборудования. Кроме того, процедура проведения экспертизы качества чумной вакцины по показателю «Подлинность» становится зависимой от наличия диагностических чумных флуоресцирующих иммуноглобулинов, выпускаемых единственным производителем — ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

В целях поиска альтернативных методов испытания вакцины чумной живой и аллергена туляремиального жидкого по показателю «Подлинность» нами был проведен анализ существующих методов определения этого показателя и возможностей выпускаемых зарегистрированных диагностических препаратов и тест-систем [1]. Предпочтение имели методы для ускоренной идентификации чумного и туляремиального микробов в течение одного рабочего дня. Выбор авторов статьи был сделан в пользу иммунохроматографического (ИХ) метода. Принцип действия данного метода, как и иммунофлуоресценции, основан на реакции образования иммунного комплекса «антиген-антитело». При этом на мембранные компоненты тест-полоски предварительно нанесены реагенты, и при контакте с пробой происходит движение жидкости по мембранам с образованием специфических иммунных комплексов, которые благодаря включению окрашенного маркера могут детектироваться визуально [2].

Достоинствами выбранного метода являются высокая скорость проведения испытания (10–15 мин), малые объемы испытуемого образца, простота учета и интерпретации результата, а также высокая чувствительность и воспроизводимость. Достоверность результатов тестирования достигает 92–99,8%, при этом каждый тест имеет встроенный внутренний контроль. Данный метод подходит для количественного определения, обладает возможностью использования при помощи портативных ридеров, совместимых с компьютером, и возможностью мультианализа результатов иммунохроматографии, что обусловило активное применение метода иммунохроматографического анализа (ИХА) для решения разнообразных диагностических задач [2].

Метод ИХА используется в различных областях народного хозяйства и медицины, успешно применяется в лабораторной диагностике особо опасных инфекционных заболеваний, в том числе для выявления чумного и туляремиального микробов [3, 4].

В зарубежной научной литературе имеются данные о разработке и тестировании экспресс-диагностического ИХ-теста на наличие возбудителя бубонной и легочной форм чумы [5]. Установлено, что при применении ИХ-теста для ускоренной идентификации чумного микроба при исследовании клинического материала аналитическая чувствительность набора реагентов составила 0,5 нг/мл F1-антигена, время проведения анализа — не более 15 мин.

В отечественной литературе также описаны результаты апробации российской ИХ тест-системы производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) для индикации капсульного антигена чумного микроба в полевых изолятах *Y. pestis* и в суспензиях органов мелких млекопитающих. Показана высокая информативность ИХ-теста, достоверность полученных результатов, и доказано, что данный диагностический препарат может быть использован для экспресс-индикации антигена фракции 1 (F1) чумного микроба непосредственно при вскрытии животных, в том числе при проведении диагностических исследований не только в очагах чумы, но и в работе мобильного ком-

¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² Фармакопейная статья 3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Фармакопейная статья 3.3.1.0068.18 Аллерген туляремиальный жидкий (Тулярин). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

плекса санитарной противоэпидемической бригады [6–8].

В Российской Федерации ведутся научные разработки иммуноферментных и иммунохроматографических моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии [9, 10]. В настоящее время зарегистрирован диагностический препарат – набор реагентов ИХ тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии «ИХ тест-система *F. tularensis*» производства ФБУН ГНЦ ПМБ. Имеется описание применения данной тест-системы для экспресс-выявления антигена *F. tularensis* при мониторинге природных очагов туляремии. В работе А.А. Зайцева с соавт. [11, 12] показано, что с учетом методической простоты постановки реакций для экспресс-выявления липополисахарида (ЛПС) – антигена возбудителя туляремии и возможности быстрого получения результата (15–20 мин) ИХ-тест может быть рекомендован для изучения проб, в которых возможно присутствие антигена в заведомо большой концентрации. К таким пробам относятся взвеси из штаммов возбудителя туляремии, выделяемых на территории природных очагов, суспензии внутренних органов павших биопробных животных и суспензии пулов иксодовых клещей [11, 12].

Ранее авторами данной статьи были представлены результаты успешного применения ИХ-тестов в испытании вакцины туляремийной живой и вакцины сибиреязвенной живой по показателю качества «Подлинность» [13, 14].

Цель работы – оценка возможности применения иммунохроматографического метода для экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремийного (Тулярина) по показателю «Подлинность».

