

БИОПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

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

Том 16, № **2** (58)
Апрель – июнь 2016



ISSN 2221-996X



9 177222 11996004

Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты.
Актуальные вопросы разработки и перспективы использования

Получение рекомбинантного слитого белка OprF-aTox
Pseudomonas aeruginosa, обладающего защитными свойствами



Л. А. Тарасевич

Учредитель

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

Издатель

Издательский дом «Фолиум»

Главный редактор

Олефир Ю. В.

Заместители**главного редактора**

Меркулов В. А.

Бондарев В. П.

Ответственный секретарь

Климов В. И.

Научный редактор

Лебединская Е. В.

Члены редколлегии

Авдеева Ж. И.

Балаболкин И. И.

Борисевич И. В.

Воробьева М. С.

Гущин И. С.

Иванов В. Б.

Игнатьев Г. М.

Леви Д. Т.

Медуницын Н. В.

Мовсисянц А. А.

Мосягин В. Д.

Таточенко В. К.

Ткаченко Е. А.

Хамитов Р. А.

Редакционный совет

Амвросьева Т. В. (Беларусь)

Борисевич С. В. (Сергиев Посад)

Брико Н. И. (Москва)

Волчков В. Е. (Франция)

Гинцбург А. Л. (Москва)

Дятлов И. А. (Оболеск)

Зверев В. В. (Москва)

Кутырев В. В. (Саратов)

Львов Д. К. (Москва)

Михайлов М. И. (Москва)

Покровский В. И. (Москва)

Савченко В. Г. (Москва)

Учайкин В. Ф. (Москва)

Хаитов Р. М. (Москва)

Чумаков К. М. (США)

СОДЕРЖАНИЕ**Обзоры**

Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты.

Актуальные вопросы разработки и перспективы использования

Ю. В. Олефир, Н. В. Медуницын, Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, А. А. Мовсисянц,

В. А. Меркулов, В. П. Бондарев 67

Безопасность биологических препаратов.

Сообщение 2. Проблемы безопасности биоподобных препаратов

А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, В. П. Бондарев 78

Оригинальные статьи

Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования

производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов:

Klebsiella, Echerichia, Proteus, Pseudomonas, Staphylococcus

Е. Н. Сятчихина, П. А. Набатников, С. А. Коровкин, А. В. Катлинский, Г. М. Игнатьев. 90

Получение рекомбинантного слитого белка OprF-aTox *Pseudomonas aeruginosa*,

обладающего защитными свойствами

А. В. Солдатенкова, Н. А. Михайлова, Е. М. Зимица, Е. И. Леонова, А. А. Калошин 96

Исследование фармакодинамики препарата на основе терапевтических гуманизированных

моноклональных антител против интерлейкина-17 на модели антиген-индуцированного

артрита на кроликах

А. А. Недорубов, А. В. Грачев, М. А. Варавко, Е. Л. Морозова. 101

Эффективность и безопасность нового препарата для лечения рассеянного склероза

«пегелированный интерферон бета-1а человека» на обезьянах в сравнении

с немодифицированным интерфероном бета-1а

Н. А. Спирина, Я. Ю. Устюгов, А. А. Александров, М. В. Артюхова, А. Б. Джелия. 108

Набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций

Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции

Л. М. Рустомова, С. Ф. Семенов, Н. Л. Богданова, А. С. Владыко, А. Г. Красько 115

Разработка метода определения биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro*

Н. А. Гаврилова, С. А. Черепушкин, Н. В. Рыкалина, Ю. И. Обухов 120

Хроника

Юрий Витальевич Олефир (к 55-летию со дня рождения) 125

Наталья Ивановна Лонская (к 75-летию со дня рождения) 126

Адрес редакции:

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.

Тел.: +7 495 214 62 28, +7 495 214 62 32. E-mail: biopreparaty@exrmed.ru.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Все права защищены. Любое воспроизведение опубликованных материалов без письменного согласия редакции не допускается. При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Журнал включен в наукометрическую базу данных Science Index.

Подписано в печать 01.06.2016.

Подписной индекс **25120**

в каталоге «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать».

Выходит один раз в три месяца.

Дизайн, верстка, печать: Издательский дом «Фолиум»



BIO PREPARATIONS

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal



L. A. Tarasevich

Founder

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

Publisher

Folium Publishing Company

Editor-in-Chief

Olefir Yu. V.

Deputy Editor-in-Chief

Merkulov V. A.

Bondarev V. P.

Executive Secretary

Klimov V. I.

Science Editor

Lebedinskaya E. V.

Editorial Board

Avdeeva Zh. I.

Balabolkin I. I.

Borisevich I. V.

Gouschin I. S.

Ivanov V. B.

Ignatiev G. M.

Khamitov R. A.

Levi D. T.

Medounitsyn N. V.

Movsesyants A. A.

Mosyagin V. D.

Tatochenko V. K.

Tkachenko E. A.

Vorobieva M. S.

Editorial Council

Amvrosieva T. V. (Belarus)

Borisevich S. V. (Sergiev Posad)

Briko N. I. (Moscow)

Volchkov V. E. (France)

Gintsburg A. L. (Moscow)

Dyatlov I. A. (Obolensk)

Zverev V. V. (Moscow)

Kutyrev V. V. (Saratov)

Lvov D. K. (Moscow)

Mikhailov M. I. (Moscow)

Pokrovskiy V. I. (Moscow)

Savchenko V. G. (Moscow)

Uchaikin V. F. (Moscow)

Khaitov R. M. (Moscow)

Chumakov K. M. (USA)

CONTENTS

Reviews

Modern biological/biotechnological medicinal products. Topical issues and prospects for development

Yu. V. Olefir, N. V. Medunitsyn, J. I. Avdeeva, A. A. Soldatov, A. A. Movsesyants, V. A. Merkulov, V. P. Bondarev. 67

The safety of biological preparations. Report 2. Safety issues of biosimilars

A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva, Yu. V. Olefir, V. A. Merkulov, V. P. Bondarev 78

Original Articles

Selection criteria for bacterial strains and bacteriophages for the formation of industrial collection of specifically lysing bacteria: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*

E. N. Siatchikhina, P. A. Nabatnikov, S. A. Korovkin, A. V. Katlinsky, G. M. Ignatyev 90

Obtaining the recombinant fusion protein OprF-aTox of *Pseudomonas aeruginosa* with protective properties

A. V. Soldatenkova, N. A. Mihailova, E. M. Zimina, E. I. Leonova, A. A. Kaloshin 96

The study of pharmacodynamics of a medicine based on humanized monoclonal in antibodies against IL-17 in rabbit model of antigen-induced arthritis

A. A. Nedorubov, A. V. Grachev, M. A. Varavko, E. L. Morozova 101

Efficacy and safety of the new drug against multiple sclerosis «PEGylated Interferon beta-1a Human» in monkeys compared with unmodified interferon beta-1a

N. A. Spirina, Ja. Ju. Ustjugov, A. A. Aleksandrov, M. V. Artjuhova, A. B. Dzhelezha 108

The kit for identification of antibodies against Lassa and Ebola viruses by indirect immunofluorescence

L. M. Rustamova, S. F. Semenov, N. L. Bogdanova, A. S. Vladyko, A. G. Krasko. 115

The development of a method for determining the biological activity of erythropoietin preparations *in vitro*

N. A. Gavrilova, S. A. Cherepushkin, N. V. Rykalina, Yu. I. Obukhov 120

Chronicle

Yuriy Vitalievich Olefir (on the 55th anniversary) 125

Natalia Ivanovna Lonskaya (on the 75th anniversary) 126

Address of the Editorial Office:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8-2 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation. Tel.: +7 495 214 62 28, +7 495 214 62 32. E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Publication is registered by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications. Certification of the Mass Media Registration PI No. FS77-53128 of March 14, 2013.

All rights reserved. No part of this publication may be used or reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the Publishers. Reproducing any part of this material a reference to the journal is obligatory.

The publication data for the journal is 01.06.2016.

Publication is once every 3 months.

CRC preparation and printing: Folium Publishing Company.



Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования

Ю. В. Олефир, Н. В. Медуницын, Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, А. А. Мовсисянц,
В. А. Меркулов, В. П. Бондарев

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

Поступила 23.03.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

В обзоре представлена информация, касающаяся вопросов разработки, проведения исследований и регистрации новых биологических препаратов, включая проблемы терминологии, классификации. Отражены проблемы и перспективы генно-инженерных лекарственных препаратов, особенности проведения сравнительных исследований по доказательству сходства/подобия биоаналогичного (биоподобного) и оригинального (референтного) препаратов, клинического применения и взаимозаменяемости препаратов, перспективы разработки биотехнологических лекарственных препаратов, экспертизы оценки качества биологических/биотехнологических препаратов, современные методы специфической иммунотерапии аллергических заболеваний с помощью рекомбинантных препаратов, а также вопросы клеточной технологии и тканевой инженерии. В обзоре также отражены вопросы, обсужденные на 14-й международной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» (24–31 октября 2015 года, Испания), связанные с фундаментальными и прикладными научными исследованиями, разработкой и внедрением новых технологий и современных лекарственных препаратов в клиническую медицинскую практику.

Ключевые слова: биологические, биотехнологические препараты; орфанные препараты; препараты клеточной и тканевой терапии; специфическая иммунотерапия аллергических заболеваний; биоаналогичные (биоподобные) препараты.

Библиографическое описание: Олефир ЮВ, Медуницын НВ, Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Мовсисянц АА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Современные биологические /биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 67–77.

Биологические препараты включают широкий круг препаратов, используемых для профилактики, диагностики и лечения инфекционных, аллергических, аутоиммунных, опухолевых заболеваний. К ним относят лекарственные препараты, действующее вещество которых произведено или выделено из биологического источника и для определения свойств и качества которых необходима комбинация биологических и физико-химических методов — это иммунобиологические лекарственные препараты; препараты, полученные из крови, плазмы крови человека и животных (за исключением цельной крови); биотехнологические и генотерапевтические лекарственные препараты. Иммунобиологические препараты включают вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены [1]. Следует отметить, что в представленный перечень биологических препаратов не включены такие группы биологических препаратов, как пробиотики, бактериофаги, цитокины природного происхождения, диагностические препараты.

Очень важны вопросы терминологии и определений для разных групп биологических препаратов. До недавнего времени группа иммунобиологических препаратов объединяла почти все биологические препараты. Но и тогда некоторые препараты, например бактериофаги, не укладывались в понятие «иммунобиологические препараты». В связи с разработкой новых препаратов на основе рекомбинантных белков выделяют препараты (например, эритропоэтины, филграстимы, гормоны и др.), проявления специфической активности которых не связаны с иммун-

ными механизмами. В законодательных документах стран ЕС биологические препараты делят на 3 группы — препараты на основе плазмы крови или компонентов плазмы, биологические/биотехнологические препараты и препараты передовой терапии (генотерапевтические и препараты клеточной терапии) [2].

Однако данная классификация не охватывает весь диапазон биологических препаратов, например таких, как вакцины, аллергены, бактериофаги и др. Актуальным является вопрос разработки новой классификации, объединяющей все группы биологических препаратов.

Целью настоящего сообщения является обобщение информации последних лет по вопросам разработки, экспертизы качества, проведению исследований современных высокоэффективных биологических/ биотехнологических лекарственных препаратов с целью их регистрации и внедрения в клиническую практику.

Иммунобиологические лекарственные препараты

Потребность в биологических, в частности иммунобиологических лекарственных препаратах неуклонно растет в последние годы. Это связано с тем, что актуальным становится вопрос о совершенствовании традиционно используемых вакцин, а также о разработке новых вакцин, что обусловлено снижением иммунологической активности населения в целом, появлением новых или активацией инфекций, которые ранее считались побежденными.

В современных условиях жизни происходит снижение иммунологической активности населения. Этому способ-

ствуется уменьшение инфекционной заболеваемости, сокращение числа эпидемий и вспышек инфекций, уменьшение циркуляции микроорганизмов и, как следствие этого, ослабление естественной иммунизации населения окружающей патогенной и условно-патогенной флорой. Увеличивается число лиц со слабой иммунной системой, несмотря на активное лечение лиц с разными формами иммунодефицитов. Этому способствует то, что населением широко используются различные дезсредства, антибиотики и другие антимикробные препараты. Кроме того, принимая рафинированную и стерильную пищу, человек лишает себя естественных стимуляторов иммунной системы. Нельзя также не учитывать вредоносное действие на иммунную систему неблагоприятных факторов окружающей среды.

Вакцины календаря прививок вводятся детям в раннем возрасте, когда их иммунная система находится еще в стадии развития. Например, уровень иммуноглобулина G в годовалом возрасте составляет лишь 80% от уровня взрослого человека, иммуноглобулина M — 75%, а иммуноглобулина A — 20%. Общее содержание антител в том же возрасте составляет лишь 60% от уровня антител взрослых лиц [3, 4].

Снижение иммунологической активности людей диктует необходимость разработки новых безопасных и эффективных иммунобиологических препаратов. Существующие отечественные биологические препараты по своим качественным характеристикам соответствуют требованиям ВОЗ. Для большинства предприятий биологических препаратов характерен высокий уровень технологии, но, к сожалению, на многих предприятиях не соблюдаются все требования GMP. Следует отметить, что в России широко используется организация совместных с зарубежными странами производств биологических препаратов для выполнения отдельных производственных стадий, например, розлив, упаковка, маркировка. Наблюдается интенсивная специализация предприятий, на которых выполняют лишь отдельные этапы производства препарата.

Разработка новых вакцин является перспективным направлением фарминдустрии, поскольку вакцинация является единственным и эффективным средством профилактики инфекционных заболеваний. Повышение эффективности и снижение или полную отмену побочных эффектов при вакцинации связывают с получением вакцин нового поколения [4–6].

При разработке вакцин важным является получение такого материала, который, с одной стороны, сохранял бы узкую антигенную специфичность возбудителя инфекции, а с другой — обладал достаточной иммуногенностью для стимуляции выраженного протективного иммунитета за счет индукции формирования специфических антител или активации клона специфических Т-лимфоцитов. Сложность получения таких специфических антигенов белковой или пептидной природы заключается в том, что процесс их выделения и очистки часто приводит к снижению иммуногенности выделенных антигенов.

В случае получения таких очищенных антигенов возможно создание вакцинных препаратов путем включения антигенного материала в липосомы (липиды, организованные в виде гранул) или в химические соединения, которые используются в качестве носителей или обладают адъювантным эффектом. Липосомы, в свою очередь, могут быть конъюгированы с моноклональными антителами, специфичными к соответствующему Т-клеточному рецеп-

тору или антигенам гистосовместимости, для оптимальной их доставки к антигенпрезентирующим клеткам.

Используя технологию рекомбинантной ДНК возможно удаление части вирусной ДНК, ответственной за проявление вирулентности патогенного агента. При этом должны быть сохранены остальные участки генома, в первую очередь те, которые обеспечивают иммуногенность возбудителя инфекции. Для разработки вакцины могут быть использованы вирусы с такой рекомбинантной ДНК.

Использование генно-инженерной технологии позволяет разрабатывать вакцины на основе рекомбинантного белка, по аналогии с рекомбинантной вакциной против гепатита В. Для этого необходимо иметь точную информацию об участках вирусных или бактериальных ДНК, ответственных за синтез протективных антигенов. Для получения рекомбинантного белка в достаточных количествах отрезок такой ДНК встраивают в геном экспрессирующей клеточной культуры.

Один из перспективных подходов, который в настоящее время рассматривается для производства вакцин, в частности вакцин против гриппа, получил название «иммунизация генами». Данный подход базируется на использовании участков ДНК, ответственных за синтез гемагглютинина вируса гриппа, который обладает достаточно выраженными иммуногенными свойствами. Сегменты генома, кодирующие продукцию указанного антигена, встраивают в плазмиду, которая, в свою очередь, вводится в мышечную ткань, обеспечивая синтез вирусного протективного антигена, иммунизирующего организм, и развитие специфического иммунитета. Проведенные экспериментальные исследования на мышах показали, что введение такого материала полностью предотвращает размножение нативного вируса при введении животным заражающей дозы вируса гриппа.

Сведения о первичной структуре белковых антигенов, локализации В- и Т-клеточных эпитопов в структуре молекулы позволяют получать эпитопы, характеризующиеся иммуногенностью и протективной активностью, синтетическим путем. Синтезированные пептиды могут терять иммуногенность, свойственную целой молекуле. Для преодоления указанной проблемы возможно использование реагентов, обладающих адъювантными свойствами. В качестве адъювантов и протекторов, в частности, могут служить липосомы, которые позволяют доставлять антигенные пептиды непосредственно к антигенпрезентирующим клеткам, обеспечивая запуск специфического иммунного ответа.

Биологические препараты для лечения орфанных заболеваний

Отмечается рост числа орфанных биологических препаратов, которые применяются для лечения редких болезней. Причинами орфанных болезней являются преимущественно генетически обусловленные нарушения, инфекции, воздействие токсических веществ (бензол, цианиды, хлорамфеникол и др.). Количество орфанных болезней постоянно увеличивается. Следует отметить следующие особенности, связанные с разработкой, исследованиями, производством и регистрацией орфанных препаратов. Разработчики препаратов сталкиваются с трудностями при испытании и регистрации препаратов в связи с отсутствием экспериментальных моделей многих орфанных болезней; сложностью проведения клинических исследований в связи с ограниченным числом больных; производством

орфанных препаратов, как правило, является нерентабельным; отсутствуют единые требования к регистрации / лицензированию препаратов, каждая страна разрабатывает свои требования [7].

Так, клинические исследования могут быть проведены на ограниченном числе пациентов, и обоснованным может быть проведение неконтролируемых исследований, при которых сравнения проводятся по отношению к внешней контрольной группе (внешний/исторический контроль). Это связано, прежде всего, с тем, что целевая популяция, для которой разработанный орфанный препарат является очень небольшой. Несмотря на это, клинические исследования должны быть тщательно разработаны и проведены с высоким качеством для гарантированного получения надежных и достоверных данных по оценке эффективности и безопасности.

С разработкой новых диагностических систем и методов лечения отдельные орфанные заболевания переходят в список широко известных болезней. В настоящее время список редких заболеваний составляет 6–8 тыс. наименований. Встречаемость заболеваний составляют десятки случаев на 100 тыс. населения. При этом в разных странах мира частота распространенности заболевания, отнесенного в группу орфанных, отличается.

Биотехнологические лекарственные препараты

Современные достижения биотехнологии позволили получить лекарственные препараты нового поколения на основе рекомбинантных белков, которые находят все более широкое применение в клинической практике. Их разработка является одним из перспективных направлений современной фармацевтики в области генной инженерии. Создание новых высокоэффективных лекарственных препаратов на основе генно-инженерных препаратов позволяет вывести практическую медицину на качественно новый уровень.

Действующим веществом указанных препаратов являются белки, пептиды и их производные. К указанной группе препаратов относятся препараты системы цитокинов, включая растворимые рецепторы и их антагонисты; моноклональные антитела (МкАТ) и препараты модифицированных МкАТ; факторы свертывания крови, филграстины, эритропоэтины, препараты на основе белков слияния («fusion proteins»); вакцины на основе рекомбинантных белков (HBsAg, белки вируса папилломы и др.).

Биотехнологические препараты предназначены для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, характеризующихся длительным прогрессирующим течением — онкологических, системных воспалительных аутоиммунных, инфекционных, аллергических, сердечно-сосудистых заболеваний, а также для профилактики и лечения реакции отторжения при трансплантации органов и тканей [8–15].