Материалы и методы

Материалы:

- вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, серии 3-18, 1-21, 2-21;
- фармакопейный стандартный образец (ФСО) вакцины чумной живой – ФСО 3.2.00392 (отраслевой стандартный образец

(ОСО) 42-28-392) серий 10 и 11 производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России;

- аллерген туляремийный жидкий (Тулярин), суспензия для накожного скарификационного нанесения 20 доз/мл производства АО «НПО «Микроген», серии О9 и О0121;
- ФСО мутности бактериальных взвесей – ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) (10 МЕ) производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (далее – ФСО мутности);
- иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей производства ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора по ТУ 21.20.21-46-01897080-2017 (регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8209 от 15.03.2019), серия 122, срок годности 2 года;
- иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие («РИФ-Тул-СтавНИПЧИ») производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора по ТУ 8961-016-01898109-2007 (регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00881 от 15.03.2013, по ГОСТ Р 7.0.12-2011), серия С 3-19, срок годности 3 года;
- набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы «ИХ тест-система *Y. pestis*» производства ФБУН ГНЦ ПМБ по ТУ 9398-091-78095326-2008 (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05487), серии 11 и 18, срок годности 1 год;
- набор реагентов иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии «ИХ тест-система *F. tularensis*» производства ФБУН ГНЦ ПМБ по ТУ 9398-092-78095326-2008 (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05486), серии 11 и 18, срок годности 1 год.

Все препараты использованы в течение срока их годности.

Методы

В соответствии с НД⁴ испытание по показателю «Подлинность» вакцины чумной живой и аллергена туляремийного проводили иммунофлуоресцентным методом. Для приготовления мазка вакцину чумную живую разводили 0,9% раствором натрия хлорида до концентрации 5×10^8 м.к./мл. Мазок из аллергена туляремийного

⁴ Нормативная документация. ЛСР-005759/08-231120, Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций.
Нормативная документация. ЛСР-009941/08-220921, Аллерген туляремийный жидкий (Тулярин), суспензия для накожного скарификационного нанесения.

готовили из цельного препарата. Далее мазки окрашивали соответствующими иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими согласно инструкции по применению. В мазках микробные клетки должны иметь яркое зеленовато-желтое свечение по периферии. Учет результатов проводили по четырехкрестовой системе: 4 креста — сверкающая флуоресценция желтовато-зеленого цвета оболочки микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; 3 креста — яркая флуоресценция желтовато-зеленого цвета оболочки микробной клетки; 2 креста и 1 крест — слабое свечение всей клетки. Положительным результатом считали свечение на 3 и 4 креста.

Для постановки ИХ реакций использовали зарегистрированные коммерческие препараты. ИХ-тест (иммунохроматографическая полоска) состоит из следующих основных элементов: пластиковая подложка, на которую наклеены все остальные компоненты теста; фильтр (прокладки для образца); прокладка или мембрана с конъюгатом; хроматографическая мембрана, содержащая одну или несколько зон захвата иммунных комплексов и контрольную зону захвата; мембрана абсорбции (впитывающая прокладка).

В соответствии с инструкцией по применению набор реагентов «ИХ тест-система *Y. pestis*» предназначен для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *Y. pestis* при проведении лабораторных исследований объектов окружающей среды. «ИХ тест-система *Y. pestis*» обеспечивает видоспецифическое выявление и идентификацию микробных клеток *Y. pestis* в концентрации 10^7 м.к./мл и капсульного антигена F1 *Y. pestis* в концентрации 0,01 мг/мл в суспензиях, полученных из колоний микроорганизмов, выращенных на питательном агаре, и в суспензиях, полученных из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки. Тест-система не выявляет микробные клетки бескапсульных штаммов *Y. pestis*.

В проведенном испытании использованы коммерческие серии и серии ФСО вакцины чумной живой. Вакцина представляла собой лиофилизированные в стабилизирующей среде микробные клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, который имеет капсульный антиген F1. Ампулу с вакциной восстанавливали в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида, довели до концентрации микробных клеток по ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, соответствующей 10^9 м.к./мл для чумного микроба, и инактивировали при температуре 56 °C в течение 30 мин. Дополнительно полученный образец разводили в 0,01 М натрий-фосфатном

буферном растворе (pH 7,4) до концентраций 10^8 м.к./мл и 10^7 м.к./мл. Далее постановку теста и учет результатов осуществляли в соответствии с инструкцией по применению набора «ИХ тест-система *Y. pestis*».

Набор реагентов «ИХ тест-система *F. tularensis*» предназначен для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *F. tularensis* в микробных взвесах с концентрацией 10^7 м.к./мл, полученных из колоний микроорганизмов или из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки (культивирование и инактивирование микроорганизма). Специфической мишенью, наличие которой в пробе выявляет данный тест, является ЛПС *F. tularensis*.

Аллерген туляремиальный жидкий (Тулярин) представляет собой инактивированную нагреванием суспензию культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации $(9,5 \pm 0,5) \times 10^9$ м.к./мл. Инактивирование и дополнительная пробоподготовка препарата для испытания не требуются. В исследовании использовали пробы неразведенного препарата и разведенного в буферном растворе до концентрации 5×10^9 м.к./мл, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ. Постановку теста и учет результатов осуществляли согласно инструкции по применению: извлекали тест-систему из холодильника, выдерживали 15 мин при комнатной температуре, извлекали из упаковки, помещали в чашку Петри, с помощью дозатора наносили в приемное окно тест-системы подготовленные пробы вакцины или аллергена в объеме 0,1 мл и после 3 мин экспозиции в него же дополнительно вносили 0,1 мл фосфатно-буферного раствора (ФБР). Буферный раствор готовили *ex tempore*, стерилизация раствора не требуется. Через 15–20 мин получали результат, который определяется визуально. Положительным результатом на присутствие туляремиального микроба в «ИХ тест-системе *F. tularensis*» и на присутствие капсульного антигена чумного микроба в «ИХ тест-системе *Y. pestis*» является наличие видимых глазом красных линий в зоне «С» и «Т», где зона «С» — контрольная полоса, а зона «Т» — опытная полоса. При этом интенсивность цвета полос не учитывали (интенсивность полос в зоне «С» и «Т» может отличаться). Об отрицательном результате свидетельствует наличие красной линии только в зоне «С».

В связи с тем что в задачи исследования не входило изучение специфичности наборов «ИХ тест-система *Y. pestis*» и «ИХ тест-система *F. tularensis*», так как они являются зарегистрированными коммерческими препаратами с заявленной чувствительностью и специфичностью,

контрольной пробой служили не образцы других вакцин против особо опасных инфекционных заболеваний, а 0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор, которым разводили образцы вакцины чумной и Тулярина.

Результаты и обсуждение

Результаты испытания вакцины чумной и аллергена туляремии по показателю «Подлинность» иммунофлуоресцентным методом в соответствии с действующей НД представлены на рисунках 1 и 2. *Y. pestis* — овоидная грамотрицательная палочка размером 1–2×0,3–0,7 мкм, окрашивается биполярно [15]. Чумной микроб крупнее туляремии в 5 раз. На фотографии (рис. 1) отчетливо видно специфическое свечение оболочки микробной клетки, что соответствует оценке в 4 и 3 креста, и темное тело клетки. Туляреминый микроб представляет собой грамотрицательные очень мелкие (0,1–0,5 мкм) неподвижные полиморфные кокковидные палочки [15]. Соответственно, при увеличении в 1000 раз микробные клетки светятся целыми конгломератами, что затрудняет учет результатов (рис. 2). Указанные выше недостатки и возможные трудности при проведении иммунофлуоресценции являются ограничением использования данного метода.

Далее были проведены испытания качества вакцины чумной живой по показателю «Подлинность» с использованием диагностического препарата «ИХ тест-система *Y. pestis*». Специфической мишенью ИХ-теста является капсульный антиген, который синтезируется плазмидой

pFra вакцинного штамма *Y. pestis* EB, входящего в состав вакцины чумной живой.

В первом испытании с целью выбора нужной концентрации чумного микроба для определения показателя «Подлинность» использовали препарат вакцины чумной живой коммерческой серии 3-18 и ФСО вакцины чумной живой серии 10 в концентрациях 10^9 , 10^8 , 10^7 м.к./мл. Полученные результаты (рис. 3) продемонстрировали наличие реакции связывания антигена со специфическими антителами в обеих сериях вакцины в концентрациях 10^9 и 10^8 м.к./мл. В тестовой зоне видно наличие полос красного цвета. Заявленная чувствительность тест системы — 10^7 м.к./мл, но в данной концентрации реакция ИХ-теста была отрицательная (рис. 3А и 3В). Возможно, это объясняется тем, что некоторые компоненты вакцины ингибируют процесс выявления *Y. pestis* в заявленной концентрации. Цель наших исследований состояла не в индикации возбудителя чумы, а в подтверждении подлинности вакцины чумной живой, что равнозначно при использовании иммунофлуоресцентного метода в соответствии с действующей НД. Чувствительность иммунофлуоресцентного метода для индикации возбудителя чумы — 5×10^5 м.к./мл, а рекомендуемая концентрация вакцины для приготовления мазков при испытании по показателю «Подлинность» — 5×10^8 м.к./мл. Таким образом, в соответствии с полученными результатами заявленная чувствительность тест-системы позволяет использовать ИХ-тест для подтверждения подлинности вакцины чумной живой в соответствии с действующей НД. Исходя из того что в 1 мл