Для получения рекомбинантных белков в качестве систем экспрессии могут быть использованы генетически модифицированные бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих. При разработке препаратов с использованием методов рекомбинантной ДНК необходимо строгое соблюдение требований на всех этапах разработки, включая создание штамма-продуцента целевого белка, технологического процесса, включающего многоступенчатые этапы очистки белкового продукта, внутрипроизводственного контроля с использованием современных высокочувствительных аналитических методов, поскольку производство

биотехнологических лекарственных препаратов определяет их качество и безопасность клинического применения.

Значительную подгруппу биотехнологических лекарственных препаратов занимают препараты МкАТ, которые по объему производства занимают на современном фармацевтическом рынке одно из ведущих мест после вакцин. В настоящее время в мировой медицинской практике 50% препаратов МкАТ используется в онкологии, 37% — при аутоиммунных заболеваниях и в трансплантологии, 11% — инфекционных, аллергических заболеваниях, 2% — сердечно-сосудистых заболеваниях [8, 9, 11, 12, 15].

Терапия с помощью препаратов МкАТ высокоспецифична и эффективна, поскольку направлена на определенные патогенетически значимые механизмы развития заболеваний. Их применение позволило получить хорошие клинические результаты при лечении пациентов с указанной выше патологией [8–10, 12, 13]. Итоги рандомизированных исследований препарата герцептин (трастузумаб), используемого в сочетании с химиотерапией у больных раком молочной железы, с повышенным уровнем экспрессии маркера Her2/new на опухолевых клетках, показали значительно более высокую эффективность по сравнению с химиотерапией. Аналогично, большая эффективность отмечена при клиническом использовании препарата адалимумаб (МкАТ к ФНО α), используемого в монотерапии и в комбинации с метотрексатом при лечении больных ревматоидным артритом, по сравнению с метотрексатом [10, 13].

В ряде случаев применение препаратов МкАТ сопровождается развитием таких серьезных нежелательных явлений, как развитие неконтролируемой иммуносупрессии, что приводит к инфекционным осложнениям или активации опухолевого процесса. Кроме того, не исключена возможность чрезмерной активации компонентов иммунной системы, что угрожает развитием аутоиммунных реакций. Образование антител в ответ на введение лекарственного препарата может, прежде всего, влиять на фармакокинетику и фармакодинамику, а также вызывать снижение или сведение до минимума клинической эффективности лекарственного препарата МкАТ [10, 13, 16].

Суущественной проблемой, связанной с клиническим применением препаратов на основе МкАТ, является проявление их нежелательной иммуногенности. На частоту развития и выраженность иммунного ответа влияют факторы, связанные с препаратом (молекулярная структура, биологические свойства и др.), производственным процессом (присутствие примесей, наличие агрегатов, вспомогательных веществ и др.), условиями хранения и транспортирования, особенностями основного заболевания, состоянием пациента, особенностями организма, схемой применения препарата сопутствующей терапией и др. [17, 19].

Исследования по изучению потенциальной иммуногенности, включая использование релевантных видов животных, являются обязательными на этапе доклинических исследований. Однако их результаты не позволяют в полной мере прогнозировать проявления иммуногенности препаратов при клиническом применении. Только клинические исследования дают возможность адекватно оценить иммуногенный потенциал лекарственного препарата при определенном заболевании и используемой схеме применения [16–19].

Современные достижения генной инженерии позволяют получать препараты на основе модифицированных антител, объединяющих в себя преимущества МкАТ и низ-

комолекулярных препаратов — препараты на основе Fab-фрагментов иммуноглобулина, однопечечные АТ (scFv), биспецифичные АТ, препараты на основе белков слияния и т.д. Разрабатываются так называемые нанотела за счет выделения участка ДНК, кодирующего продукцию единичного варибельного участка молекулы иммуноглобулина.

Использование современных генно-инженерных препаратов позволяет вывести практическую медицину на качественно новый уровень, обеспечивая успешность лечения тяжелых хронически протекающих заболеваний. Снижению рисков, связанных с безопасностью клинического применения препаратов, способствуют мероприятия, направленные на раннюю идентификацию рисков, и более ранние действия по минимизации таких рисков.

Биоаналогичные (биоподобные) лекарственные препараты

Окончание срока действия патентов на биотехнологические препараты привело к разработке препаратов, которые представляют собой новые версии ранее зарегистрированного оригинального препарата и которые определены в Российской Федерации как «биоподобные (биоаналогичные)» препараты. В ЕМА и ВОЗ для указанных препаратов был выбран термин «biosimilars» и разработаны научные принципы доказательства сходства/подобия качества, безопасности и эффективности препарата «biosimilar» с оригинальным (референтным) биотехнологическим препаратом. Согласно руководству ЕМА, «biosimilar» (биоподобный (биоаналогичный)) препарат — это биологический лекарственный препарат, который содержит новую версию действующего вещества оригинального препарата (референтного) препарата, и сходство/подобие которого с референтным препаратом продемонстрировано результатами сравнительных исследований по оценке показателей качества, биологической активности, эффективности и безопасности [20, 21].

Документами FDA данное определение дополнено указанием о том, что выявленные в сравнительных исследованиях незначительные различия (между биоподобным и оригинальным препаратами) не должны иметь клинической значимости [22].

Биоподобные препараты не следует объединять с «дженериками», которые относятся к воспроизведенным фармацевтическим препаратам, получаемым путем химического синтеза. Для признания нового препарата «дженериком» необходимо продемонстрировать эквивалентность (идентичность) молекул действующего вещества воспроизведенного и оригинального препаратов, а также продемонстрировать их биоэквивалентность или терапевтическую эквивалентность (в случае необходимости).

Регистрации биоподобных (биоаналогичных) препаратов имеет свои особенности. Нормативные подходы и методические принципы, адаптированные для «дженериков», не могут быть применены для биоподобных (биоаналогичных) препаратов ввиду их структурных, функциональных особенностей и различий производственных процессов.

Согласно разработанным ЕМА и ВОЗ руководствам по регулированию препаратов «biosimilars» для доказательства сходства/подобия разработанного препарата с оригинальным (референтным) препаратом необходимо

позапное проведение сравнительных исследований, начиная с оценки физико-химических характеристик и специфической биологической активности. Сокращение объема последующих доклинических и (или) клинических исследований возможно только при условии предварительного доказательства высокой степени подобия качества разрабатываемого и оригинального препаратов.

Заключение о биопогодии препаратов делается на основании совокупности доказательств подобия на каждом из этапов доклинического исследования, а также поэтапных клинических исследований. Следует отметить, что при клинических исследованиях данные по фармакокинетике и фармакодинамике являются первостепенной характеристикой сходства/подобия препаратов. Сравнительные исследования эффективности и безопасности должны быть проведены с участием достаточно однородной и чувствительной популяции. Важно отметить, что к моменту решения вопроса о регистрации препарата должна быть проведена оценка иммуногенности препарата (как правило, в течение 12 мес.). Если подобие доказано, а также доказано, что препарат эффективный и безопасный, его регистрируют как биоподобный. В противном случае — препарат должен регистрироваться как новый препарат. Важно отметить, что разработка препарата ««biosimilar» (биоподобного/биоаналогичного) должна быть запланирована изначально, а не в процессе его регистрации.

В России, как и в других странах, создается и совершенствуется нормативная база для разработки, проведения исследований и регистрации биоподобных (биоаналогичных) препаратов [23]. В более ранние годы, когда не было руководящих документов и когда в разных странах не было однозначного восприятия этих документов, лицензирование/регистрация препаратов, как «биоподобных», проводилась без достаточного объема доказательств их подобия. Разные страны мира вынуждены решать вопрос с дальнейшим клиническим применением таких препаратов, рассматривая различные подходы. Первый — препараты, зарегистрированные не в соответствии с современными принципами доказательства подобия (принципы «biosimilars»), оставляют на рынке, но усиливают пострегистрационный контроль за их безопасностью; второй — запрещают использование таких препаратов в случае наличия проблем с безопасностью; третий — определяют конкретный срок, в течение которого производители представляют данные, подтверждающие сходство/подобие, включая план управления рисками и дополнительные клинические данные.

Значительной проблемой является вопрос о взаимозаменяемости биологических препаратов — биоаналогичного (биоподобного) и оригинального препаратов. Основой критериев для решения вопроса взаимозаменяемости биологических препаратов является сходство терапевтической эффективности препаратов, которое может быть оценено на основании результатов специально проведенных сравнительных клинических исследований. Четкие критерии взаимозаменяемости препаратов отсутствуют. В большинстве развитых стран мира приняты правовые нормы разного уровня, запрещающие или ограничивающие автоматическую замену оригинального препарата биоподобным. В некоторых странах полностью запрещена автоматическая замена, а в некоторых — решение о замене может принять только врач. Так, в Канаде

врач принимает решение о начале применения препарата, основываясь на своем клиническом опыте, выбирая либо биоподобный препарат, либо оригинальный. Провизор не может провести его автоматическую замену. Это означает, что если пациент начал принимать биологический препарат, он не будет переключаться на прием другого препарата. Это касается любого биологического препарата, а не только биоподобного [24].

В Российской Федерации в настоящее время разрабатывается нормативно-правовая база для решения вопроса о взаимозаменяемости биологических лекарственных препаратов [25].

Препараты для специфической иммунотерапии аллергических заболеваний

В настоящее время, в связи с достижениями в области биотехнологии в плане разработки высокотехнологичных лекарственных препаратов нового поколения, разработаны современные методы специфической иммунотерапии аллергических заболеваний с помощью рекомбинантных препаратов с учетом современных научных представлений о механизмах, лежащих в основе развития аллергических состояний.

В последние 15 лет были пересмотрены некоторые представления о механизмах развития IgE-зависимых аллергических заболеваний. Было установлено, что основную роль в развитии Th2 пути иммунного ответа при аллергии играет нарушение формирования иммунологической толерантности к аллергенам [26, 27].

В настоящее время метод аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) остается единственным патогенетическим методом лечения аллергических заболеваний немедленного типа. Начиная с 1911 года, для АСИТ используются водно-солевые экстракты из сырья природного происхождения. Основными недостатками данной группы препаратов являются высокая аллергенность и проблемы со стандартизацией экстрактов аллергенов, так как их получают из разных источников.

Учитывая данные недостатки, в 2009 году в ЕМА были переработаны и дополнены нормативные требования для оценки качества и проведения клинических исследований лечебных аллергенов для АСИТ. В новые документы были включены ряд положений, разработанных впервые. В первую очередь это касается появления такого понятия, как «гомологичные ряды». Это привело к повышению требований к аллергенам при составлении определенного гомологичного ряда и, в то же время, значительно расширило возможность экстраполяции результатов внутри ряда. В новых документах пересмотрены и ужесточены требования к исходному сырью, составлению пула сывороток, используемого при оценке активности препарата, и составлению смесей аллергенов. В руководство включены новые разделы, касающиеся исследования препаратов нового поколения — рекомбинантных аллергенов [28].

Для снижения аллергенности водно-солевых экстрактов используются методы химической модификации экстрактов аллергенов, например, с использованием глютарового альдегида или формальдегида (аллергоиды). Для повышения иммуногенной активности (способности вырабатывать аллерген-специфические «блокирующие» IgG4 антитела) используются методы конъюгации с веще-

ствами, усиливающими иммунный ответ (например, гидроксид алюминия).

Учитывая, указанные недостатки водно-солевых экстрактов, на основе технологии рекомбинантной ДНК в 1988 году был получен первый препарат основного аллергена клеща домашней пыли Der p 1 [29]. В сравнении с водно-солевыми экстрактами рекомбинантные аллергены обладают следующими преимуществами — препараты являются стандартными и высокоочищенными аллергенами; хорошо охарактеризованы по физико-химическим и биологическим показателям; имеется возможность модификации свойств препарата для снижения аллергенности и повышения их иммуногенности; можно подбирать состав аллергенов, к которому определяется сенсibilизация у больного.

В настоящее время разработаны и находятся на разных стадиях клинических исследований следующие препараты на основе рекомбинантных немодифицированных аллергенов: основной аллерген яда осы (Dol m 5), клещей домашней пыли (Der p 1), пыльцы тимотея луговой (Phl p 2), смесь аллергенов пыльцы луговой (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5a, Phl p 5b и Phl p 6) и др. [29].

Наиболее простым способом снизить аллергенность препаратов является изменение (нарушение) конформационной структуры эпитопов, распознаваемых аллерген-специфическими IgE. Технология изменения конформационной структуры молекулы белка аллергена получила название «folding» технология [30].

Одним из подходов получения «гипоаллергенных» аллергенов явилось создание препаратов, на основе только линейных участков Т-клеточных эпитопов аллергенов. Это позволило с одной стороны полностью освободиться от эпитопов, распознаваемых аллерген-специфическими IgE, и тем самым снизить развитие немедленных аллергических реакций на введение препарата, а с другой стороны увеличить количество Т-клеточных эпитопов для усиления формирования иммунологической толерантности и выработки «блокирующих» IgG4 антител. Проводятся клинические исследования пептидов, различной длины, полученных из аллергенов перхоти кошки, яда пчелы и амброзии [31].

Клинические исследования «гипоаллергенных» форм препаратов для СИТ показали высокую эффективность и безопасность их применения. Однако если введение препаратов немодифицированных рекомбинантных или экстрактов аллергенов может привести к развитию немедленных анафилактических реакций, то введение «гипоаллергенных» форм препаратов может сопровождаться развитием поздней фазы немедленных аллергических реакций, обусловленных участием Т-клеточных эпитопов.

В настоящее время уже доказано, что рекомбинантные препараты для лечения инсектной аллергии являются наиболее эффективными по сравнению с водно-солевыми экстрактами. Рекомбинантные препараты аллергенов из яда насекомых содержат только необходимые для СИТ аллергены, что значительно повышает их безопасность и, соответственно, эффективность СИТ.

Для усиления эффективности рекомбинантных аллергенов используются модификации на основе гибридных белков, которые усиливают иммунный ответ, направленный на выработку «блокирующих» IgG4 антител. Были проведены экспериментальные исследования разработки

препаратов, содержащих аллергены из пыльцы тимopheвки (Phl v 1 и p 5), березы (Bet v 1) или оливы (Ole e 1), связанные с гемоцианином лимфы улитки [32].

Еще одним направлением повышения безопасности и эффективности СИТ аллергических заболеваний является разработка новых методов введения препаратов лечебных аллергенов. Наиболее эффективным методом введения СИТ является подкожное введение постоянно увеличивающихся доз препаратов лечебных аллергенов. Однако это достаточно травматично для больного, так как для этого требуется большое количество инъекций. В качестве альтернативного пути введения препарата является оральное введение препаратов аллергенов. В последние годы активно проводятся клинические исследования при сублингвальном введении препаратов аллергенов. При этом в ряде сравнительных исследований была продемонстрирована более низкая эффективность сублингвальной СИТ, относительно подкожной СИТ [33].

Проведены исследования по связыванию аллергена с IgE-антителами, выступающими в качестве рецептора, локализующимися на поверхности тучных клеток. Блокирование данного взаимодействия приводит к подавлению развития клинической картины заболевания. Был разработан препарат на основе мышиных антител против аллерген-специфических IgE человека. Препарат в тестах *in vitro* блокировал связывания IgE с аллергеном, а также вызывал подавление дегрануляции базофилов у лиц с аллергией к пыльце березы. Данные исследования продемонстрировали высокую видовую специфичность антител, принимающих участие в развитии аллергической реакции.

В настоящее время зарегистрирован только один препарат на основе МкАТ против IgE антител — Xolair (омализумаб). Указанный препарат вызывает подавление симптомов аллергии, но не подавляет выработку аллерген-специфических IgE. Высокая эффективность препарата показана при инсектной аллергии.

Препараты передовой терапии

Большое внимание в настоящее время уделяется вопросам, связанным с клеточными технологиями и их использованием для создания новых методов лечения тяжелых заболеваний человека на основе разработки новых ткане-инженерных и ткане-клеточных конструкций.

Новым классом биологических препаратов являются препараты передовой терапии, выделяют три вида таких препаратов — препараты из соматических клеток (стволовые, мышечные и др. клетки); препараты тканевой терапии, предназначенные для регенерации, репарации или замены ткани; препараты генной терапии.

Трудности в разработке препаратов передовой терапии обусловлены сложной структурой препаратов (живые клетки, генный материал, каркас, матрица и пр.), невозможностью точного дозирования и установления оптимальных доз, малым количеством активного материала, высокой его чувствительностью к неблагоприятным факторам среды и коротким сроком его годности (часы, сутки).

Существует три вида рисков использования препаратов передовой терапии: риски для доноров (методы получения материала, осложнения), для реципиентов (способы введения, длительная персистенция и рост клеток, канцерогенность, иммуногенность, генные или функ-

циональные изменения, отсутствие лечебного эффекта), а также для окружающей среды (контаминация среды, возможный перенос материала в организм человека и т.п.).

В США и других странах мира, включая Россию, проводятся серьезные научные исследования по использованию аутологичных и аллогенных клеток, при этом объем использования аллогенных клеток превалирует над аутологичными клетками. Также в качестве перспективных рассматриваются мультипатентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК), обладающие хорошими ростовыми свойствами и способностью к репрограммированию. Такие клетки в перспективе могут быть широко использованы для создания новых методов целевой терапии, усовершенствования доставки лекарственных препаратов и обеспечения стратегии индивидуального лечения.

Перспективным направлением, которому уделяется большое внимание отечественных и зарубежных ученых, является направление, связанное с тканевой инженерией, созданием ткане-инженерных конструкций для реконструктивной хирургии. Основной целью тканевой инженерии является создание *in vitro* функциональных тканей для последующей их имплантации *in vivo* с целью замены, поддержания или восстановления функции поврежденной ткани. В основе тканевой инженерии лежат три составляющие — клетки, биоматериал или субстрат-носитель (скаффолд) и источник сигнальных молекул (факторы роста, хемотаксические факторы, внеклеточный матрикс и др.).

Значительный успех клеточных технологий, связанных с получением мультипатентных и прогениторных стволовых клеток для терапии и создания биоискусственных органов, достигнут в США, странах Европы и Азии. Это во многом обусловлено интенсивным финансированием со стороны правительственных органов, а также созданием нормативно-правовой базы для получения, контроля и применения клеточных продуктов.

Проводятся исследования по разработке и поиску скаффолдов, которые являются одним из важнейших элементов ткане-инженерных конструкций. Скаффолды представляют собой трехмерные пористые или волокнистые матрицы, основная функция которых состоит в обеспечении механического каркаса для клеток [34].

Скаффолды обеспечивают различные функции, включая поддержание микроокружения, обеспечение прикрепления клеток, а также направленную дифференцировку прогениторных клеток. В идеале скаффолды должны обладать рядом свойств, позволяющих достигнуть формирования полноценной ткани. Такими свойствами являются: наличие адгезивной поверхности, способствующей пролиферации и дифференцировке клеток; биосовместимость и отсутствие иммунологического отторжения; нетоксичность; биodeградация, скорость которой соответствовала бы росту собственной ткани; оптимальный размер пор для пространственного распределения клеток, васкуляризации, а также диффузии питательных веществ и удаления продуктов жизнедеятельности [35, 36].

Развиваются также технологии безматричной тканевой инженерии, связанные с созданием ткане-инженерных сосудов, мочевого, желчного пузыря или других органов, путем выращивания их в условиях *in vitro*, и не содержащих синтетических или других экзогенных материалов.

В настоящее время создаются трехмерные синтетические конструкции или используются децеллюлированные (бесклеточные) нативные ткани, имеющие сложный уровень организации ткани в органах, таких как мочевой пузырь и трахея. Создание таких органов рассматривается как новый подход регенеративной медицины для восстановления или замены целых органов [37].

Одним из актуальных вопросов клеточной технологии является вопрос, связанный с условиями культивирования клеток *in vitro*, которые оказывают существенное влияние на структурные свойства инженерных тканей, и потому могут быть использованы в управлении ростом и функциональной активностью клеток и создаваемых тканей. Одной из уникальных моделей микротканей в настоящее время рассматривается 3D культура. Культивирование эмбриональных стволовых клеток в 3D коллагеновом матриксе, стимулированных экзогенными ростовыми факторами и гормонами, приводит к дифференцировке клеток в ткане-подобные структуры [38].

Использование клеточной терапии и тканевой инженерии является актуальным в офтальмологии при патологических или травматических повреждениях тканей глаза. Исследования, проведенные с использованием первичных культур ММСК лимба и клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), показали, что при 2D культивировании в монослое обе культуры клеток хорошо адгезировались. При этом клетки РПЭ проявляли характерные для монослойных эпителиальных культур изменения, т.е. теряли «эпителиальные свойства» с постепенным переходом к мезенхимному фенотипу. ММСК лимба в течение периода культивирования сохраняли фибробластоподобную форму с экспрессией характерных маркеров. Пластичность эпителио-мезенхимного состояния изученных культур клеток (РПЭ и ММСК лимба) свидетельствует о возможном их использовании в качестве источника клеток для регенеративных манипуляций в офтальмологии [39].

Проблемой в трансплантологии и регенеративных технологий является вопрос репарации трансплантатов. Показано, что насыщение биотрансплантатов тромбоцитами позволяет повысить процессы репарации и регенерации. В качестве антиагреганта и фактора, фиксирующего тромбоциты на поверхности трансплантата, может быть использован антиагрегант прямого действия тикагрелор. Предварительная обработка тикагрелором коллагеновых трансплантатов приводит к тому, что в адгезированных на субстрате тромбоцитах в 90% случаев сохранялись гранулы (отсутствовала дегрануляция тромбоцитов) более 24 часов, в то время как в контрольной серии дегрануляция и активация адгезированных на трансплантате тромбоцитов развивалась в течение 1 часа [40].

В связи с быстрым прогрессированием данного сектора медицинской науки и практики очень актуальным является вопрос разработки в Российской Федерации и утверждения на законодательном уровне требований, регламентирующих разработку и внедрение в клиническую практику биомедицинских клеточных продуктов.

Современные подходы к оценке морфофункционального состояния клеток

В настоящее время большое внимание обращено на совершенствование и разработку новых лабораторных методов исследования клеточных культур, а также клеток иммунной системы с целью оценки иммунного статуса, что

остается одним из основных направлений клинической иммунологии. Разработан новый метод оценки функциональных свойств лимфоцитов на основе когерентной фазовой микроскопии. При данном подходе в исследуемой клетке происходит выделение зоны, и на основе фазового объема этих зон определяются оптические свойства структур клетки, ассоциированные с ее функциональным состоянием. При сравнительном анализе клеток CD4 и CD8 субпопуляций крови доноров было установлено, что у CD8 лимфоцитов определяется большое количество клеток с увеличенным фазовым объемом цитоплазмы в сравнении с CD4 клетками. Данное обстоятельство объясняется наличием перфориновых гранул в цитоплазме CD8-клеток киллеров [41].

Для оценки морфофункционального состояния клеток разрабатывается технология денситометрической сегментации, основанная на использовании количественной фазовой микроскопии (QPM) и компьютерного анализа изменения оптической плотности интерфазного хроматина, выступающего в роли биосенсера. Использование новой технологии клеточной визуализации (интерференционной микроскопии) позволяет в реальном времени производить количественный анализ показателей структуры клеток (например, клетки периферической крови — лимфоциты и др.) без фиксации и контрастирования изображения. Метод интерференционной микроскопии позволяет получить важную информацию о состоянии клетки, в частности ядра функционирующей клетки в норме и при патологии, т.е. использовать ядро клетки в качестве перспективного биосенсора для диагностических целей, а также для оценки прогноза при критических состояниях [42].

С помощью экспресс-метода компьютерной фазово-интерференционной микроскопии можно оценивать функциональное состояние тромбоцитов. Использование компьютерной интерференционной микроскопии тромбоцитов позволяет оценить уровень внутрисосудистой активности тромбоцитов и риск развития тромбогенных осложнений при патологии, в частности, при хронических заболеваниях почек. Это особенно актуально при патологии почек у беременных, которая сопровождается увеличением размеров и активности тромбоцитов. Для обеспечения физиологического течения беременности и предупреждения развития осложнений при беременности и родах необходимо оперативно оценивать состояние системы гемостаза матери. С помощью указанного экспресс-метода можно оценивать функциональное состояние тромбоцитов и в случае необходимости проводить превентивные мероприятия для предупреждения грозных осложнений [43].

Препараты пробиотиков

К группе биологических препаратов, как известно, относятся препараты пробиотиков, которые, однако, не включены в официальный перечень биологических лекарственных препаратов, но которые успешно применяются как при хирургической, так и соматической патологии. Так, у детей с гастроэнтеритами (преимущественно ротавирусной этиологии) наиболее эффективным методом лечения является терапия с применением препаратов на основе бифидобактерий. Комплексное применение препаратов бифидобактерий и лизоцима (орально или ректально) по-

вышает эффективность терапии гастроэнтерита. При указанной патологии определяется повышение уровня эластазы в крови на фоне снижения лизоцима. Препараты на основе бифидобактерий способствуют снижению уровня эластазы в крови, повышению уровня активности $\alpha 1$ -протеазного ингибитора и лизоцима [44].

Заключение

В настоящее время активно проводится разработка новых и совершенствование уже выпускаемых биологических и биотехнологических препаратов. Причем основной тенденцией последних лет является неуклонное расширение спектра биологических препаратов, различающихся как по механизму действия, так и способами их получения. Вполне естественно, что постоянное появление новых лекарственных средств, в том числе препаратов передовой терапии, будет сопровождаться некоторым отставанием нормативно-методических требований для оценки их качества, проведения доклинических и клинических исследований. Основные проблемы, приведенные в данном обзоре, рассматривались в рамках работы Четырнадцатой международной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» 24–31 октября 2015 года (Бенидорм, Испания).

В последние годы в ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения Российской Федерации был разработан ряд документов, включающих «Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных препаратов» в 2 томах (2012) «Руководство по клиническим исследованиям лекарственных препаратов» в 2 томах (2012); «Руководство по экспертизе лекарственных средств» в 4 томах (2013–2014). На законодательном уровне рассмотрены и внесены дополнения к № 61-ФЗ от 12.04.2010 г. Федеральному закону «Об обращении лекарственных средств» (№ 429-ФЗ от 22 декабря 2014 г.). Разработан Проект Федерального закона № 717040-6 «О биомедицинских клеточных продуктах» (ред., внесенная в ГД ФС РФ от 06.02.2015 г.). За 2014–2015 гг. подготовлено около 30 документов в рамках формирования Евразийского экономического Союза, среди которых отдельный блок документов рассматривает вопросы, касающиеся только биологических/биотехнологических лекарственных препаратов.

Несмотря на постоянные усилия по разработке новых документов и обновления действующих, некоторые вопросы остаются без ответа. Требуют решения проблемы, связанные со стандартизацией проведения испытаний качества биологических/биотехнологических лекарственных препаратов с использованием современных физико-химических и биологических методов. Требуют решения проблемы оценки качества современных высокотехнологических биологических препаратов, так как каждый производитель в своей нормативной документации предусматривает использование только указанного оборудования определенной фирмы без ссылки на возможность использования аналогичного оборудования; оценку показателей качества с использованием только указанных тест-систем, стандартов, реагентов, линейных животных, линий клеток, подчас отсутствующих в Российской Федерации.

Серьезные проблемы при проведении фармацевтической экспертизы по оценке качества лекарственных биологических/биотехнологических препаратов создает также отсутствие нормативной базы, определяющей объемы и схемы испытаний, несогласованность требований раз-

личных ведомств. Решение всех этих проблем, поиск альтернативных путей их решения позволят своевременно обеспечивать практическое здравоохранение современными качественными биологическими лекарственными препаратами

Опыт создания регуляторных структур в развитых странах (например, FDA в США или EMA в ЕС) демонстрирует их высокую способность оперативно, в случае необходимости, решать появляющиеся новые проблемы, связанные с обращением лекарственных средств. Это достигается за счет того, что данные структуры наделены правом самостоятельно разрабатывать нормативно-методические рекомендации, которые являются обязательными для организаций, связанных с разработкой, изучением и оборотом лекарственных средств. Разработка подобно подхода для нормативно-методического обеспечения вопросов, связанных с оборотом лекарственных средств в нашей стране, позволит повысить качество, эффективность и безопасность биологических препаратов.

Список сокращений

АСИТ — аллерген-специфическая иммунотерапия
ВОЗ — Всемирная Организация Здравоохранения
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕС — Европейский Союз
МкАТ — моноклональные антитела
ММСК — мультипатентные мезенхимные стволовые клетки
РПЭ — ретикулярный пигментный эпителий
ФНО α — фактор некроза опухолей альфа
CD — кластер дифференцировки
EMA — Европейское медицинское агентство по лекарственным средствам
FDA — Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США)
GMP — надлежащая производственная практика
HBsAg — поверхностный антиген вируса гепатита В
IgE — иммуноглобулины класса E
IgG — иммуноглобулины класса G
qPCR — количественная фазовая микроскопия
scFv — одноцепочечный Fv-фрагмент иммуноглобулина
Th2 — Т-хелперы 2 типа

Литература

1. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» № 61-ФЗ от 22.12.2014 г.
2. Directive 2001/83/EC of the European parliament and of the council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use (OJ L 311, 28.11.2001, p. 67).
3. Медуницын НВ, Миронов АН, Мовсесянц АА. Теория и практика вакцинологии. М.: Ремедиум; 2015.
4. Медуницын НВ. Вакцинология. М.: Трида-Х; 2010.
5. Цыбалова ЛМ, Киселев ОИ. Универсальные вакцины против гриппа. Разработки, перспективы использования. Вопросы вирусологии 2012; 57(1): 9–14.
6. Медуницын НВ, Покровский ВИ. Основы вакцинопрофилактики и иммунотерапии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.
7. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Медуницын НВ, Лысикова СЛ. Орфанные препараты, принципы их регистрации и применения. Биопрепараты 2015; 55(3): 4–16.
8. Насонов ЕЛ, ред. Анти-В-клеточная терапия в ревматологии: фокус на ритуксимаб. М.: ИМА-ПРЕСС; 2012.
9. Насонов ЕЛ, Каратеев АЕ, Ключкина НГ. Фармакотерапия. В кн.: Насонов ЕЛ, Насонова ВА, ред. Ревматология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. С. 178–251.

10. Сигидин ЯА, Лукина ГВ. Биологическая терапия в ревматологии. М.: Практическая медицина; 2009.
11. Моисеенко ВМ. Возможности моноклональных антител в лечении злокачественных опухолей. Практическая онкология 2002; **3**(4): 253–61.
12. Buch MH, Bingham SJ, Bejanaro V, Bryer D, White J, Reece R, et al. Therapy of patients with rheumatoid arthritis. Outcome of infliximab failures switched to etanercept. *Arthr Care Res.* 2007; **57**: 448–53.
13. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, Keystone EC, Fleischmann RM, Furst DE, et al. Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Ann Rheum Dis.* 2013; **72**(9): 1496–502.
14. Guthel J. The promise of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *Critical Rev Oncol. Hematology* 2001; **38**: 1–2.
15. Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Волкова РА, Лаптева ЛК. Лекарственные препараты на основе генно-инженерных моноклональных антител. Биопрепараты 2011; **42**(2): 14–9.
16. Алпатова НА, Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Медуницын НВ, Бондарев ВП, Миронов АН, Меркулов ВА. Проблемы, связанные с проявлением иммуногенности лекарственных препаратов моноклональных антител при клиническом использовании. *Иммунология* 2014; (1): 28–32.
17. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, № 814 World Health Organization, October 2013.
18. Baker MP, Reynolds HM, Lumicisi B, Bryson CJ. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self Nonself.* 2010; (1): 314–22.
19. ICH S6(R1) guideline. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Geneva, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2011.
20. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev 1).
21. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BWP/42832/2005 Rev 1).
22. Guidance for Industry. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Biosimilarity. February. 2012.
23. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013.
24. Niederwieser D, Schmitz S. Biosimilar agents in oncology? haematology: from approval to Practice. *Eur J Haemat.* 2011; **86**: 277–88.
25. Василенко ИА. Взаимозаменяемость лекарственных препаратов: сравнительные аспекты. Разработка и регистрация лекарственных средств 2014; **1**(6): 146–52.
26. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Медуницын НВ. Механизмы аллергической реакции немедленного типа, препараты и методы специфической иммунотерапии. *Иммунология* 2016; **37**(1): 52–61.
27. Гуцин ИС. IgE-опосредованная гиперчувствительность как ответ на нарушение барьерной функции тканей. *Иммунология* 2015; **36**(1): 45–52.
28. Солдатов АА, Медуницын НВ, Авдеева ЖИ, Бондарев ВП, Миронов АН. Препараты лечебных аллергенов: проблемы и пути повышения качества, безопасности и эффективности. *Вестник НЦЭСМП* 2013; (4): 31–8.
29. Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. House dust mite allergens in asthma and allergy. *Trends Mol Med* 2010; (16): 321–8.
30. Purohit A, Niederberger V, Kronqvist M, Horak F, Grunneberg R, Suck R, et al. Clinical effects of immunotherapy with genetically modified recombinant birch pollen Bet v 1 derivatives. *Clin Exp Allergy* 2008; **38**(9): 1514–25.
31. Moldaver D, Larche M. Immunotherapy with peptides. *Allergy* 2011; **66**(6): 784–91.
32. Edlmayr J, Niespodziana K, Focke-Tejkl M, Linhart B, Valenta R. Allergen-specific immunotherapy: towards combination vaccines for allergic and infectious diseases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011; (352): 121–40.
33. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; (133): 621–31.
34. Stella JA, D'Amore A, Wagner WR, Sacks MS. On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues. *Acta Biomater.* 2010; **6**(7): 2365–81.
35. Chen G, Ushida T, Tateish T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromol Biosci.* 2002; (2): 67–77.
36. Кузнецова ДС, Тимашев ПС, Баграташвили ВИ, Загайнова ЕВ. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор). *Современные технологии в медицине* 2014; **6**(4): 201–12.
37. Plosker GL, Keam SJ. Omalizumab: a review of its use in the treatment of allergic asthma. *BioDrugs* 2008; (22): 189–204.
38. Колокольцева ТД, Сабурин ИИ, Кубатиев АА. Культура клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль. *Патогенез* 2015; **13**(2): 50–65.
39. Кошелева НВ, Зурина ИМ, Сабурин ИИ, Горкун АА, Колокольцева ТД, Борзенко СА, Репин ВС. Влияние эмбриональной теллячьей сыворотки на формирование сфероидов из стромальных клеток лимба глаза. *Патогенез* 2015; **13**(2): 4–11.
40. Макаров МС, Сторожева МВ, Конюшко ОИ, Боровкова НВ, Хватов ВБ. Влияние концентрации тромбоцитарного фактора роста на пролиферативную активность фибробластов человека. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2013; (2): 111–5.
41. Игнатъев ПС, Тычинский ВП, Вышенская ТВ. Исследование активации лимфоцитов методом когерентной фазовой микроскопии. *Альманах клинической медицины* 2008; **17**(2): 65–7.
42. Цалман АЯ, Ватазин АВ, Василенко ИА, Метелин ВБ, Вышенская ТВ. Интерференционная фазометрия ядерных структур лимфоцитов при трансплантации почки. *Клиническая нефрология* 2010; (6): 43–7.
43. Василенко ИА, Пашкин ИИ, Сулов ВП, Власова ЕА. Динамика морфометрических показателей тромбоцитов периферической крови как критерий оценки тромбозности диализных мембран. *Урология* 2011; (2): 36–41.
44. Ушакова АЮ, Феклисова ЛВ, Мескина ЕР, Тедед ЮГ, Волохович ТТ, Пожалостина ЛВ. Клинико-лабораторная эффективность применения различных схем аципола в лечении детей, больных острыми кишечными инфекциями. *Биопрепараты* 2008; (2): 19–21.

Об авторах

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

Олефир Юрий Витальевич. Генеральный директор, д-р мед. наук.

Медуницын Николай Васильевич. Руководитель научного направления, д-р мед. наук, профессор, академик РАН.

Авдеева Жанна Ильдаровна. Главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Солдатов Александр Алексеевич. Главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Авдеева Жанна Ильдаровна; Avdeeva@expmed.ru

Modern biological/biotechnological medicinal products. Topical issues and prospects for development

Yu. V. Olefir, N. V. Medunitsyn, Zh. I. Avdeeva, A. A. Soldatov, A. A. Movsesyants, V. A. Merkulov, V. P. Bondarev

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The review provides with the information, related to the development, research and registration of new biological preparations, including the issues of terminology and classification. It also highlights the issues of and prospects for genetically engineered drugs, specific aspects of comparative studies to prove the similarity of a biosimilar and the original (reference) medicine, clinical use and interchangeability of preparations, prospects for the development of biotechnological medicines, expert evaluation of the quality of biological/ biotechnological medicines, modern methods of immunotherapy of allergic diseases by recombinant medicines, as well as the issues of cell technology and tissue engineering. The review also describes the topics discussed at the 14th International Conference «High Medical Technologies of 21st Century» (October 24–31, 2015, Spain), related to fundamental and applied research, development and introduction of new technologies and modern medicines into clinical practice.

Key words: biological and biotechnological preparations; orphan drugs; preparations of cell and tissue therapy; specific immunotherapy of allergic diseases; biosimilars

For citation: Olefir YuV, Medunitsyn NV, Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Bondarev VP. Modern biological/biotechnological medicinal products. Topical issues and prospects for development. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 67–77.