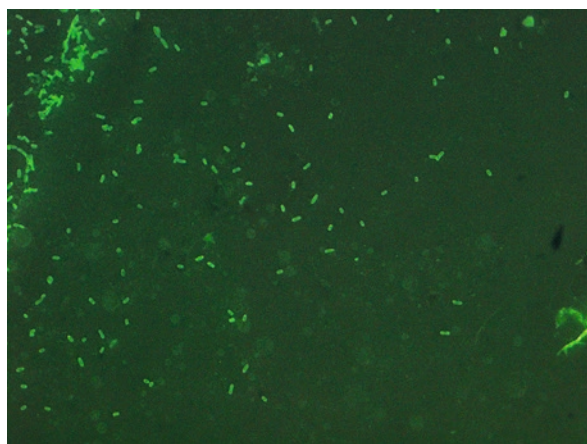


Рис. 1. Результаты испытаний вакцины чумной живой по показателю «Подлинность» с помощью препарата иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих чумных адсорбированных лошадиных. Микроскопия, увеличение ×1000.

Fig. 1. Results of live plague vaccine identification using diagnostic adsorbed fluorescent equine plague immunoglobulins. Microscopy, ×1000 magnification.

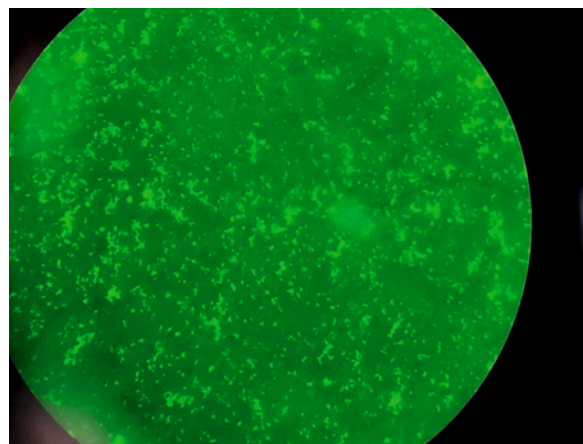


Рис. 2. Результаты испытаний аллергена туляремии (Тулярина) по показателю «Подлинность» с помощью препарата иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляреминых адсорбированных. Микроскопия, увеличение ×1000.

Fig. 2. Results of tularemia allergen (Tularin) identification using diagnostic adsorbed fluorescent tularemia immunoglobulins. Microscopy, ×1000 magnification.

вакцины содержится от 50 до 100 млрд микробных клеток чумного микроба, для проведения испытания по показателю «Подлинность» дополнительной пробоподготовки вакцины не требуется и проведение испытания занимает минимальное время.

Далее, для подтверждения выбранной концентрации 10^9 м.к./мл вакцины чумной для испытания по показателю «Подлинность» с помощью набора реагентов «ИХ тест-система *Y. pestis*» нами были проведены дополнительные исследования вакцины чумной живой других коммерческих серий (1-21; 2-21) и ФСО вакцины чумной живой серии 11. При испытании вакцины в концентрации 10^9 м.к./мл, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, отчетливо видны полосы красного цвета как в зоне «С» (контрольная зона), так и в зоне «Т» (тестовая зона) (рис. 3С). Учитывая, что реакция качественная, разница в интенсивности окраски полос не имеет значения.

Таким образом, на основании полученных результатов для проведения испытания вакцины чумной по показателю «Подлинность» ИХ методом рекомендуется образец вакцины разводить до концентрации 10^9 м.к./мл, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ.

Следует отметить, что для сокращения времени контроля данное испытание возможно проводить параллельно с определением общей концентрации микробных клеток в вакцине, при котором применяется ФСО мутности 10 МЕ.

В ходе проведения исследования нами впервые был применен диагностический препарат «ИХ тест-система *F. tularensis*» для оценки качества аллергена туляремийного жидкого (Тулярина) по показателю «Подлинность». При испытании Тулярина с помощью набора реагентов «ИХ тест-система *F. tularensis*» использовали образцы коммерческих серий О9 и О0121 неразведенного (цельного) препарата (концентрация $1,0 \times 10^{10}$ м.к./мл) и разведенного до концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (концентрация 5×10^9 м.к./мл). Постановку опыта с неразведенным препаратом проводили на разных образцах серии О0121 два оператора. Результаты испытания двух серий аллергена представлены на рисунке 4. Показано, что при испытании всех образцов отчетливо выявлены полосы красного цвета как в зоне «С» (контрольная зона), так и в «Т» (тестовая зона). При этом полосы по интенсивности практически не отличаются друг от друга.

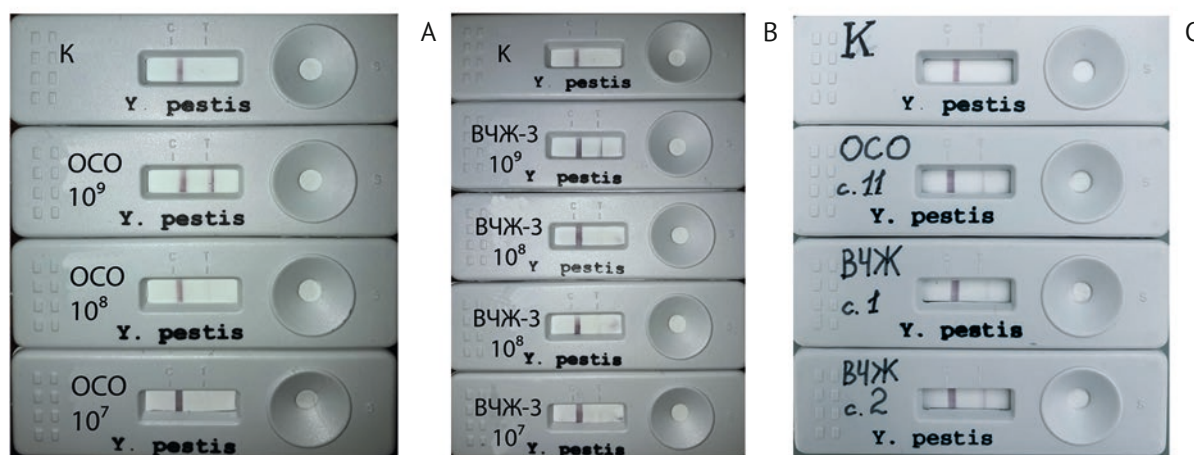


Рис. 3. Результаты испытаний вакцины чумной живой (ВЧЖ) с применением набора реагентов «ИХ тест-система *Y. pestis*» по показателю «Подлинность». А — отраслевой стандартный образец ВЧЖ (OCO 42-28-392) — фармакопейный стандартный образец ФСО 3.2.00392 ВЧЖ серии 10 в концентрации 10^9 , 10^8 , 10^7 м.к./мл. В — ВЧЖ-3 — ВЧЖ коммерческой серии 3-18 в концентрации 10^9 , 10^8 , 10^7 м.к./мл. С — ОСО с. 11 — ФСО 3.2.00392 (OCO 42-28-392) ВЧЖ серии 11 в концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (10^9 м.к./мл); ВЧЖ с. 1, ВЧЖ с. 2 — ВЧЖ коммерческих серий 1-21 и 2-21 в концентрации 10^9 м.к./мл. На всех рисунках К — контроль — 0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор.

Fig. 3. Results of live plague vaccine identification using the ICA System for *Y. pestis*. A, pharmacopoeia standard for live plague vaccines No. ФСО 3.2.00392 (industrial reference material for live plague vaccines No. OCO 42-28-392), batch 10, at concentrations of 10^9 , 10^8 , 10^7 bacterial cells/mL, labelled as “OCO”. B, commercial live plague vaccine, batch 3-18, at concentrations of 10^9 , 10^8 , 10^7 bacterial cells/mL, labelled as “ВЧЖ-3”. C, pharmacopoeia standard for live plague vaccines No. ФСО 3.2.00392 (industrial reference material for live plague vaccines No. OCO 42-28-392), batch 11, at a concentration of 10^9 bacterial cells/mL corresponding to the 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity, labelled as “OCO c.11”; “ВЧЖ с. 1” and “ВЧЖ с. 2”, commercial live plague vaccine, batches 1-21 and 2-21, at a concentration of 10^9 bacterial cells/mL. K, control sample (0.01 M phosphate buffered saline).