References

1. Federal law «On circulation of medicines» № 61-FZ, 22.12.2014 (in Russian).
2. Directive 2001/83/EC of the European parliament and of the council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use (OJ L 311, 28.11.2001, p. 67).
3. Medunitsyn NV, Mironov AN, Movsesyants AA. Theory and practice of vaccinology. Moscow: Remedium; 2015 (in Russian).
4. Medunitsyn NV. Vaccinology. Moscow: Triada-X; 2010 (in Russian).
5. Tsybalova LM, Kiselev OI. Universal flu vaccine. Development, perspective of using. *Voprosy virusologii* 2012; 57(1): 9–14 (in Russian).
6. Medunitsyn NV, Pokrovskiy VI. Basics of vaccination and immunotherapy. Moscow: GEOTAR-Media; 2005 (in Russian).
7. Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Medunitsyn NV, Lysikova SL. Orphan drugs, principles of registration and application. *Biopreparaty* 2015; 55(3): 4–16 (in Russian).
8. Nasonov EL, ed. Anti-B-cell therapy in rheumatology: Focus on rituximab. Moscow: IMA-PRESS; 2012 (in Russian).
9. Nasonov EL, Karateev AE, Klukvina NG. Pharmacotherapy. In: Nasonov EL, Nasonova VA, eds. *Rheumatology: national guide*. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. P. 178–251 (in Russian).
10. Sigidin YaA, Lukina GV. Biological Therapy in Rheumatology. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2009 (in Russian).
11. Moiseenko VM. Features of monoclonal antibodies in the treatment of malignant tumors. *Prakticheskaya onkologiya* 2002; 3(4): 253–61 (in Russian).
12. Buch MH, Bingham SJ, Bejanaro V, Bryer D, White J, Reece R, et al. Therapy of patients with rheumatoid arthritis. Outcome of infliximab failures switched to etanercept. *Arthr Care Res*. 2007; 57: 448–53.
13. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, Keystone EC, Fleischmann RM, Furst DE, et al. Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72(9): 1496–502.
14. Gutheil J. The Promise of Monoclonal Antibodies for the Therapy of Cancer. *Critical Rev Oncol Hematology* 2001; 38: 1–2.
15. Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Volkova RA, Lapteva LK. Medicinal Preparations based on monoclonal antibodies. *Biopreparaty* 2011; 42(2): 14–9 (in Russian).
16. Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Medunitsyn NV, Bondarev VP, Mironov AN, Merkulov VA. Problems associated with the manifestation of the immunogenicity of the monoclonal antibody drugs in clinical use. *Immunologiya* 2014; (1): 28–32 (in Russian).
17. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, № 814 World Health Organization October 2013.
18. Baker MP, Reynolds HM, Lumicisi B, Bryson CJ. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self Nonself*. 2010; (1): 314–22.
19. ICH S6(R1) guideline. Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Geneva, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2011.
20. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev 1).
21. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev 1).
22. Guidance for Industry. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Biosimilarity. February. 2012.
23. Guidance on the expertise of drugs. V. I. Moscow: Grif i K; 2013 (in Russian).
24. Niederwieser D, Schmitz S. Biosimilar agents in oncology? haematology: from approval to Practice. *Eur J Haemat*. 2011; 86: 277–88.
25. Vasilenko IA. Interchangeability of drugs: comparative aspects. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* 2014; 1(6): 146–52 (in Russian).
26. Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Medunitsyn NV. Mechanisms for immediate type allergic reactions, preparations and methods of specific immunotherapy. *Immunologiya* 2016; 37(1): 52–61 (in Russian).
27. Guschin IS. IgE-mediated hypersensitivity in response to the violation of the barrier function of the tissue. *Immunologiya* 2015; 36(1): 45–52 (in Russian).
28. Soldatov AA, Medunitsyn NV, Avdeeva ZhI, Bondarev VP, Mironov AN. Therapeutic allergens: problems and ways to improve quality, safety and efficacy. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2013; (4): 31–8 (in Russian).
29. Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. House dust mite allergens in asthma and allergy. *Trends Mol Med* 2010; (16): 321–8.
30. Purohit A, Niederberger V, Kronqvist M, Horak F, Grunneberg R, Suck R, et al. Clinical effects of immunotherapy with genetically modified recombinant birch pollen Bet v 1 derivatives. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(9): 1514–25.
31. Moldaver D, Larche M. Immunotherapy with peptides. *Allergy* 2011; 66(6): 784–91.
32. Edlmayr J, Niespodziana K, Focke-Tejkl M, Linhart B, Valenta R. Allergen-specific immunotherapy: towards combination vaccines for

- allergic and infectious diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011; (352): 121–40.
33. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; (133): 621–31.
 34. Stella JA, D'Amore A, Wagner WR, Sacks MS. On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues. *Acta Biomater*. 2010; 6(7): 2365–81.
 35. Chen G, Ushida T, Tateish T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromol Biosci*. 2002; (2): 67–77.
 36. Kuznetsova DS, Timashev PS, Bagratashvili VI, Zagaynova EV. Bone implants based scaffolds and cell systems in tissue engineering (review). *Sovremennye tehnologii v meditsine* 2014; 6(4): 201–12 (in Russian).
 37. Plosker GL, Keam SJ. Omalizumab: a review of its use in the treatment of allergic asthma. *BioDrugs* 2008; (22): 189–204.
 38. Kolokoltseva TD, Saburina IN, Kubatiev AA. The culture of human and animal cells: isolation, culturing, cryopreservation and control. *Patogenez* 2015; 13(2): 50–65 (in Russian).
 39. Kosheleva NV, Zurina IM, Saburina IN, Gorkun AA, Kolokoltseva TD, Borzenok SA, Repin VS. Influence of fetal calf serum on the formation of spheroids limb eyes stromal cells. *Patogenez* 2015; 13(2): 4–11 (in Russian).
 40. Makarov MS, Storozheva MV, Konyushko OI, Borovkova NV, Hvatov VB. Effect of platelet derived growth factor concentration on the proliferative activity of human fibroblasts. *Kletochnye tehnologii v biologii i meditsine* 2013; (2): 111–5 (in Russian).
 41. Ignatiev PS, Tychinskiy VP, Vyshenskaya TV. The studying of lymphocyte activation by coherent phase microscopy. *Almanah klinicheskoy meditsiny* 2008; 17(2): 65–7 (in Russian).
 42. Tsalman AY, Vatazin AV, Vasilenko IA, Metelin VB, Vyshenskaya TV. The interference patterns of nuclear phase meter lymphocytes in kidney transplantation. *Klinicheskaya nefrologiya* 2010; (6): 43–7 (in Russian).
 43. Vasilenko IA, Pashkin IN, Suslov VP, Vlasova EA. Dynamics of morphometric parameters of peripheral blood platelets as a criterion for assessing thrombogenicity dialysis membranes. *Urologiya* 2011; (2): 36–41 (in Russian).
 44. Ushakov AY, Feklisova LV, Meskin ER, Teder YuG, Volohovich TT, Pozhalostina LV. Clinical and laboratory efficacy of various Acipol schemes in treating children with acute enteric infections. *Biopreparaty* 2008; (2): 19–21 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky Boulevard, 8-2, Moscow, 127051, Russian Federation.

Olefir YuV. Director General. Doctor of Medical Sciences.

Medunitsyn NV. Department Director. Doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAS.

Avdeeva Zhl. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Soldatov AA. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences.

Movsesyants AA. Head of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Merkulov VA. Deputy Director General for the expertise of drugs. Doctor of Medical Sciences, professor.

Bondarev VP. Director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Безопасность биологических препаратов. Сообщение 2. Проблемы безопасности биоподобных препаратов

А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева, Ю. В. Олефир, В. А. Меркулов, В. П. Бондарев

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

Поступила 29.01.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

Применение сокращенной схемы исследований на доклиническом и клиническом этапах исследования препаратов из группы «biosimilars» (биоподобный, биоаналоговый) требует повышенного внимания к вопросам безопасности их применения. В процессе регистрации в 2013–2015 гг. биоподобных препаратов в странах с развитой регуляторной системой и фармаконадзором (США, Канада и страны ЕС) наибольшую дискуссию вызвали вопросы экстраполяции результатов исследований биоподобного инфликсимаба (моноклональные антитела, специфичные к ФНО α). ЕМА приняло решение, что результаты изучения эффективности и безопасности инфликсимаба, полученные в популяции взрослых больных ревматоидными заболеваниями, могут быть экстраполированы на показания для лечения воспалительных заболеваний кишечника (болезнь Крона и язвенный колит у взрослых и детей). Ряд медицинских ассоциаций, таких как ассоциации врачей гастроэнтерологов и педиатров, считают, что данная экстраполяция не обоснована. Министерство здравоохранения Канады тоже сделало заключение о том, что экстраполяция не обоснована, и не утвердило применение препарата для лечения по показаниям болезней Крона и язвенный колит. Продолжается активная дискуссия по вопросу взаимозаменяемости оригинального препарата биоподобным. Учитывая, что безопасность биоподобного препарата до регистрации изучена не в полном объеме, обычно исследования безопасности продолжаются после регистрации еще несколько лет. Если производится замена препаратов, то это не позволяет объективно оценить безопасность биоподобного препарата. Кроме препаратов «biosimilars» в странах с неразвитой регуляторной системой и фармаконадзором в обороте находятся препараты, которые тоже зарегистрированы по сокращенной схеме исследований, но не в полном соответствии с принципами «biosimilarity». Качество данных препаратов не всегда соответствует стандартам, о чем свидетельствуют многочисленные исследования. ВОЗ, обеспокоенная качеством таких препаратов, предлагает назвать их «non-innovators» и выделить в отдельную группу, а спонсорам в течение определенного периода времени предлагается представить доказательства высокого качества данных препаратов.

Ключевые слова: биоподобные препараты; биоаналоговые препараты; препараты «non-innovators»; «biosimilars»; экстраполяция результатов; взаимозаменяемость; препараты моноклональных антител; биоаналоговые инсулины.

Библиографическое описание: Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Безопасность биологических препаратов. Сообщение 2. Проблемы безопасности биоподобных препаратов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 78–89.

Революционным этапом развития биологических препаратов явилась разработка генно-инженерных методов получения молекул белка с заданными свойствами. Технология рекомбинантной ДНК позволила создать разнообразные биотехнологические препараты, которые широко и эффективно применяются для лечения опухолевых, аутоиммунных, наследственных и других тяжело протекающих и угрожающих жизни заболеваний.

Окончание срока патентной защиты позволяет разрабатывать (воспроизводить) и регистрировать новые версии действующего вещества оригинального препарата. С учетом опыта разработки, регистрации и применения оригинального препарата, могут быть снижены объемы исследований при разработке «воспроизведенного» препарата и упрощена процедура его регистрации. Данный принцип был впервые разработан и научно обоснован для воспроизведенных низкомолекулярных химических препаратов, которые получили название «дженерики». Для признания нового препарата «дженериком» необходимо продемонстрировать эквивалентность (идентичность) молекулы его действующего вещества молекуле референтного (оригинального) препарата и продемонстрировать их биоэквивалентность (или, если необходимо, терапевтическую эквивалентность).

После того как в конце 1990-х и начале 2000-х годов стали подходить к концу сроки патентной защиты первых биотехнологических препаратов (соматотропин, инсулин, эритропоэтин, филграстим, интерфероны и др.), встал вопрос о регистрации новых версий данных препаратов с учетом опыта разработки, производства и применения оригинальных. Биологические/биотехнологические препараты имеют существенные отличия (по молекулярной массе, многомерной структуре и наличию посттрансляционных модификаций молекулы действующего вещества и др.) от химических препаратов (рис. 1). Учитывая это, принципы упрощенной схемы исследований и регистрации для низкомолекулярных химических препаратов «дженериков», не могут гарантировать безопасность и эффективность новых версий оригинальных биологических/биотехнологических препаратов.

Поэтому в начале 2000-х годов Европейское агентство по лекарственным средствам (ЕМА), с одобрения ВОЗ, приступило к разработке научных принципов для оценки качества, безопасности и эффективности препаратов, которые являются новой версией оригинальных биологических/биотехнологических препаратов. Учитывая, что в новых производственных условиях невозможно полностью воспроизвести молекулу действующего вещества биотех-

нологического оригинального препарата, для названия новой версии оригинального препарата (после многолетних дискуссий) был выбран термин «biosimilars». В РФ данный термин был переведен как биоподобный, биосимиляр и биоаналоговый.

В 2004–2006 годах ЕМА разработали и опубликовали первые научные принципы доказательства сходства/подобия биоподобного препарата оригинальному (референтному). Разработка документов происходила параллельно с проведением исследований и регистрацией первых биоподобных препаратов. В 2006–2008 годах ЕМА выдали лицензии на 2 препарата соматотропина, 5 — эритропоэтина и 7 — филграстима. При этом было отказано в регистрации препаратов интерферона- β , интерферона- α и трем препаратам инсулина.

До 2010 года были подготовлены 3 общих документа, регламентирующих проведение сравнительных исследований для демонстрации подобия/сходства биоподобного и оригинального (референтного) препаратов и нормативных требований для проведения доклинических и клинических исследований шести отдельных групп биоподобных препаратов (эритропоэтины, гепарины, интерферон- α , филграстимы, соматотропины и инсулины). В 2009 году состоялась международная конференция ВОЗ, на которой были приняты и одобрены, разработанные ЕМА, принципы доказательства подобия/сходства биоподобного и оригинального (референтного) препаратов. Данный подход был поддержан многими странами мира, и на его основе многими странами были приняты национальные требования к биоподобным препаратам.

Таким образом, согласно руководству ЕМА, биоподобным препаратом (биосимиляр, биоаналоговый) является биологический лекарственный препарат, который содержит новую версию действующего вещества оригинального препарата (референтного), и для которого продемонстрировано сходство/подобие на основе сравнительных исследований с референтным препаратом по показателям качества, биологической активности, эффективности и безопасности [1]. Данное определение было дополнено экспертами Администрации продуктов питания и лекарств (FDA, Национальный орган регуляции лекарственных средств США) указанием о том, что выявленные в сравнительных исследованиях незначительные различия (между биоподобным и оригинальным препаратами) не должны иметь клинической значимости [2].

Для регистрации биоподобного препарата на первом этапе исследований проводится сравнительное изучение физико-химических и биологических свойств (сравнительная оценка качества) биоподобного и оригинального (референтного) препаратов. Демонстрация высокого подобия/сходства биоподобного и оригинального (референтного) препаратов позволяет на доклиническом и клиническом этапах значительно снизить объем исследований, в сравнении объемом исследований, необходимых для регистрации оригинального препарата. Активные исследования в данном направлении обусловлены, прежде всего, экономическими проблемами, так как затраты на разработку и исследование биоподобного препарата, а, соответственно, и стоимость самого биоподобного препарата значительно ниже, чем оригинального.

После 2010 г. ЕМА, с учетом ранее полученного опыта, обновило практически все документы, и подготовило новые, в том числе, рекомендации для проведения доклинических и клинических исследований биоподобных препаратов фолликулотропина, интерферона- β и препаратов

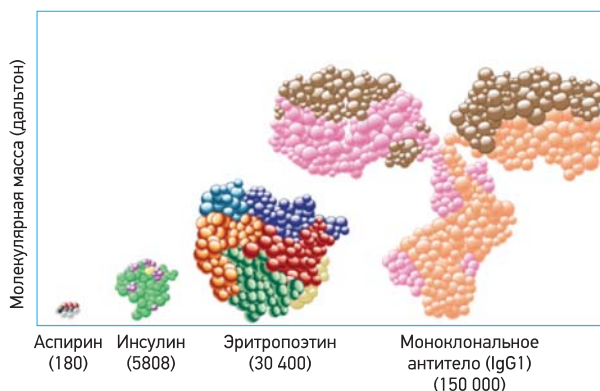


Рис. 1. Молекулярная масса действующего вещества аспирина, инсулина, эритропоэтина и моноклонального антитела.

на основе моноклональных антител. В 2013–2014 гг. были зарегистрированы биоподобные препараты филграстима, фолликулотропина, инфликсимаб и инсулин гларгин.

Разработка и исследование биологических/биотехнологических препаратов является молодым, активно развивающимся направлением фарминдустрии. Создание новых биологических препаратов и совершенствование уже разработанных является динамическим процессом, при этом решение одних проблем может сопровождаться появлением других. В работе представлен анализ проблем безопасности, которые появились в процессе последних лет разработки, доклинического и клинического изучения, регистрации и опыта клинического применения биоподобных препаратов.

Проблемы экстраполяции результатов исследований биоподобных препаратов

У производителей (разработчиков и исследователей) и экспертов регуляторных органов, с одной стороны, и практикующих врачей, с другой стороны, не всегда совпадают точки зрения по вопросам оценки эффективности и безопасности препаратов. Регистрация препарата и утверждение показаний и противопоказаний к применению препарата, проводится на основании проведенных клинических исследований в соответствии с нормативными требованиями. В то же время именно от искусства врача зависит исход лечения больного, и только врач берет на себя ответственность при назначении препарата. Соответственно, врачи очень осторожно подходят к вопросам применения новых препаратов. Врачи на основании своего опыта применения препаратов, течения заболевания, особенностей пациента и других факторов вырабатывают собственные подходы (стандарты лечения и рекомендации) к применению препаратов, в которых их позиция не всегда может совпадать с мнением разработчиков и производителей препарата. Кроме того, для отсутствия единого мнения между врачами и производителями по некоторым вопросам назначения препаратов есть и объективные основания. Так, F. Wolfe и K. Michaud [3] при анализе терапии 4911 больных ревматоидным артритом биотехнологическими препаратами (этанерсепт, инфликсимаб, адалимумаб, абатасепт, цертолизумаб пегол и ритуксимаб) в течение 11 лет установили, что эффективность данных препаратов была ниже, чем это было продемонстрировано при проведении клинических исследований III фазы этих препаратов.

В связи с этим появление новых классов биологических/биотехнологических препаратов сопровождалось формированием позиции врачебных сообществ по вопросам безопасного применения препаратов. В первую очередь эти проблемы беспокоят ревматологов, дерматологов, эндокринологов, гастроэнтерологов, онкологов, трансплантологов, клинических фармакологов и педиатров.

Основные проблемы, связанные с применением биоподобных препаратов и представленные в соответствующих заявлениях врачебных ассоциаций, касаются экстраполяции результатов клинических исследований на другие показания или популяции больных и возможности взаимозаменяемости оригинальных и биоподобных препаратов.

Нормативные требования допускают экстраполяцию результатов изучения эффективности и безопасности биоподобного препарата по одному показанию на другие показания при условии, что экстраполяция научно обоснована (в частности, это касается случаев, когда механизмы развития заболеваний аналогичны).

Первые биоподобные препараты гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) — филграстима были зарегистрированы на основании изучения эффективности и безопасности для профилактики и лечения нейтропений, развивающихся на фоне радио- или химиотерапии опухолевых заболеваний. Результаты данных исследований были экстраполированы на другие показания, в том числе и на применение препарата с целью мобилизации периферических стволовых клеток у здоровых доноров.

После регистрации первых биоподобных филграстимов и поступления их в обращение многие европейские международные и национальные ассоциации трансплантологов и специалистов по пересадке костного мозга выступили с заявлениями о невозможности применения препарата у здоровых доноров для сбора аутологичных клеток. Фактически это означает, что экстраполяция результатов эффективности и безопасности, полученных на популяции больных раком, на показания для применения у здоровых лиц не обоснована. Данное заявление они обосновали тем, что безопасность препаратов была изучена на популяции больных с измененной системой иммунитета (на фоне приема цитостатических препаратов). При этом у здоровых лиц такие свойства препарата как «нежелательная» иммуногенность могут проявиться иначе, чем при введении филграстима больному на фоне противоопухолевой терапии [4, 5]. Итальянская ассоциация гематологов и трансплантологов костного мозга считает, что для биоподобных препаратов эпозитивов наблюдается аналогичная ситуация для такого показания, как сбор аутологичной крови перед операцией [5].

Производители биоподобных препаратов Г-КСФ (филграстим) согласились с данной позицией и инициировали проведение целого ряда клинических сравнительных исследований. В своих исследованиях они продемонстрировали, что при применении биоподобного и оригинального (референтного) препаратов Г-КСФ (филграстим) для сбора аутологичных клеток у здоровых отсутствуют клинически значимые различия эффективности и безопасности. Фактически были проведены исследования взаимозаменяемости (терапевтической эквивалентности) биоподобного и оригинального препаратов Г-КСФ, которые позволили обосновать («легализовать») экстраполяцию результатов исследования, полученных в популяции больных [6].

Опасения врачей, связанные с безопасностью применения биоподобных препаратов, обусловлены рядом факторов. Во-первых, в новых производственных условиях невозможно получить точную «копию» оригинального препарата. Во-вторых, генно-инженерные препараты (и биоподобные и оригинальные) очень чувствительны к изменению производственного процесса, таким факторам как условия роста клеток, процессы очистки, изменение состава препарата и условия хранения. Даже незначительные изменения производственного процесса могут оказать влияние на клетки-продуценты с изменением структуры или стабильности рекомбинантного белка действующего вещества, а чаще профиля гликозилирования. Данные изменения могут привести к изменению основных свойств лекарственного препарата, в первую очередь, его иммуногенной активности [7, 8].