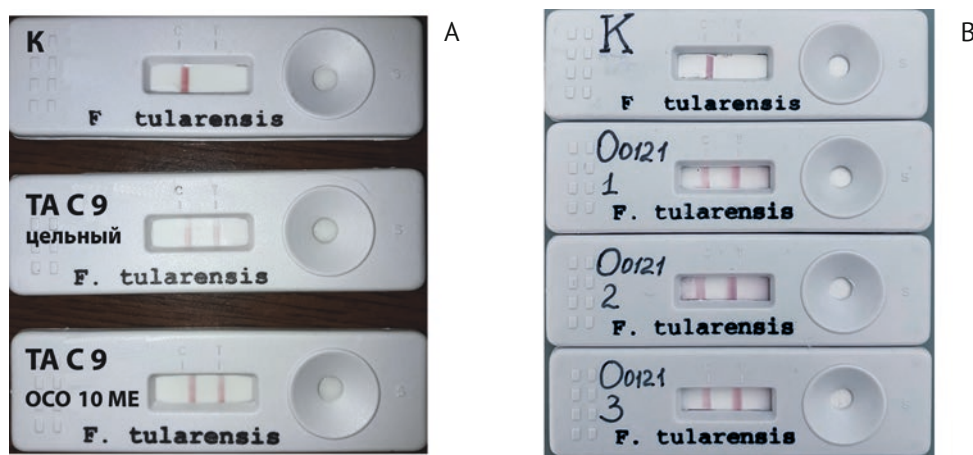


Рис. 4. Результаты испытаний аллергена туляремии (Тулярина) с применением набора реагентов «ИХ тест-система *F. tularensis*» по показателю «Подлинность». А — ТА С 9 цельный — образец аллергена туляремии (Тулярина) коммерческой серии О9 (цельный препарат в концентрации $1,0 \times 10^{10}$ м.к./мл), ТА С 9 ОCO 10 ME — образец Тулярина в концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 ME ($5,0 \times 10^9$ м.к./мл). В — О0121 (1) — образец аллергена туляремии (Тулярина) коммерческой серии О0121 в концентрации, соответствующей ФСО мутности бактериальных взвесей 10 ME ($5,0 \times 10^9$ м.к./мл); О0121 (2, 3) — образцы Тулярина серии О0121 (цельный препарат в концентрации $1,0 \times 10^{10}$ м.к./мл). На всех рисунках К — контроль — 0,01 М натрий-фосфатный буферный раствор.

Fig. 4. Results of tularaemia allergen (Tularin) identification using the ICA System for *F. tularensis*. A, tularaemia allergen (Tularin), commercial batch O9, at a concentration of 1.0×10^{10} bacterial cells/mL (undiluted), labelled as “ТА С 9 цельный”; and tularaemia allergen (Tularin), commercial batch O9, at a concentration of 5.0×10^9 bacterial cells/mL corresponding to the 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity, labelled as “ТА С 9 ОCO 10 ME”. B, tularaemia allergen (Tularin), commercial batch O0121, at a concentration of 5.0×10^9 bacterial cells/mL corresponding to the 10 IU pharmacopoeia standard for bacterial suspension turbidity, labelled as “O0121 (1)”; and tularaemia allergen (Tularin), commercial batch O0121, at a concentration of 1.0×10^{10} bacterial cells/mL (undiluted), labelled as “O0121 (2, 3)”. K, control sample (0.01 M phosphate buffered saline).

Таким образом, на основании полученных результатов для проведения испытания аллергена туляремии жидкого (Тулярина) по показателю «Подлинность» иммунохроматографическим методом рекомендуется использовать неразведенный (цельный) препарат по причине незначительности отличий в концентрации цельного и разведенного препарата.

Выводы

1. Иммунохроматографический метод является эффективным экспресс-методом для видоспецифического подтверждения наличия *Y. pestis* в вакцине чумной живой. Рекомендуемая концентрация вакцины чумной живой для проведения испытания по показателю «Подлинность» иммунохроматографическим методом — 10^9 м.к./мл.