Препараты моноклональных антител (мАт) в сравнении с другими биологическими/биотехнологическими препаратами имеют высокую молекулярную массу, что повышает риск проявления «нежелательной» иммуногенности. Формирование нейтрализующих антител сопровождается снижением эффективности биологического лекарственного препарата. Проблемы иммуногенности препаратов анти-ФНО моноклональных антител особенно актуальны при лечении детей, что обусловлено более длительным курсом лечения [9].

Повторно проблема экстраполяции результатов исследований биоподобных препаратов возникла при регистрации ЕМА первого биоподобного препарата моноклональных антител — инфликсимаба. Биоподобный препарат моноклональных антител СТ-Р13 (инфликсимаб) был разработан и производится в Северной Корее компанией «Celltron» и зарегистрирован под двумя торговыми названиями Remsima® (Celltron) и Inflecta® (Hospira) для лечения ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилоартрита, псориаза, псориатического артрита, болезни Крона и язвенного колита у взрослых и детей. СТ-Р13 был зарегистрирован по результатам изучения эквивалентности эффективности и безопасности фармакокинетики у больных при анкилозирующем спондилоартрите [9].

В процессе регистрации и поступления препарата на рынок были высказаны опасения, связанные с экстраполяцией результатов исследований эффективности и безопасности, полученных на больных ревматоидными заболеваниями, на показания — лечение воспалительных заболеваний кишечника (болезнь Крона и язвенный колит) у взрослых и детей. Данные опасения оппоненты обосновывают следующими доводами [13–17].

Во-первых, согласно рекомендации ЕМА, экстраполяция возможна в том случае, если механизм действия препарата одинаков при разных заболеваниях. Механизмы действия препаратов против фактора некроза опухоли (ФНО) при ревматоидных заболеваниях и при воспалительных заболеваниях кишечника различные. Кроме того, при сравнительном изучении препаратов анти-ФНО (инфликсимаб, адалимумаб, этерасепт и др.) было установлено, что некоторые препараты анти-ФНО, применяемые для лечения ревматоидных заболеваний, не только неэффективны при воспалительных заболеваниях кишечника, но и могут быть опасными.

Во-вторых, отсутствие достаточно полных обоснований клинической значимости выявленных различий в гликозилировании биоподобного и оригинального препаратов. В процессе сравнительного изучения физико-химических свойств и биологических свойств биоподобного

СТ-P13 (IgG1 химерные мАТ и оригинального препарата Remicade® (референтный препарат) было продемонстрировано высокое подобие/сходство по всем показателям качества. Среди выявленных незначительных различий, наибольшее количество вопросов вызвало афукозилирование (снижение уровня фукозы) гликанов в области Fc-фрагмента препарата СТ-P13. Установлено, что афукозилирование может снизить связывание с FcγRIIIa рецептором, и тем самым снизить эффективность препарата. Кроме того, изменение гликозилирования может повлиять на проявление «нежелательной» иммуногенности препарата.

Выявленные различия гликозилирования L. de Ridder с соавт. [13] сопоставили с результатами клинических исследований безопасности. При проведении исследований III фазы побочные реакции на введение СТ-P13 были зарегистрированы у 3,9% больных, а референтного препарата — у 4,9%. Однако антитела к препарату при применении СТ-P13 встречались у 27,4% больных, а препарата Remicade® — у 22,5%, но частота побочных реакций, обусловленных выработкой антител против препарата, была одинаковой в обеих группах (35,3 и 35,9% соответственно). При применении биоподобного препарата серьезные побочные реакции встречались чаще (у 10% больных), чем при лечении оригинальным препаратом (7%). При этом в группе больных, получавших СТ-P13, отмечено развитие туберкулеза у трех больных, а в группе больных, получавших Remicade®, двое больных выбыли из исследования в связи с развитием новообразований. То есть лечение биоподобным препаратом СТ-P13 сопровождалось более высоким уровнем серьезных побочных реакций и выработкой антител к препарату (относительно оригинального), что возможно обусловлено различиями гликозилирования сравниваемых препаратов. В то же время результаты пострегистрационных исследований безопасности и эффективности (которые значительно шире, чем исследования в предрегистрационном периоде), которые могут более объективно охарактеризовать безопасность биоподобного препарата, еще не опубликованы.

В-третьих, изучение эффективности у популяции больных ревматоидным артритом является недостаточно чувствительной моделью для выявления возможных различий. Так как при клиническом исследовании оригинального препарата инфликсимаба больные ревматоидным артритом (РА) отвечали не только на лечение препаратом, но и на введение плацебо.

В-четвертых, лечение воспалительных заболеваний кишечника основано на монотерапии. Однако при проведении клинических исследований больные ревматоидным артритом получали СТ-P13 в составе комбинированной терапии, в которую входил и метотрексат (иммуносупрессант). Совместное применение анти-ФНО и иммуносупрессоров подавляет выработку антител против анти-ФНО препаратов, что не позволяет оценить «истинную» иммуногенность и оценить потенциальную иммуногенность препарата при монотерапии.

В-пятых, согласно рекомендации ЕМА, экстраполяция возможна в случае, если для изучения эффективности препаратов используются одни и те же конечные точки. Например, для любого показания при применении препарата Г-КСФ (филграстима) в качестве конечной точки используется показатель абсолютного количества лейкоцитов, который в то же время является маркером фармакодинамики при всех показаниях. Для оценки эффективности при ревматоидных заболеваниях и воспалительных

заболеваниях кишечника используют разные конечные точки.

В-шестых, для лечения ревматоидных заболеваний используются дозы в 5 мг/кг, а для лечения воспалительных заболеваний кишечника — только 3 мг/кг. При клинических исследованиях не была продемонстрирована эффективность и безопасность препарата при малых дозах.

В-седьмых, исследования эффективности и безопасности СТ-P13 при лечении воспалительных заболеваний кишечника не только не проводились у детей, но даже и взрослых. Поэтому экстраполяция результатов исследований, полученных во взрослой популяции больных ревматоидными заболеваниями, на детскую популяцию больных воспалительными заболеваниями кишечника, рассматривается как необоснованная.

Представленные опасения послужили основанием некоторым ассоциациям врачей (ревматологов, дерматологов, гастроэнтерологов и педиатров) для подготовки рекомендаций, в которых было указано, что экстраполяция результатов изучения биоподобного препарата при ревматоидных заболеваниях на воспалительные заболевания кишечника не обоснована. И, соответственно, было предложено не использовать биоподобный препарат СТ-P13 при болезни Крона и язвенном колите у взрослых и детей, а также провести сравнительные исследования эффективности и безопасности СТ-P13 среди детей и взрослых больных воспалительными заболеваниями кишечника [13–17].

В ответ на данные замечания и рекомендации производители биоподобного препарата уже начали дополнительные исследования по оценке безопасности препарата. S. Ben-Horin с соавт. [18] провели анализ 123 сывороток крови больных болезнью Крона и язвенным колитом, получавших Remicade®, и у которых выявлены антитела к данному препарату. Группу контроля составили больные, которые не получали анти-ФНО препараты. Все сыворотки крови с антителами против Remicade® перекрестно реагировали с препаратом Remsima. При оценке способности данных сывороток (n=10) взаимодействовать с препаратом (в реакции нейтрализации) было установлено, что сыворотки крови одинаково блокировали активность Remicade® и Remsima®. Представленные данные продемонстрировали общность эпитопов препаратов активного вещества Remicade® и Remsima®.

В Норвегии и Венгрии (страна, в которой зарегистрирована компания «Celltron») начались клинические исследования безопасности и эффективности препарата при воспалительных заболеваниях кишечника. В Венгрии K. Gecse с соавт. [19] провели изучение эффективности и безопасности препарата при лечении болезни Крона и язвенного колита среди 90 взрослых больных. Эффективность препарата при воспалительных заболеваниях кишечника соответствовала его эффективности при ревматоидной патологии.

Несмотря на это, при регистрации СТ-P13 в Канаде в 2014 г., Министерство здравоохранения Канады заняло жесткую позицию по вопросу экстраполяции результатов исследования, и препараты были одобрены только для лечения ревматоидных заболеваний и псориаза. При этом было указано, что экстраполяция результатов оценки фармакокинетики, эффективности и безопасности, полученных при лечении ревматоидных заболеваний, на показания для лечения воспалительных заболеваний кишечника необоснованна [17].

Биоподобные препараты инсулинов

В сентябре 2014 г. ЕМА зарегистрировало биоподобный препарат инсулина гларгин — Abasaglar (previously Abasgia) производства «Eli Lilly» (Австрия) [20]. Для регистрации биоподобного препарата инсулина требуется сравнительная (с оригинальным препаратом) оценка его способности снижать уровень глюкозы в клэмп-тесте здоровых или больных сахарным диабетом II типа. При этом не установлен конкретный интервал отклонений показателей теста для биоподобного и оригинального препаратов, поэтому, рекомендовано использовать интервал, применяемый для изучения биоэквивалентности (80–120%) [21]. L. Heinemann с соавт. [22] считают, что это достаточно широкий диапазон для демонстрации биоподобия препаратов, так как в фармакопее (для определения вариации между сериями) или при характеристике устройств для введения инсулина используются значительно меньшие интервалы отклонений оцениваемого показателя.

Выработка антител к инсулину является основной причиной резистентности к инсулину. Поэтому вторым и важным моментом, на который следует обратить внимание, является «нежелательная» иммуногенность препаратов инсулина. При попытке провести сравнительные исследования оценки уровня инсулина в крови больных диабетом I типа разработчики «Eli Lilly» столкнулись с тем, что у больных наблюдается высокая вариация показателей, обусловленная наличием антител к инсулину, что не позволяет использовать данную популяцию для демонстрации биоподобия [22].

Если для препаратов инсулинов, производимых ранее, «нежелательная» иммуногенность была одной из основных проблем безопасности, то современные методы очистки и производства значительно снизили иммуногенный потенциал современных препаратов. Поэтому появление антител к препарату возможно, в первую очередь, при наличии примесей в препарате или других изменений (например, изменение профиля гликозилирования) белка препарата, вызванных нарушением/изменением производственного процесса. Соответственно, появление антител у пациентов, принимающих препарат, может быть использовано в качестве суррогатного маркера наличия примесей в препарате [22–24].

Следует отметить, что появление антител к препарату является не только суррогатным маркером наличия примесей в препарате, данный показатель также свидетельствует о стабильности технологического процесса. В некоторых случаях для появления антител к некоторым биологическим препаратам (например, препаратам моноклональных антител) может потребоваться срок до трех и более лет. Поэтому мониторинг иммуногенности препарата следует включить в процедуру непрерывного мониторинга безопасности биологических препаратов.

Проблемы взаимозаменяемости

В настоящее время еще нет единого представления о взаимозаменяемости биологических препаратов. Активный выход на рынок биоподобных препаратов поставил вопрос о взаимозаменяемости оригинального препарата биоподобным, что еще больше обострило вопрос о взаимозаменяемости вообще биологических препаратов.

Согласно мировой практике замена одного препарата другим может производиться на разных уровнях: автоматическая замена («substitution») фармацевтом на уровне

аптеки, замена врачом («interchangeability») — при государственных закупках на уровне медицинского учреждения [25]. В соответствии с нормативными требованиями большинства стран, взаимозаменяемость возможна при доказательстве терапевтической эквивалентности двух препаратов. Для некоторых низкомолекулярных химических препаратов, доказательство структурной эквивалентности и биоэквивалентности (например, референтного препарата и «дженерика») позволяет сделать заключение об их терапевтической эквивалентности. Для остальных препаратов оценка терапевтической эквивалентности проводится в сравнительных клинических исследованиях. При этом для биологических препаратов решение о взаимозаменяемости принимается только на основании исследований терапевтической эквивалентности.

Демонстрация подобия/сходства при проведении сравнительных исследований биоподобного и оригинального (референтного) препаратов не означает автоматического признания их взаимозаменяемыми. Это прописано в основных рекомендациях ЕМА и ВОЗ, посвященных доказательству биоподобия, согласно которым решение о взаимозаменяемости принимает национальный регуляторный орган с учетом результатов специально проведенных клинических исследований о возможности взаимозаменяемости исследуемых препаратов [25, 26].

Согласно нормативным требованиям в США термином «взаимозаменяемый» биологический препарат, определяется препарат, который не только имеет высокое сходство по показателям качества с референтным препаратом, но для которого «риск безопасности и снижение эффективности не больше, чем при применении референтного препарата» при его многократном введении.

Для того, чтобы оценить взаимозаменяемость биологических препаратов, FDA разработало 4 уровня сходства биоподобного и референтного препаратов — нет сходства, сходный, высокое сходство и очень высокое сходство («как отпечатки пальцев»). Кроме того, FDA издало так называемую пурпурную книгу (Purple Book) — список биологических лицензированных препаратов, который содержит информацию и о взаимозаменяемых препаратах. В списке уже содержится 288 препаратов, однако в списке отсутствуют биологические взаимозаменяемые препараты, т.е. препараты, для которых доказана их взаимозаменяемость [27].

Данный подход, при котором составляются списки взаимозаменяемых препаратов на основе доказательства терапевтической эквивалентности, применяется в Италии, Финляндии, Словении, Норвегии, Словакии, Люксембурге, Венгрии и Швеции. Следует отметить, что в этих странах в списках взаимозаменяемых препаратов нет ни одного биоподобного препарата, в перечне препаратов в основном указаны низкомолекулярные химические лекарственные средства.

В большинстве развитых стран мира приняты правовые нормы разного уровня, запрещающие или ограничивающие автоматическую замену оригинального препарата биоподобным. В некоторых странах полностью запрещена автоматическая замена, а в некоторых — решение о замене может принять только врач. Среди стран мира только в некоторых странах Латинской Америки врач обязан автоматически заменять препараты на более дешевые [25]. В работе D. Niederwieser, S. Schmitz [28] представлены ссылки на документы разных европейских стран, запрещающие или ограничивающие замену («substitution»)

оригинальных препаратов биоподобными, дополненные в работе Н. Mellstedt [29] (табл. 1).

Против необоснованной взаимозаменяемости лекарственных препаратов выступили многие исследователи, в том числе и многие ассоциации врачей, которые в своей клинической практике используют биологические/биотехнологические препараты (ревматологи, эндокринологи, дерматологи, терапевты, педиатры и др.) [11–17, 22, 25], в том числе и отечественные ученые и ассоциации [23, 24, 30–32]. В первую очередь это связано с тем, что многие потенциальные риски безопасности (побочные реакции), которые встречаются нечасто и поэтому не могут быть выявлены на этапе клинических предрегистрационных исследований биологических/биотехнологических препаратов. Это обусловлено тем, что клинические исследования на предрегистрационном этапе биоподобных препаратов проводятся на малой выборке и в относительно короткий период. Поэтому для биоподобных препаратов обязательным является оценка безопасности (частота

развития редких побочных реакций) в пострегистрационном периоде, включая оценку иммуногенного потенциала препарата. В случае если препарат будет заменен, это не позволит оценить эффективность и безопасность биоподобного препарата в пострегистрационном периоде, которое является обязательным для регистрации биоподобного препарата. Однако в некоторых странах (страны Латинской Америки) врач обязан назначать те препараты инсулина, которые предлагают национальные Министерства здравоохранения, т.е. осуществлять взаимозаменяемость, что не позволяет в полной мере оценить его безопасность.

В тех случаях, когда возможность замены оригинального препарата биоподобным научно обоснована и допускается его замена лечащим врачом, он должен выполнить еще ряд дополнительных условий. В качестве примера можно привести позицию (рекомендацию) ассоциации португальских ревматологов, которая была принята на

Таблица 1. Документы разных стран, запрещающие или ограничивающие взаимозаменяемость оригинальных препаратов биоподобными (D. Niederwieser, S. Schmitz и Н. Mellstedt [28, 29])

Страна	Нормативные требования
Франция	– French Gazette. LOI no 2006–3062 du 3 mai 2006. Projet de loi portant diverses dispositions d'adaptation au droit communautaire dans le domaine du médicament. Available from: http://www.assemblee-nationale.fr/12/projets/pl3062.aspo
Германия	– German Bundesministerium der Justiz. German Social Law book, 'Aut idem' § 129 section 4 sentence 1, January 17 th 2008. Regulation Rahmenvertrag 20080117. Available from: http://www.gesetze-im-internet.de/sgb_5/129.html – Kermani F. The German biosimilars breakthrough that never was. Available at: http://invivoblog.blogspot.com/2011/10/german-biosimilars-breakthrough-that.html (accessed October 2013)
Греция	– PD 340/1993 (article 23) Code of Ethics for Pharmacists in Greece. 1993 – Generics and Biosimilars Initiative. Greece says no to automatic substitution of biologics. Available at: http://gabionline.net/Biosimilars/News/Greece-says-no-to-automatic-substitution-of-biologics (accessed October 2013)
Италия	– Italian Council of State Opinion. Italian Council of State Opinion n.3992.07 based on a note by the Italian Ministry of Health, 2007
Словения	– FIRDPC Regulation on Interchangeability, September 2008. Available from: http://www.firdpc.com/en/Legislation/Regulation_on_Interchangeability_September_2008/
Испания	– Ministerio De Sanidad Y Consumo. 17420: ORDEN SCO/2874/2007, de 28 de septiembre, por la que se establecen los medicamentos que constituyen excepción a la posible sustitución por el farmacéutico con arreglo al artículo
Швеция	– 86.4 de la Ley 29/2006, de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. (Octubre 2007) Available from: http://www.boe.es/boe/dias/2007/10/05/pdfs/A40495-40496.pdf – Swedish Medicines Agency (MPA) statement on substitution of biologics. Available from: http://www.lakemedelsverket.se/malgrupp/Halso-sjukvard/Artikelsamlingar/Lista/Lakemedelsformanerna-och-utbytbarhet/Biosimilarsbedoms-inte-vara-utbytbara/
Великобритания	– Proposal to the Department of Health's Ministerial Industry Strategy Group (MISG) on the substitution of biological medicines. Available from: http://www.mhra.gov.uk/home/groups/es-policy/documents/websitesresources/con2030475.pdf
Чехия	– Czech Drug Law No 378/2007, § 83, article 2, valid as of January 1st, 2008. 2008 Jan 1 – Czech Society of Oncology. Opinion of the Czech Society of Oncology on the possibility of biosimilars substitution. Available at: http://www.linkos.cz/press-releases/opinion-of-the-czech-society-for-oncology-on-the-possibility-of-biosimilar-substitution/ (accessed October 2013)
Дания	– Danish Medicines Agency. Approved Generic Substitution List. Available from: http://www.laegemiddelstyrelsen.dk/db/filarkiv/5872/GeneriskSubstitutionLaegemidlerDrugNiveau.xls
Финляндия	– Finnish Medicines Agency (FIMEA). Principles for compiling the list of mutually substitutable medicinal products with marketing authorisation at the Finnish Medicines Agency. 2009. Available from: http://www.nam.fi/medicines/substitutable_medicinal_products/criteria_used
Венгрия	– OGYI — Országos Gyógyszerezeti Intézet (Hungarian National Institute of Pharmacy). OGYI — Helyettesít-thető ségi lista. A lista lezárásának idő pontja. Nov 2009. Available from: http://www.ogyi.hu/dynamic/2009_11_rehelyettesithetosegijalista.pdf
Норвегия	– NOMA. Norway's Medicines Agency (NOMA) — Biotilsvarende filgrastim tas midlertidig av Byttelisten. Available from: http://www.legemiddelverket.no/templates/Inter_Page_82543.aspx – NOMA. Norway's Medicines Agency (NOMA) Automatic Substitution List. 1 October 2010. Available from: http://www.legemiddelverket.no/templates/InterPage_82635.aspx
Словакия	– Slovakian Ministry of Health. Act of Slovakian Ministry of Health no. 209/2008, 2008
Австрия	– Austrian Medical Law. ökonomische Verschreibung, RÖ F 2005, 2005

съезде ревматологов Португалии, состоявшемся 5–6 октября 2013 года [14]:

- при первичном назначении больному биологического оригинального или биоподобного препарата врач должен учитывать состояние больного и потенциальные риски, связанные с препаратом, а не руководствоваться исключительно экономическими соображениями;
- автоматическая замена биологических препаратов недопустима;
- взаимозаменяемость оригинального препарата биоподобным возможна только врачом на основании обоснованной оценки состояния больного;
- при замене оригинального препарата на биоподобный информация об этом должна быть включена в соответствующую национальную базу данных Reuma.pt (Португальский реестр больных с ревматоидными заболеваниями);
- замена биологического препарата может быть осуществлена только после истечения 6-месячного срока применения одного препарата;
- не допускается автоматическая экстраполяция результатов изучения эффективности и безопасности биоподобного препарата, полученные при одном заболевании, на другие показания или другие возрастные подгруппы;
- если невозможна лабораторная оценка иммуногенности препарата, то необходимо учитывать косвенные показатели иммуногенности, такие как снижена эффективности, которые должны быть отражены в базе данных Reuma.pt;
- владелец лицензии обязан вносить все зарегистрированные побочные реакции в базу данных Reuma.pt, с указанием даты развития осложнения и номера серии препарата.