2. Иммунохроматографический метод является эффективным экспресс-методом

для видоспецифического подтверждения наличия *F. tularensis* в аллергене туляремии жидком (Тулярин). Проведение испытания по показателю «Подлинность» иммунохроматографическим методом аллергена туляремии жидкого (Тулярина) рекомендуем проводить с цельным препаратом.

3. Использование иммунохроматографического метода может быть рекомендовано для проведения экспертизы качества вакцины чумной живой и аллергена туляремии (Тулярина) по показателю «Подлинность».

4. Результаты проведенного исследования могут служить основанием для внесения иммунохроматографического метода в нормативную документацию на вакцину чумную живую и на аллерген туляремии жидкий (Тулярин) в качестве альтернативного метода определения показателя «Подлинность».

Литература/References

1. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.: Шико; 2013. Onishchenko GG, Kuttyrev VV, eds. *Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical guide*. Moscow: Shiko; 2013 (In Russ.). EDN: SHFBUN
2. Андрюков БГ, Ляпун ИН, Бынина МП, Матосова ЕВ. Упрощенные форматы современных биосенсоров: 60 лет использования иммунохроматографических тест-систем в лабораторной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020;65(10):611–8.

- Andryukov BG, Lyapun IN, Bynina MP, Matosova EV. Simplified formats of modern biosensors: 60 years of use immunochromatographic test systems in laboratory diagnostics. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020;65(10):611–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-611-618>
3. Соловьев ПВ, Баранова ЕВ, Федюкина ГН. Разработка и опытно-экспериментальное производство иммунохроматографических тест-систем для выявления и идентификации *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* и *L. monocytogenes*. В кн.: *Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских учреждений Роспотребнадзора «Биологическая безопасность в современном мире»*. 21–22 апреля 2009 г. Оболensk, Протвино; 2009. С. 140–2.
Soloviev PV, Baranova EV, Fedyukina GN. Development and experimental production of immunochromatographic test systems for the detection and identification of *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* and *L. monocytogenes*. In: *Proceedings of the scientific and practical conference of young scientists and specialists of research institutions of Rospotrebnadzor "Biological safety in the modern world"*. April 21–22, 2009. Obolensk, Protvino; 2009. P. 140–2 (In Russ.).
EDN: [UATJPV](#)
 4. Белькова СА, Балахонов СВ, Бикетов СФ, Баранова ЕВ. Апробация иммунохроматографической тест-системы для экспресс-индикации возбудителя чумы. *Журнал инфекционной патологии*. 2009;16(3):69–70.
Belkova SA, Balakhonov SV, Biketov SF, Baranova EV. Practical evaluation of an immunochromatographic test system for rapid indication of the plague agent. *Journal of Infectious Pathology*. 2009;16(3):69–70 (In Russ.).
EDN: [SJLWMR](#)
 5. Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet*. 2003;361(9353):211–6.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12270-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12270-2)
 6. Белькова СА, Балахонов СВ. Индикация капсульного антигена чумного микроба в суспензиях органов мелких млекопитающих с применением иммунохроматографической тест-системы. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014;(25):96–8.
Belkova SA, Balakhonov SV. Indication of *Yersinia pestis* capsular antigen in suspensions of small mammal organs using immunochromatographic test system. *Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2014;(25):96–8 (In Russ.).
EDN: [TAVIAL](#)
 7. Губарева ТИ, Уланова ГИ. Анализ эффективности применения методов лабораторного исследования на природно-очаговые инфекции. В кн.: *Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней. Шестой сборник научных работ*. Ижевск; 2018. С. 26–8.
Gubareva TI, Ulanova GI. Analysis of the effectiveness of laboratory methods for especially dangerous infections. In: *The most important issues of infectious and parasitic diseases. Sixth collection of scientific works*. Izhevsk; 2018. P. 26–8 (In Russ.).
EDN: [YYQXRR](#)
 8. Холин АВ, Шаракшанов МБ, Вержуцкий ДБ, Корзун ВМ, Оргилбаяр Л, Ганхуяг Ц и др. Результаты эпизоотологического обследования приграничной с Россией части Хархира-Тургенского природного очага чумы Монголии в 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(2):129–34.
Kholin AV, Sharakshanov MB, Verzhutsky DB, Korzun VM, Orgilbayar L, Gankhuyag T, et al. Results of epizootiological survey along the border areas of Kharkhira-Turgensky natural plague focus between Russia and Mongolia in 2019. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(2):129–34 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-129-134>
 9. Еремкин АВ, Елагин ГД, Печенкин ДВ, Фоменков ОО, Богачева НВ, Кытманов АА и др. Разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(3):184–7.
Eremkin AV, Elagin GD, Pechenkin DV, Fomenkov OO, Bogatcheva NV, Kitmanov AA, et al. The development of immune enzyme and immune chromatographic monoclonal test-systems for detecting tularemia agent. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(3):184–7 (In Russ.).
EDN: [VXLOFZ](#)
 10. Кретенчук О.Ф. Отечественные средства диагностики особо опасных инфекций на основе моноклональных антител. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(4):35–45.
Kretenchuk O.F. Domestically-produced monoclonal-antibody-based means of diagnosing particularly dangerous infections. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(4):35–45 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-35-45>
 11. Зайцев АА, Гнусарева ОА, Солодовников БВ, Царева НС, Остапович ВВ, Куличенко АН. Алгоритм лабораторной диагностики при исследовании иксодовых клещей на туляремию. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012;(3):79–81.
Zaitsev AA, Gnusareva OA, Solodovnikov BV, Tsareva NS, Ostapovich VV, Kulichenko AN. Algorithm of laboratory diagnostics applied for examination of ixodic ticks for tularaemia. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2012;(3):79–81 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-3-79-81>
 12. Зайцев АА, Гнусарева ОА, Царева НС, Остапович ВВ, Борздова ИЮ, Куличенко АН. Применение иммунохроматографических тест-систем для экспресс-выявления липополисахарида *Francisella tularensis* при мониторинге природных очагов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013;(1):78–80.
Zaitsev AA, Gnusareva OA, Tsareva NS, Ostapovich VV, Borzdova IYu, Kulichenko AN. Immuno-chromatographic test system application for