Вопросы рентабельности лечения

Разработка и внедрение в клиническую практику препаратов на основе рекомбинантных белков, в том числе и биоподобных, высветили ряд экономических проблем. В ряде исследований эффективности и рентабельности лечения биологическими препаратами было показано, что терапия биологическими препаратами дороже (например, при ревматоидных заболеваниях), чем при применении небиологических препаратов [3, 33–36].

Изучение эффективности рекомбинантных факторов свертывания крови и «аналогичных» (не биоподобных) препаратов, полученных из плазмы крови, показало, что плазменные препараты являются более эффективными и безопасными (в частности, в плане иммуногенности), чем рекомбинантные [37]. В последние годы были разработаны новые методы выделения и очистки активного вещества, которые позволяют получать высокоочищенные инсулины животного происхождения. При этом В. Richter с соавт. [38] не смогли найти доказательств, свидетельствующих о преимуществе рекомбинантных инсулинов перед современными высокоочищенными инсулинами животного происхождения.

Возникает парадоксальная ситуация, когда с одной стороны отсутствует преимущество некоторых рекомбинантных препаратов перед их аналогами (не биоподобными препаратами), получаемыми из природного сырья. С другой стороны, стоимость рекомбинантных препаратов значительно выше, чем препаратов, получаемых из природного сырья. Если отсутствие или недостаточное количество препаратов свертывания крови можно объяснить

проблемами с получением плазмы крови человека от доноров, то инсулины животного происхождения просто перестали производить. Удаление с рынка инсулинов животного происхождения стимулирует разработку биоподобных препаратов. Следует отметить, что в конечном итоге стоимость лечения данными препаратами для больных возросла.

Неоригинальные («non-innovators») биологические препараты

Первые документы, регламентирующие оценку качества, проведение доклинических и клинических исследований препаратов «biosimilars» были разработаны ЕМА в 2004–2006 гг. и одобрены ВОЗ в 2009 г. Поэтому многие страны с неразвитой экономикой и регуляторной системой в это время разрабатывали и регистрировали «копии» оригинальных препаратов на основании принципов изучения «дженериков», или собственных национальных принципов. При этом для регистрации препарата поэтапное проведение полных сравнительных исследований по всем параметрам между разрабатываемым неоригинальным и оригинальным препаратом не требуется.

В разных странах данные препараты определяют разными терминами, например, в Бразилии — «новый биологический», в Индии — «копии» или «биодженерики», в Иране — «биодженерики», в Малайзии — «биокопии» и т.п. В некоторых странах Латинской Америки, Азии, Российской Федерации и других регионах принципы «biosimilars» были утверждены совсем недавно, а в некоторых странах (например, Китай) не приняты до сих пор [39–41]. Поэтому в мире в обороте находится большое количество неоригинальных биологических препаратов, зарегистрированных на основании принципов, значительно отличающихся от требований, разработанных для препаратов «biosimilars», и которые ближе к требованиям, предъявляемым к «дженерикам».

Учитывая, что количество данных препаратов постоянно увеличивается, и необходимо принять меры для решения данного вопроса, ВОЗ рекомендует выделить неоригинальные биологические препараты в отдельную группу, которая получила название препараты «non-innovators» [42]. Проведенные независимые сравнительные исследования оценки качества «non-innovators» и оригинальных препаратов выявили существенные различия физико-химических и биологических свойств между ними [22–24, 39–42]. Клинические сравнительные исследования между «non-innovators» и оригинальными препаратами независимыми исследователями по этическим соображениям обычно не проводились. Однако D. R. Owens с соавт. [43] и S. R. Joshi [44] показали, что способность препаратов «non-innovator» инсулинов (гларгин) снижать уровень сахара в сыворотке крови пациентов отличается от эффективности оригинальных препаратов. В работе М. В. Шестаковой и О. К. Викуловой [23] выявлены колоссальные различия между препаратами инсулинов, присутствующими на отечественном рынке, полученными от разных производителей, по показателям времени начала действия препарата и по составу вспомогательных веществ. В работе В. М. Ермоленко с соавт. [40] продемонстрированы различия между оригинальными и «non-innovators» препаратами эритропоэтинов, в том числе, и теми которые находятся на отечественном рынке.

В исследовании М. К. Kuhlmann и A. Schmidt [45] при изучении стабильности неоригинальных («non-innova-

tors») и оригинальных препаратов инсулинов (гларгин) было установлено, что при хранении в течение 28 суток при температуре 28°C в оригинальном препарате Lantus® не было выявлено изменений белкового спектра. В то же время из 11 серий препаратов «non-innovators» (Glaritus® и Basalin®) при хранении в данных условиях в 6 сериях препаратов установлено увеличение количества белка с высокой молекулярной массой (рис. 2).

При сравнительных исследованиях неоригинальных («non-innovators») и оригинальных препаратов инсулина были выявлены не только различия по показателям качества самого препарата, но и установлены различия по показателям качества устройств для введения препаратов (инъекторов) между оригинальными и «non-innovators» препаратами инсулина [46].

Лицензирование/регистрация препарата в качестве биоподобного («biosimilars») в соответствии с установленными требованиями позволяет гарантировать его безопасность и эффективность применения. Поэтому производители неоригинальных «non-innovators» препаратов очень часто называют свои препараты биоподобными («biosimilars»). Это не только вносит серьезную путаницу, но и не позволяет объективно оценить безопасность и эффективность как биоподобных («biosimilars») препаратов, так и неоригинальных «non-innovators» препаратов [41].

Учитывая сложившуюся ситуацию с регистрацией/лицензированием неоригинальных «non-innovators» препаратов, ВОЗ подготовила документ («Regulatory expectations and risk assessment for biotherapeutic products». 24 January 2014), в котором акцентировало внимание на данной проблеме, и предложила пути выхода из данной ситуации [42].

В основе инициативы ВОЗ лежат рекомендации национальным регуляторным органам стран, в которых в обращении находятся препараты, зарегистрированные не в полном соответствии с принципами «biosimilars» [1, 2, 26], для того, чтобы тщательно оценить их качество, эффективность и безопасность. При этом указывается, что в первую очередь необходимо определить степень доказанного сходства неоригинального «non-innovator» и оригинального препаратов и риск безопасности применения неоригинального «non-innovator» препарата. Далее необходимо установить период времени, в течение которого заявитель обязан предоставить достоверные доказательства высокого сходства «non-innovator» препарата с оригинальным по показателям качества, безопасности и эффективности. В течение этого времени лицензия/регистрация препарата не отзывается. Если заявитель не может представить убедительные доказательства сходства/подобия неоригинального «non-innovator» и оригинального препаратов, то он может предоставить

соответствующие материалы и зарегистрировать препарат уже как оригинальный.

Данный опыт был изучен на примере перерегистрации низкомолекулярных гепаринов в Канаде. Ранее низкомолекулярные гепарины в Канаде относились к обычным препаратам, а не биологическим. В 2009 г. Министерство здравоохранения страны приняло решение о том, что они должны рассматриваться как биологические препараты. Был установлен 12-месячный период, в течение которого заявитель должен представить материалы, свидетельствующие о том, что гепарин полностью соответствует требованиям, предъявляемым национальным регуляторным органом Канады к биологическим препаратам. А для тех препаратов гепарина, которые являются неоригинальными препаратами, необходимо было представить материалы о соответствии требованиям, предъявляемым Министерством здравоохранения Канады к биоподобным,

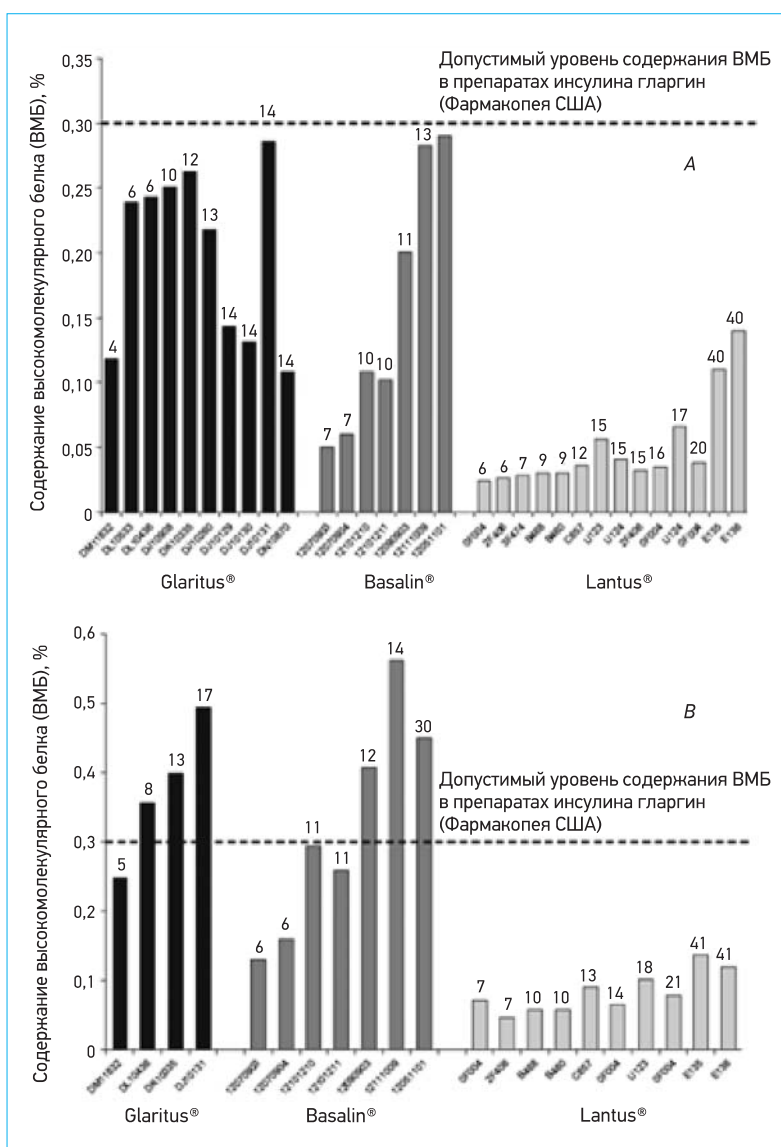


Рис. 2. Количество высокомолекулярного белка (ВМБ) в сериях неоригинальных препаратов Glaritus® и Basalin® и оригинальном препарате Lantus® до хранения (А) и после хранения (Б) при температуре 28°C в течение 28 суток. Пунктиром показан допустимый уровень высокомолекулярного белка в препаратах инсулина гларгин, согласно Фармакопее США [45].

которые в Канаде названы «subsequent-entry biologicals» препараты [47, 48].

В последнее время на основании рекомендаций ВОЗ в некоторых странах азиатского и латиноамериканского регионов начались работы для «легализации» статуса своих неоригинальных («non-innovators») биологических препаратов.

Указанные проблемы касаются и Российской Федерации, так как понятие «биоподобный (биоаналоговый)» препарат в нашей стране было официально принято в 2015 г. До этого были зарегистрированы отечественные и зарубежные препараты (Индия, Китай) не всегда с полным соответствием требованиям, разработанным для препаратов «biosimilars» [40].

Следует отметить, что неоригинальные препараты не все низкого качества. Для того чтобы решить возникшие вопросы, в первую очередь, необходимо в нашей стране ввести понятие неоригинальный биологический («non-innovator») препарат, чтобы выделить эти препараты из группы биоподобных («biosimilars») препаратов. Отсутствие четкого разделения по группам препаратов (в зависимости от принципов, на основании которых были разработаны, изучены и зарегистрированы биологические препараты), может привести к ложным выводам о качестве и безопасности биоподобных препаратов. Например, в очень актуальных и тщательно проработанных статьях о качестве неоригинальных («non-innovators») биопрепаратов, их часто называют биоаналогами, т.е. препаратами, относящимися к группе препаратов «biosimilars» [23, 24, 40]. Поэтому на основании приведенных в данных статьях материалов, может сложиться ложное впечатление, что биоподобные («biosimilars») препараты имеют проблемы, связанные с безопасностью. Кроме того, это не позволяет объективно оценить безопасность и эффективность как биоподобных («biosimilars»), так и неоригинальных «non-innovators» препаратов. Следует подчеркнуть, что от того, к какой группе относится препарат, зависят и мероприятия, проводимые в процессе фармаконадзора.

Таким образом, только тщательно выверенное, строгое использование определенных терминов при обсуждении вопросов, связанных с оценкой качества, эффективности и безопасности новых групп биологических/биотехнологических лекарственных препаратов, позволит всем субъектам, имеющим отношение к препаратам, включая разработчиков, представителей регуляторных органов, врачебное сообщество и пациентов, объективно подходить к решению всех насущных проблем, связанных с биологическими лекарственными препаратами.

Заключение

Биоподобные препараты являются результатом разработки новых направлений в производстве биологических/биотехнологических лекарственных препаратов. Развитие данного класса препаратов сопровождается появлением новых проблем безопасности, которые необходимо учитывать при подготовке нормативных документов, регламентирующих разработку и исследования препаратов. Основными проблемами современного этапа развития биоподобных препаратов являются вопросы экстраполяции результатов исследований и оценка безопасности. Понятие биоподобный (биоаналоговый) препарат в нашей стране официально появилось в 2015 г. До этого времени неоригинальные биологические препараты были зарегистрированы без четко установленных требований по алго-

ритму их исследования либо на основании исследований по укороченной схеме, в связи этим они могут быть отнесены к группе препаратов «non-innovators». Многие из этих препаратов имеют высокое качество, однако следует признать, что качество некоторых из них по результатам исследований независимых лабораторий, было признано несоответствующим фармакопейным требованиям. ВОЗ и другие организации рекомендуют национальным регуляторным органам указанные препараты выделить в отдельную группу неоригинальных «non-innovators» препаратов. Кроме того, выделить заявителю время, чтобы он смог предоставить дополнительные материалы, позволяющие перерегистрировать препарат как биоподобный («biosimilars») или оригинальный.

Объективно оценивая ситуацию, можно заключить, что включение неоригинального препарата в группу препаратов «non-innovators», это временный статус разработанного биологического препарата. В настоящее время назрела необходимость разработки соответствующей процедуры «легализации» неоригинальных биологических лекарственных препаратов хорошего качества и повышения качества, в соответствии с установленными требованиями, или исключения из обращения препаратов низкого качества.

Литература

1. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev. 1).
2. Guidance for Industry. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Biosimilarity. February, 2012.
3. Wolfe F, Michaud K. The loss of health status in rheumatoid arthritis and the effect of biologic therapy: a longitudinal observational study. *Arthritis Research Therapy* 2010; 12: R35–47.
4. Shaw BE, Confer DL, Hwang WY, Pamphilon DH, Pulsipher MA. Concerns about the use of biosimilar granulocyte colony-stimulating factors for the mobilization of stem cells in normal donors: position of the World Marrow Donor Association. *Haematol.* 2011; 96: 942–7.
5. Barosi G, Bosi A, Abbracchio MP, Danesi R, Genazzani A, Corradini P, et al. Key concepts and critical issues on epoetin and filgrastim biosimilars. A position paper from the Italian Society of Hematology, Italian Society of Experimental Hematology, and Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematol.* 2011; 96: 937–42.
6. Schmitt M, Publicover A, Orchard KH, Gurlach M, Wang L, Schmitt A, et al. Biosimilar G-CSF based mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells for autologous and allogeneic stem cell transplantation. *Theranostics* 2014; 4(3): 280–9.
7. Declerck PJ. Biosimilar monoclonal antibodies: a science-based regulatory challenge. *Expert Opin Biol Ther.* 2013; 13: 153–6.
8. Lispi M, Datola A, Bierau H, Ceccarelli D, Crisci C, Minari K, et al. Heterogeneity of commercial recombinant human growth hormone (r-hGH) preparations containing a thioether variant. *J Pharm Sci.* 2009; 98(12): 4511–24.
9. Praditpornsilpa K, Tiranathanagul K, Kupatawintu P, Jootar S, Intragumtornchai T, Tungsanga K, et al. Biosimilar recombinant human erythropoietin induces the production of neutralizing antibodies. *Kidney Int.* 2011; 80(1): 88–92.
10. EMA. Inflectra: EPAR — Public assessment report. 2013. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-Public_assessment_report/human/002778/WC500151490.pdf.
11. Ebbers HC, Crow SA, Vulto AG, Schellekens H. Interchangeability, immunogenicity and biosimilars. *Nat Biotechnol.* 2012; 30: 1186–90.

12. Fiorino G, Danese S. The biosimilar road in inflammatory bowel disease: the right way? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014; 28: 465–71.
13. de Ridder L, Waterman M, Turner D, Bronsky J, Hauer AC, Dias JA, et al. Use of biosimilars in paediatric inflammatory bowel disease: a position statement of the ESPGHAN Paediatric IBD Porto Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 61(4): 503–31.
14. Fonseca JE, Gonçalves J, Araújo F, Cordeiro I, Teixeira F, Canhã H, et al. The Portuguese Society of Rheumatology position paper on the use of biosimilars. *Acta Reumatol Port*. 2014; 39: 60–71.
15. Fiorino G, Giralomoni G, Lapadula G, Orlando A, Danese S, Olivieri I. The use of biosimilars in immune-mediated disease: a joint Italian Society of Rheumatology (SIR), Italian Society of Dermatology (SIdMaST), and Italian Group of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) position paper. *Autoimmunity Rev*. 2014; 13: 751–5.
16. Argüelles-Arias F, Barreiro-de-Acosta M, Carballo F, Hinojosa J, Tejerina T. Joint position statement by "Sociedad Española de Patología Digestiva" (Spanish Society of Gastroenterology) and "Sociedad Española de Farmacología" (Spanish Society of Pharmacology) on biosimilar therapy for inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2013; 105(1): 37–43.
17. Scott BJ, Klein AV, Wang J. Biosimilar monoclonal antibodies: a canadian regulatory perspective on the assessment of clinically relevant differences and indication extrapolation. *J Clin Pharmacol*. 2015; 55(S3): S123–32.
18. Ben-Horin S, Yavzori M, Fudim E, Picard O, Ungar B, Lee SY, et al. Cross-immunogenicity: antibodies to infliximab in Remicade-treated patients with IBD similarly recognize the bio-similar Remsima. *Gut*. 2016; 65(7): 1132–8.
19. Gecse K, Farkas K, Lovasz B, Banai J, Bene L, Gasztonyi B, et al. Biosimilar infliximab in inflammatory bowel diseases: first interim results from a prospective nationwide observational cohort. *Gastroenterol*. 2015; 148: S-865–6.
20. EMA. Abasria Insulin glargine: EPAR — Public assessment report. 2014. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/002835/WC500169353.pdf.
21. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues (EMA/CHMP/BWP/32775/2005 Rev. 1).
22. Heinemann L, Home PD, Hompesch M. Biosimilar insulins: guidance for data interpretation by clinicians and users. *Diab Obes Metabol*. 2015; 17(10): 911–8.
23. Шестакова МВ, Викулова ОК. Биосимиляры: презумпция «виновности». *Сахарный диабет* 2011; (4): 91–9.
24. Климонтов ВВ, Мякина НЕ. Биосимиляры аналогов инсулина: что мы должны о них знать. *Эффективная фармакотерапия* 2015; 1(7): 28–34.
25. EGA. Handbook on biosimilar medicines. 2012.
26. Guidelines on evaluation of similar biotechnological products (SBPs). Annex 2. WHO Technical Report Series № 977, 2013.
27. US Food and Drug Administration. Background information: lists of licensed biological products with reference product exclusivity and biosimilarity or interchangeability evaluations. 2014. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/ucm411424.htm>.
28. Niederwieser D, Schmitz S. Biosimilar agents in oncology—haematology: from approval to practice. *Eur J Haematol*. 2011; 86(4): 277–88.
29. Mellstedt H. Clinical considerations for biosimilar antibodies. *EJC Suppl*. 2013; 11(3): 1–11.
30. Биологические препараты. Позиция Российской ассоциации эндокринологов. *Сахарный диабет* 2013; (3): 121–2.
31. Шаньгин ИВ, Смирнов АС, Шнайдер АА. Взаимозаменяемость лекарственных препаратов в России: проблемы и перспективы. Современная организация лекарственного обеспечения 2013; (3): 10–18.
32. Василенко ИА. Взаимозаменяемость лекарственных препаратов: сравнительные аспекты. Разработка и регистрация лекарственных средств 2014; 1(3): 146–52.
33. Scott DL, Kingsley G. Clinical effectiveness of biologics in clinical practice. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(2): 115–6.
34. Mitchell P, Korobelnik P, Lanzetta P, Holz FG, Prünte C, Schmidt-Erfurth U, et al. Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials. *Br J Ophthalmol*. 2010; 94(1): 2–13.
35. Pełka M, Broniarczyk-Dyła G. Zastosowanie leków biologicznych w dermatologii. *Post Dermatol Alergol*. 2007; 24(1): 35–41.
36. Shankar S, Handa R. Biological agents in rheumatoid arthritis. *J Postgrad Med*. 2004; 50: 293–9.
37. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgerd U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood*. 2007; 109(11): 4693–7.
38. Richter B, Neises G, Bergerhoff K. Human versus animal insulin in people with diabetes mellitus: a systematic review. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2002; 31: 723–49.
39. Белоусов ДЮ. Биоаналоги — насколько они подобны? *Качественная клиническая практика* 2006; (2): 80–3.
40. Ермоленко ВМ, Филатова НН, Михайлова НА, Хасанов НН. Рекомбинантный человеческий эритропоэтин: оригинальные препараты и биоаналоги. *Клиническая нефрология* 2012; (2): 4–8.
41. Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Алпатов АН, Медунцын НВ, Кузнецовский МВ, Лысикова СЛ. и др. Проблемы регистрации биологических неоригинальных лекарственных препаратов. *Биопрепараты* 2014; (4): 24–36.
42. World Health Organization. Regulatory expectations and risk assessment for biotechnological products. WHO/RRAT DRAFT/24 January 2014. Available from: http://www.who.int/biologicals/WHO_Risk_Assessment_for_Biotechnological_Products_24_Jan_2014.pdf.
43. Owens DR, Landgraf W, Schmidt A, Bretzel RG, Kuhlmann M. The emergence of biosimilar insulin preparations — a cause for concern? *Diab Technol Ther*. 2012; 14: 989–96.
44. Joshi SR. Biosimilar peptides: need for pharmacovigilance. *J Assoc Phys India* 2011; 59: 44–7.
45. Kuhlmann MK, Schmidt A. Production and manufacturing of biosimilar insulins: implications for patients, physicians, and health care systems. *Biosimilars* 2014; (4): 45–58.
46. Friedrichs A, Bohnet J, Korger V, Adler S, Schubert-Zsilavecz M, Abdel-Tawab M. Dose Accuracy and Injection Force of Different Insulin Glargine Pens. *J Diabetes Sci Technol* 2013; 7(5): 1346–53.
47. Policy statement: Clarifying the appropriate regulatory pathway for subsequent entry low molecular weight heparins. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/brgtherap/applic-demande/guides/lmw-h-pol-3_hfmm-eng.php.
48. Guidance for sponsors: Information and Submission Requirements for Subsequent Entry Biologics (SEBs). Published by authority of the Minister of Health. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/brgtherap/applic-demande/guides/seb-pbu/seb-pbu_2010-eng.php.

Об авторах

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

Солдатов Александр Алексеевич. Главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Авдеева Жанна Ильдаровна. Главный эксперт Управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Олефир Юрий Витальевич. Генеральный директор, д-р мед. наук.

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, профессор.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Солдатов Александр Алексеевич; Soldatov@exppmed.ru

The safety of biological preparations. Part 2. Safety issues of biosimilars

A. A. Soldatov, Zh. I. Avdeeva, Yu. V. Olefir, V. A. Merkulov, V. P. Bondarev

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The use of the reduced scheme in preclinical and clinical studies of «biosimilars» requires special attention to the safety issues. During the process of the marketing authorization of biosimilars in 2013–2015 the countries with advanced regulatory and pharmacovigilance systems (USA, Canada and EU countries), the most contentious debates were provoked by the issues of extrapolation of the results of the research of a biosimilar infliximab (TNF α -specific monoclonal antibodies). EMA made the decision that the results of the efficacy and safety studies of infliximab, obtained in adult patients with rheumatoid disease, can be extrapolated to the indications for the treatment of inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis in adults and in children). Several medical associations such as the Association of Gastroenterologists and the Association of Pediatricians believe that this extrapolation is not justified. Health Canada also made a conclusion that the extrapolation is not justified and did not approve the use of the mentioned preparation for the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. There is still an ongoing hot discussion on the issue of interchangeability of an original medicine and a biosimilar. Given that the safety of a biosimilar has been studied before obtaining marketing authorization not to the fullest extent, usually safety studies continue after obtaining marketing authorization for a few more years. If there is an interchange of medicines, then it is not possible to objectively evaluate the safety of a biosimilar. In the countries with poor regulatory and pharmacovigilance system not only «biosimilars» are in drug circulation system, but also other medicines registered under the reduced studies scheme, but not in full compliance with the principles of «biosimilarity». The quality of these medicines does not always meet the standards, as evidenced by numerous studies. WHO is concerned about the quality of the mentioned medicines and suggests to call them «non-innovators» and establish a separate group, and claimed that the sponsors were invited for a certain period of time to provide the evidence of the high quality of these medicines.

Key words: biosimilars; «non-innovators» preparations; extrapolation of the results; interchangeability; preparations of monoclonal antibodies; biosimilar insulins.

For citation: Soldatov AA, Avdeeva ZI, Olefir YuV, Merkulov VA, Bondarev VP. The safety of biological preparations. Part 2. Safety issues of biosimilars. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 78–89.

References

- Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev. 1).
- Guidance for Industry. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Biosimilarity. February, 2012.
- Wolfe F, Michaud K. The loss of health status in rheumatoid arthritis and the effect of biologic therapy: a longitudinal observational study. *Arthritis Research Therapy* 2010; 12: R35–47.
- Shaw BE, Confer DL, Hwang WY, Pamphilon DH, Pulsipher MA. Concerns about the use of biosimilar granulocyte colony-stimulating factors for the mobilization of stem cells in normal donors: position of the World Marrow Donor Association. *Haematol*. 2011; 96: 942–7.
- Barosi G, Bosi A, Abbracchio MP, Danesi R, Genazzani A, Corradini P, et al. Key concepts and critical issues on epoetin and filgrastim biosimilars. A position paper from the Italian Society of Hematology, Italian Society of Experimental Hematology, and Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematol*. 2011; 96: 937–42.
- Schmitt M, Publicover A, Orchard KH, Gurlach M, Wang L, Schmitt A, et al. Biosimilar G-CSF based mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells for autologous and allogeneic stem cell transplantation. *Theranostics* 2014; 4(3): 280–9.
- Declerck PJ. Biosimilar monoclonal antibodies: a science-based regulatory challenge. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2013; 13: 153–6.
- Lispi M, Datola A, Bierau H, Ceccarelli D, Crisci C, Minari K, et al. Heterogeneity of commercial recombinant human growth hormone (r-hGH) preparations containing a thioether variant. *J. Pharm. Sci.* 2009; 98(12): 4511–24.
- Praditpornsilpa K, Tirananthanagul K, Kupatwintu P, Jootar S, Intragumtornchai T, Tungsanga K, et al. Biosimilar recombinant human erythropoietin induces the production of neutralizing antibodies. *Kidney Int.* 2011; 80(1): 88–92.
- EMA. Inflectra: EPAR — Public assessment report. 2013. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-Public_assessment_report/human/002778/WC500151490.pdf.
- Ebbers HC, Crow SA, Vulto AG, Schellekens H. Interchangeability, immunogenicity and biosimilars. *Nat Biotechnol.* 2012; 30: 1186–90.
- Fiorino G, Danese S. The biosimilar road in inflammatory bowel disease: the right way? *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014; 28: 465–71.
- de Ridder L, Waterman M, Turner D, Bronsky J, Hauer AC, Dias JA, et al. Use of biosimilars in paediatric inflammatory bowel disease: a position statement of the ESPGHAN Paediatric IBD Porto Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 61(4): 503–31.
- Fonseca JE, Gonçalves J, Araújo F, Cordeiro I, Teixeira F, Canhã H, et al. The Portuguese Society of Rheumatology position paper on the use of biosimilars. *Acta Reumatol Port.* 2014; 39: 60–71.
- Fiorino G, Girolomoni G, Lapadula G, Orlando A, Danese S, Olivieri I. The use of biosimilars in immune-mediated disease: a joint Italian Society of Rheumatology (SIR), Italian Society of Dermatology (SiDeMaST), and Italian Group of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) position paper. *Autoimmunity Rev.* 2014; 13: 751–5.
- Argüelles-Arias F, Barreiro-de-Acosta M, Carballo F, Hinojosa J, Tejerina T. Joint position statement by "Sociedad Española de Patología Digestiva" (Spanish Society of Gastroenterology) and "Sociedad Española de Farmacología" (Spanish Society of Pharmacology) on biosimilar therapy for inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2013; 105(1): 37–43.
- Scott BJ, Klein AV, Wang J. Biosimilar monoclonal antibodies: a canadian regulatory perspective on the assessment of clinically relevant differences and indication extrapolation. *J Clin Pharmacol* 2015; 55(S3): S123–32.
- Ben-Horin S, Yavzori M, Fudim E, Picard O, Ungar B, Lee SY, et al. Cross-immunogenicity: antibodies to infliximab in Remicade-treated patients with IBD similarly recognize the bio-similar Remsima. *Gut* 2016; 65(7): 1132–8.
- Gecse K, Farkas K, Lovasz B, Banai J, Bene L, Gasztonyi B, et al. Biosimilar infliximab in inflammatory bowel diseases: first interim re-

- sults from a prospective nationwide observational cohort. *Gastroenter.* 2015; 148: 5–865–6.
20. EMA. Abasria Insulin glargine: EPAR — Public assessment report. 2014. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion-Initial_authorisation/human/002835/WC500169353.pdf.
 21. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues (EMA/CHMP/BWP/32775/2005 Rev. 1).
 22. Heinemann L, Home PD, Hompesch M. Biosimilar insulins: guidance for data interpretation by clinicians and users. *Diab Obes Metabol.* 2015; 17(10): 911–8.
 23. Shestakova MV, Vikulova OK. Biosimilars: presumption of «guilt». *Saharny diabet* 2011; (4): 91–9 (in Russian).
 24. Klimontov VV, Myakina NE. Biosimilar insulin analogues: what we need to know about them. *Effektivnaya farmakoterapiya* 2015; 1(7): 28–34 (in Russian).
 25. EGA. Handbook on biosimilar medicines. 2012.
 26. Guidelines on evaluation of similar biotechnological products (SBPs). Annex 2. WHO Technical Report Series № 977, 2013.
 27. US Food and Drug Administration. Background information: lists of licensed biological products with reference product exclusivity and biosimilarity or interchangeability evaluations. 2014. Available from: <http://www.fdagov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/ucm411424.htm>.
 28. Niederwieser D, Schmitz S. Biosimilar agents in oncology–haematology: from approval to practice. *Eur J Haematol.* 2011; 86(4): 277–88.
 29. Mellstedt H. Clinical considerations for biosimilar antibodies. *EJC Suppl.* 2013; 11(3): 1–11.
 30. Biological preparations. Position of the Russian Association of Endocrinologists. *Saharny diabet* 2013; (3): 121–2 (in Russian).
 31. Shangin IV, Smirnov AS, Schneider AA. Interchangeability of drugs in Russia: problems and prospects. *Sovremennaya organizatsiya lekarstvennogo obespecheniya* 2013; (3): 10–18 (in Russian).
 32. Vasilenko IA. Interchangeability of drugs: comparative aspects. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* 2014; 1(3): 146–52 (in Russian).
 33. Scott DL, Kingsley G. Clinical effectiveness of biologics in clinical practice. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12(2): 115–6.
 34. Mitchell P, Korobelnik P, Lanzetta P, Holz FG, Prunte C, Schmidt-Erfurth U, et al. Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials. *Br J Ophthalmol.* 2010; 94(1): 2–13.
 35. Pełka M, Broniarczyk-Dyła G. Zastosowanie leków biologicznych w dermatologii. *Post Dermatol Alergol.* 2007; 24(1): 35–41.
 36. Shankar S, Handa R. Biological agents in rheumatoid arthritis. *J Postgrad Med.* 2004; 50: 293–9.
 37. Gouw SC, van der Born JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgård U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007; 109(11): 4693–7.
 38. Richter B, Neises G, Bergerhoff K. Human versus animal insulin in people with diabetes mellitus: a systematic review. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002; 31: 723–49.
 39. Belousov DYU. Biosimilars — how are they similar? *Kachestvennaya klinicheskaya praktika* 2006; (2): 80–3 (in Russian).
 40. Ermolenko VM, Filatova NN, Mihaylova NA, Hasabov NN. Recombinant human erythropoietin: original drugs and biosimilars. *Klinicheskaya nefrologiya* 2012; (2): 4–8 (in Russian).
 41. Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Medunitsyn NV, Kiselevsky MV, Lysikova SL, et al. The aspects of biosimilar marketing approval process. *Biopreparaty* 2014; (4): 24–36 (in Russian).
 42. World Health Organization. Regulatory expectations and risk assessment for biotechnological products. WHO/RRA BT DRAFT/24 January 2014. Available from: http://www.who.int/biologicals/WHO_Risk_Assessment_for_Biotechnological_Products_1st_PC_24_Jan_2014.pdf.
 43. Owens DR, Landgraf W, Schmidt A, Bretzel RG, Kuhlmann M. The emergence of biosimilar insulin preparations — a cause for concern? *Diab Technol Ther.* 2012; 14: 989–96.
 44. Joshi SR. Biosimilar peptides: need for pharmacovigilance. *J Assoc Phys India* 2011; 59: 44–7.
 45. Kuhlmann MK, Schmidt A. Production and manufacturing of biosimilar insulins: implications for patients, physicians, and health care systems. *Biosimilars* 2014; (4): 45–58.
 46. Friedrichs A, Bohnet J, Korger V, Adler S, Schubert-Zsilavecz M, Abdel-Tawab M. Dose Accuracy and Injection Force of Different Insulin Glargine Pens. *J Diabetes Sci Technol* 2013; 7(5): 1346–53.
 47. Policy statement: Clarifying the appropriate regulatory pathway for subsequent entry low molecular weight heparins. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/brgtherap/applic-demande/guides/lmwh-pol-3_hfmm-eng.php.
 48. Guidance for sponsors: Information and Submission Requirements for Subsequent Entry Biologics (SEBs). Published by authority of the Minister of Health. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/brgtherap/applic-demande/guides/seb-pbu/seb-pbu_2010-eng.php.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky Boulevard, 8-2, Moscow, 127051, Russian Federation.

Soldatov AA. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences.

Avdeeva ZhI. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Olefir YuV. Director General. Doctor of Medical Sciences.

Merkulov VA. Deputy Director General for the expertise of drugs. Doctor of Medical Sciences, professor.

Bondarev VP. Director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов: *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*

Е. Н. Сятчихина, П. А. Набатников, С. А. Коровкин, А. В. Катлинский, Г. М. Игнатьев

ООО «ФОРТ» (Биофармацевтическая компания ФОРТ), Москва, Россия

Поступила 06.04.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

Представлены результаты работы по выделению и изучению биологических свойств бактериофагов, активных по отношению к бактериям родов *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. Показаны результаты исследований по изучению: литической активности, определению спектра литического действия, анализу чувствительности к повреждающим факторам внешней среды: значению pH, температуре, лиофильному высушиванию. Приведены данные молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: бактериофаги; производство бактериофагов; литическая активность.

Библиографическое описание: Сятчихина ЕН, Набатников ПА, Коровкин СА, Катлинский АВ, Игнатьев ГМ. Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов: *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 90–95.

Интенсивно растущая антибиотикорезистентность микроорганизмов, способствующая увеличению числа гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений различной локализации, и требующая значительных финансовых затрат антибактериальная терапия диктует необходимость поиска новых эффективных способов и средств воздействия на штаммы с множественной лекарственной устойчивостью [1–3].

Несмотря на интенсивную работу фармацевтических компаний, за последние 30 лет не было найдено новых классов антибиотиков. В связи с этим, в настоящее время идет поиск других подходов к решению этой проблемы. Одним из результатов такого поиска является вновь возникший интерес к возможностям терапевтического использования бактериофагов – вирусов, характеризующиеся специфической способностью к избирательному инфицированию бактериальных клеток, принадлежащих к одному штамму или антигенно-гомологичным штаммам одного вида или рода [4–6].

Помимо терапевтического применения бактериофагов, эффективность которых подтверждена клиническими исследованиями и данными в практической медицине, фаги используются для обработки хирургических помещений, медицинского инструментария и оборудования; на предприятиях пищевой промышленности: полуфабрикатов и готовой продукции, а также непосредственно человеком в виде пищевых добавок, лечебных препаратов, гелей и мазей [7–10].

При местном использовании фаги имеют особое преимущество в том, что они продолжают размножаться до тех пор, пока присутствует инфекция, в противоположность им концентрация антибиотиков быстро снижается по мере удаления от поверхности [11]. В. R. Levin и J. J. Bull предлагают использование фаговой терапии только для снижения уровня микробной обсемененности в очаге ин-

фекции, тем самым помогая защитным силам организма справиться с инфекционным процессом [12, 13].