- rapid detection of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in monitoring of natural foci. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;(1):78–80 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-78-80>
13. Касина ИВ, Алексеева СА, Бердникова ЗЕ, Немировская ТИ, Алехина АС. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение*. 2017;17(4):240–7.
 Kasina IV, Alekseeva SA, Berdnikova ZE, Nemirovskaya TI, Alekhina AS. Prospects for improving evaluation of live tularaemia vaccine quality. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):240–7 (In Russ.).
 EDN: [ZXGLLX](#)
 14. Касина ИВ, Алексеева СА, Немировская ТИ. Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективных методов экспертизы качества вакцины сибиреязвенной живой. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(4):277–84.
 Kasina IV, Alekseeva SA, Nemirovskaya TI. Theoretical and experimental substantiation of alternative methods for quality control of live anthrax vaccine. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):277–84 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-277-284>
 15. Поздеев ОК. *Медицинская микробиология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
 Pozdeev OK. *Medical microbiology*. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (In Russ.).
 EDN: [QLFKVB](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.В. Касина** — дизайн и теоретическое обоснование исследования; экспериментальная работа по определению показателя качества «Подлинность» вакцины чумной живой; обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов; написание, редактирование и критическое обсуждение текста рукописи; **С.А. Алексеева** — экспериментальная работа по определению показателя качества «Подлинность» аллергена туляремийного (Тулярина); анализ и интерпретация результатов исследования; написание текста рукописи; **Т.И. Немировская** — концепция работы, критическое обсуждение текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 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. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.V. Kasina** designed the study, provided the theoretical framework for the study, carried out identification testing of the live plague vaccine, summarised the experimental data, analysed and interpreted the results, drafted and critically revised the manuscript. **S.A. Alekseeva** carried out identification testing of the tularaemia allergen (Tularin), analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **T.I. Nemirovskaya** conceptualised the study, critically revised the manuscript and approved the final version for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 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

Касина Ирина Владимировна, канд. биол. наук
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2002-0151>
kasina@expmed.ru

Алексеева Светлана Александровна, канд. биол. наук
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>
alekseevas@expmed.ru

Немировская Татьяна Ивановна, канд. мед. наук
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>
nemirovskaya@expmed.ru

Поступила 02.06.2022

После доработки 07.04.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Irina V. Kasina, Cand. Sci. (Biol.)
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2002-0151>
kasina@expmed.ru

Svetlana A. Alekseeva, Cand. Sci. (Biol.)
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5804-5709>
alekseevas@expmed.ru

Tatiana I. Nemirovskaya, Cand. Sci. (Med.)
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0848-7306>
nemirovskaya@expmed.ru

Received 2 June 2022

Revised 7 April 2023

Accepted 7 June 2023



ISSN 2221-996X



9 772221 996004