Возможность применения бактериофагов в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и практическом здравоохранении связана с изучением их биологических свойств на соответствие ряду требований:

- 1) в состав препарата должны быть включены строго вирулентные бактериофаги с широким спектром литического действия, обуславливающие полный лизис бактериальных штаммов. В геноме бактериофагов не должно содержаться детерминант генов токсинов или факторов вирулентности;
- 2) препарат бактериофагов должен быть безопасным и не содержать компонентов бактериальных клеток и эндотоксинов;
- 3) препарат должен содержать фаги в высоком титре и сохранять литическую активность в течение заявленного срока годности;
- 4) препарат должен содержать несколько видов бактериальных вирусов, отличающихся особенностью взаимодействия с бактериальной клеткой. Использование такого подхода значительно снижает возможность возникновения факторезистентных форм в популяции патогенных микроорганизмов [14–17].

Таким образом, лечебный препарат должен представлять собой комбинацию различных бактериальных вирусов, отобранных по вышеуказанным критериям. Соответствие бактериофагов установленным требованиям позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для включения в терапевтические препараты [18].

Цель исследования — формирование производственной коллекции бактериофагов бактерий видов *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, энтеропатогенные *Escherichia coli*; изучение основных биологических свойств.

Материалы и методы

Выделение бактериальных культур проводили из клинических образцов бактериологических диагностических лабораторий, стационаров лечебных учреждений Москвы и Московской области, стоки животноводческих хозяйств Калужской области в течение 2012–2014 гг. Коллекцию бактериальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* формировали из штаммов, выделенных из клинического материала, от больных с тяжелыми формами заболевания, плохо поддающимися антибиотикотерапии, полученного из различных лечебных учреждений: НИИ нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко, инфекционная клиническая больница № 1 и № 3, консультационно-диагностический центр института МНИИЗМ им. Г. Н. Габричевского (Москва), Центральные районных больниц (Московская область, Санкт-Петербург, Надым).

При отборе производственных бактериальных штаммов учитывали соответствие их культуральным и морфологическим свойствам каждого вида. Биохимическое сходство видовым признакам проводили с помощью биохимической тест-системы API 20E, («BIOMERIEUX», Франция).

Лизогенное состояние бактериальных штаммов определяли методом индукции профага, посредством добавления в культуру митомицина С и облучения коротковолновой ультрафиолетовой лампой. Спонтанно лизировавшиеся бактериальные штаммы выбраковывали.

Оценку чувствительности штаммов к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузионным методом (по Keurby-Bauer). В антибиотикограмму были включены доксициклин, левомицетин, ципрофлоксацин, пefлоксацин, норфлоксацин, меропенем, имипенем, цефуроксим, гентамицин, тобрамицин, амикацин, ванкомицин, ампициллин, ампициллин/сульбактам.

Источником штаммов бактериофагов являлись сточные воды и клинический материал Московской и Челябинской областей. Клебсиеллезные бактериофаги выделяли из клинического материала (промывные воды интубационных и дренажных трубок, аппаратов искусственной вентиляции легких, перевязочные средства из отделения гнойной хирургии, мазки гнойного отделяемого из ран), проб сточных вод из канализационной системы и очистных сооружений, проб стоков животноводческих комплексов, проб воды из природных водоемов.

Исследуемый материал засеивали с бактериальными культурами штаммов-хозяев в питательный бульон Луриа-Бертани (LB): Nutrient Broth (NB) («HIMEDIA», Индия

или псевдомонадный бульон на основе пептона. После инкубации, обработки 1% хлороформом и удалением клеточного дебриса низкоскоростным центрифугированием, количество фаговых частиц в надосадочной жидкости определяли методом Грация на индикаторных культурах. Штаммы, дающие негативные зоны в разведениях выше 1/100, считали чувствительными и рекомендовали к включению в производственную коллекцию.

Для проведения рестрикционного анализа ДНК из фаговых частиц выделяли посредством разрушения протеиназой К в растворе SDS. Экстракции фаговой ДНК проводили смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (24:24:1) с последующим переосаждением этиловым спиртом. Препараты выделенной ДНК контролировали электрофоретически в агарозном геле в трис-борат-EDTA буфере. После определения концентрации полученной ДНК на спектрофотометре Genesys 6 UV-Visible («Thermo Scientific») проводили гидролиз различными эндонуклеазами рестрикции, посредством метода электрофореза в 0,8–1,2%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере. Визуализацию проводили после окрашивания агарозных гелей в растворе бромистого этидия. Для документирования полученных результатов использовали систему DOCPRINT («Vilber Lourmat»).

Изучение геномной ДНК бактериофагов и их штаммов-хозяев проводили методом ПЦР с праймерами на гены ряда бактериальных токсинов, в том числе гены шига-подобных токсинов I и II типов, термостабильного и термолабильного энтеротоксинов. Детекцию генов вирулентности проводили с помощью ПЦР в классическом режиме и в режиме «реального времени». Структура праймеров представлена в таблице 1.

ПЦР в режиме «реального времени» реализовывали в виде двух мультиплексных реакций. В первой реакции комбинировали праймеры и зонды на гены термолабильного и термостабильного токсинов (lt и st соответственно). Во второй реакции комбинировали праймеры и зонды на гены шига-подобных токсинов stx1 и stx2. Регистрацию результатов амплификации проводили по каналам FAM и ROX. Амплификатор CFX96 («BIO-RAD», США).

Для выявления генов синтеза цито- и энтеротоксинов в геноме производственных бактериальных штаммов также использовали метод ПЦР в режиме «реального времени».

ДНК бактериальных штаммов *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* и *K. pneumoniae* выделяли методом термического лизиса из агаро-

Таблица 1. Праймеры и зонды, использованные в ПЦР-РВ для детекции генов вирулентности

Праймеры, зонды	T_m , °C	Нуклеотидная последовательность	Ген-мишень
stx1F stx1R stx1Probe	60	5'-TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG-3' 5'-CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC-3' 5'-CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA-3'	Ген шига-подобного токсина типа I
stx2 F stx2 R Stx2Probe	60	5'-TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG-3' 5'-CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC-3' 5'-TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3'	Ген шига-подобного токсина типа II
lt F lt R lt-Probe	56	5'-ATTAAgAgCggCgAAAC-3' 5'-CTCGGTCAGATATGTGATTC-3' 5'-TgTgTCCTTCATCCTTTCAATggC-3'	Ген термолабильного энтеротоксина
st F st R st-Probe	56	5'-TTTCAATgCAAATATCATCgAg-3' 5'-CTTCTgTgTTTgCAATCTTg-3' 5'-TCATTgCCCACAgATACAACggA-3'	Ген термостабильного энтеротоксина

вой культуры и исследовали в ПЦР-РВ со специфическими праймерами и зондами.

Лиофильное высушивание бактериофагов проводили в течение 24 ч на сублимационном оборудовании (EPSILON 2-60, «CHRIST», Германия), предварительно добавив в фаголизаты защитную среду: сахароза 20%, желатин 2%.

В качестве физического фактора изучали действие на фаги высокой температуры. В качестве химического фактора — действие pH.

Устойчивость фагов к температуре определяли по следующей методике: фаголизаты по 50 мкл в герметичных пробирках типа Эппендорф инкубировали 3 ч при комнатной температуре (25°C); в морозильной камере бытового холодильника (минус 20°C) и в твердотельном термостате (65°C). Титр фагов определяли по методу Грация на газонах чувствительных штаммов.

При определении устойчивости фагов к действию pH среды использовали: а) 0,1 М цитратный буфер, pH 3,6; б) 0,1 М карбонатный буфер, pH 9,6; в) фаговый SM буфер, pH 8,0 (контроль).

К 0,9 мл буфера добавляли 0,1 мл фаголизата. Инкубировали при комнатной температуре. Через 15 мин и через 1 ч отбирали пробы по 0,1 мл и вносили их в пробирки с 0,9 мл фагового SM буфера для нейтрализации pH. Быстро перемешивали и определяли титр бактериофагов титрованием по методу Грация на индикаторных культурах.

Результаты и обсуждение

Одним из первых этапов исследований, связанных с выделением и характеристикой вирусов бактерий, является создание репрезентативной коллекции бактериальных штаммов — хозяев бактериофагов.

В процессе исследований были созданы рабочие коллекции штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (45 штаммов), *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris* (39 штаммов), *Staphylococcus epidermidis* (24 штамма), *Staphylococcus aureus* (41 штамм), *Klebsiella pneumoniae* (47 штаммов) и *Escherichia coli* (33 штамма).

В результате проведенных экспериментов установлено, что исследованные изоляты характеризуются типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

При оценке бактериальных штаммов на содержание профага было показано, что более 50% свежесделанных штаммов *Ps. aeruginosa* и *S. aureus* оказались лизогенными. В 20% штаммов *E. coli* в результате обработки митомцином С также индуцируется выход профага.

Анализ антибиотикограмм к тестируемым препаратам выявил наличие чувствительности штаммов *E. coli* M2 к широкому спектру антибиотиков. Из 13 испытанных антибактериальных препаратов штамм оказался устойчивым только к ванкомицину и слобочувствительным к левомицетину и амикацину.

Штаммы *P. mirabilis* M3 и *P. vulgaris* M10 устойчивы к доксициклину, левомицетину, ванкомицину и ампициллину. Штамм *Ps. aeruginosa* 3093 устойчив к доксициклину, левомицетину, ванкомицину, ампициллину, ампициллин/сульбактаму, цефуроксиму.

Штаммы *S. epidermidis* № 3 и *S. aureus* 2072 устойчивы только к ванкомицину. Штамм *S. aureus* 2075 устойчив к ванкомицину, тобрамицину, гентамицину. Штамм *S. saprophyticus* № 1 устойчив к левомицетину, пefлоксацину, ципрофлоксацину, норфлоксацину, ванкомицину.

Большинство выделенных культур имеют множественную лекарственную устойчивость именно к тем антибиотикам, которые рекомендованы при лечении заболеваний, вызванных клебсиеллами (бета-лактамы, карбопены и цефалоспорины последних поколений и др.). В геноме клебсиеллезных бактерий нескольких штаммов (например, штаммы 2182, 2184, В-71, В-697-2, В-1956, i-6208) выявлены гены бета-лактамаз разного типа, обуславливающих устойчивость к антибиотикам групп бета-лактамов, карбопенемов и цефалоспоринов, что крайне ограничивает перечень антибиотиков, пригодных для лечения больных с такой инфекцией. Наличие в коллекции таких штаммов позволяет целенаправленно искать бактериофаги, эффективные при заболеваниях, вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью.

Кроме того, были выделены штаммы *K. pneumoniae* с «гипермукоидным» фенотипом, способные вызывать заболевания, характеризующиеся крайне тяжелым течением и низкой эффективностью обычных методов лечения (например, штамм i6208).

Все производственные и контрольные штаммы бактерий лиофильно высушены и депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболонск».

Бактерии из сформированной коллекции были использованы для выделения, наработки и оценки активности новых специфических бактериофагов.

Создание производственной коллекции вирулентных бактериофагов проводили на основании результатов, полученных при изучении литического спектра фагов, способности нарабатываться в жидкой среде, урожайности, литической активности в отношении гомологичных и гетерологичных бактериальных штаммов, а также данных молекулярно-генетического анализа.

Бактериофагу *Escherichia coli*

Для формирования фагового «коктейля» были выделены три *E. coli*-специфичных фага, получивших наименование ЕсП, Ес8 и Ес12. На газонах чувствительных культур бактериофаги образуют прозрачные зоны лизиса диаметром около 1 мм. При оценке спектра литического действия бактериофагов ЕсП, Ес8 и Ес12 с использованием 33 штаммов *E. coli* была выявлена чувствительность, составляющая 72,7, 69,7 и 60,6% соответственно.

Следует отметить, что бактериофаги Ес8 и Ес12 способны лизировать шигатоксин продуцирующие штаммы (STEC) серотипов O114 (eae+stx2+) и O128 (eae+stx1+stx2+), отнесенные во вторую группу патогенности.

Бактериофагу *Pseudomonas aeruginosa*

В состав производственных бактериофагов *P. aeruginosa* включены фаги РаК4, РаК8 и Ра26. Бактериофаги образуют прозрачные зоны лизиса диаметром 2–3 мм на бактериальных газонах 40, 31 и 51% исследованных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* соответственно.

Бактериофагу *Staphylococcus epidermidis*

Методом обогащения выделены бактериофаги Sep3 и Sep28, обладающие широким спектром литического действия. Эти фаги формируют негативные колонии на культурах 50,0 и 45,8% исследованных штаммов *S. epidermidis*.

Бактериофагу *Staphylococcus aureus*

При исследовании 37 клинических и природных образцов выделено три новых бактериофага SCH6, StA37 и StAK2, которые наряду с вышеописанными бактериофагами рассматриваются для включения в состав комплексных антибактериальных препаратов. Оценка спектра литического действия выделенных бактериофагов проводили на панели, включающей 41 штамм *S. aureus*.

На газоне чувствительной культуры бактериофаги StAK2, SCH6 и StA37 формируют прозрачные негативные колонии до 2 мм в диаметре без ореола.

Как следует из проведенных исследований, выделенные бактериофаги лизируют 70–75% штаммов *Staphylococcus aureus*.

Бактериофагу *Klebsiella pneumoniae*

Для выделения бактериофагов и характеристики их литического спектра использовали рабочую коллекцию из 47 штаммов *K. pneumoniae*.

При исследовании первичного материала были выделены 17 клебсиеллезных бактериофагов, среди которых отобрали три бактериофага KP5030, KPV831 и KPV21.

Согласно представленным данным, бактериофаги KP5030, KPV831 и KPV21 лизируют 46,8, 27,6 и 38,3% бактериальных штаммов соответственно.

В качестве материала для молекулярно-генетических исследований методом рестрикционного анализа использовали 11 препаратов ДНК вновь выделенных бактериофагов, специфичных к *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Proteus mirabilis* (2), *Proteus vulgaris* (2), *Staphylococcus epidermidis* (1), *Staphylococcus aureus* (2), *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* (2).

В результате проведенных экспериментов установлено, что в лизатах исследованных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (2184, 5021, 5030 5043, B-697-2, B-71), *Staphylococcus aureus* (2072, 2073, 2042, 2074, 2075), *Staphylococcus epidermidis* (4, 5, 68, 76, B331), *Pseudomonas aeruginosa* (3076, 3092, 3095, 3096, 3093), *Proteus* (M5, M8, M10, M28, M30; M32, M33, M34, M35, M37) и *Escherichia coli* (M2, M14, M7, M19, M22) специфические участки генов токсинов stx1, stx 2, lt, st не выявляются. Олигонуклеотидные праймеры и зонды представлены в таблице 1.

Таким образом, было показано отсутствие генов, детерминирующих синтез шига-подобных токсинов Stx1 и Stx2 (термолabile) и термостабильного энтеротоксина, также в геномах исследованных бактериофагов.

Для генетического картирования ДНК бактериофагов использовали эндонуклеазы рестрикции, расщепляющие нуклеотидные последовательности длиной 6–8 нуклеотидов с различным GC-составом.

В таблице 2 суммированы данные по рестрикционному анализу ДНК всех бактериофагов, отобранных в качестве производственных.

Изучение чувствительности перспективных фагов к повреждающим факторам внешней среды

В экспериментах по изучению влияния температуры на бактериофаги установлено, что к снижению титра всех исследуемых фагов приводит инкубация их при температуре 65°C (табл. 3). Наиболее термолabileн бактериофаг StAK2 *S. aureus* в условиях температуры, равной 65°C.

В экспериментах по изучению чувствительности бактериофагов к pH среды установлено, что титр исследуемых бактериофагов, за исключением фага Sep3, практически не меняется в случае инкубирования при значениях pH от 3 до 9 в течение 1 ч. Бактериофаг Sep3 инактивируется при инкубировании в буферном растворе при pH 3,0. Через 15 мин инкубации в этих условиях фаг полностью утрачивает литическую активность по отношению к тест-штамму.

Таблица 2. Рестрикционный анализ ДНК бактериофагов

Бактерии, чувствительные к бактериофагу	Бактериофаг	Рестриктазы, дающие специфические картины гидролиза	Отсутствие гидролиза
<i>P. aeruginosa</i>	Pa26	<i>EcoRI</i> , <i>KspAI</i> , <i>NdeI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>HindIII</i>	<i>LguI</i> , <i>BamHI</i>
	PaK4	<i>NdeI</i> , <i>ScaI</i> , <i>AanI</i> , <i>EcoRI</i>	<i>LguI</i>
	PaK8	<i>ScaI</i> , <i>EcoRI</i>	<i>AanI</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KPV21	<i>EcoRV</i> , <i>HindIII</i> , <i>ScaI</i>	<i>ScaI</i> , <i>LguI</i>
	KPV831	<i>EcoRV</i> , <i>HindIII</i> , <i>LguI</i> , <i>ScaI</i>	<i>ScaI</i>
	K5030	<i>AanI</i> , <i>EcoRI</i>	<i>LguI</i> , <i>KpnI</i>
<i>E. coli</i>	EcП	<i>KspAI</i> , <i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>LguI</i>
	Ec8	<i>AanI</i> , <i>SmaI</i>	<i>ScaI</i> , <i>LguI</i> , <i>Eco105I</i> , <i>Bst1107I</i> , <i>EcoRI</i> , <i>KspAI</i>
	Ec12	<i>AanI</i> , <i>SmaI</i>	<i>ScaI</i> , <i>LguI</i> , <i>Eco105I</i> , <i>Bst1107I</i> , <i>EcoRI</i> , <i>KspAI</i>
<i>S. aureus</i>	SCH6	<i>EcoRV</i> , <i>EcoRI</i> , <i>KspAI</i> , <i>NdeI</i>	<i>HindIII</i> , <i>LguI</i>
	Sta37	<i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> , <i>KspAI</i> , <i>NdeI</i>	<i>LguI</i>
	StAK2	<i>ScaI</i> , <i>AanI</i> , <i>EcoRI</i>	<i>KpnI</i>
<i>S. epidermidis</i>	Sep28	<i>ScaI</i>	<i>EcoRV</i> , <i>LguI</i>
	Sep3	<i>ScaI</i> , <i>EcoRI</i>	<i>Bst1107I</i>
<i>Pr. vulgaris</i>	Pv2	<i>KspAI</i> , <i>ScaI</i>	<i>EcoRV</i> , <i>HindIII</i> , <i>LguI</i>
	Pv4	<i>KspAI</i> , <i>ScaI</i>	<i>EcoRV</i> , <i>LguI</i>
	Pv1	<i>ScaI</i> , <i>AanI</i> , <i>EcoRI</i>	<i>Bst1107I</i>
<i>Pr. mirabilis</i>	Pm9	<i>HindIII</i> , <i>ScaI</i> , <i>LguI</i>	<i>EcoRV</i>
	Pm10	<i>ScaI</i> , <i>LguI</i>	<i>BamHI</i>
	Pm3	<i>ScaI</i> , <i>AanI</i> , <i>EcoRI</i>	<i>Bst1107I</i>

Таблица 3. Влияние температуры на стабильность бактериофагов

№ п/п	Бактериофаг	Бактериальный тест-штамм	Титр фага, БОЕ/мл		
			25°C	-20°C	65°C
1	PaK8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 175	$5 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^3$
2	Pm3	<i>Proteus mirabilis</i> M32	$6 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^4$
3	Pv 1	<i>Proteus vulgaris</i> M10	$5 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^4$
4	StAK2	<i>Staphylococcus aureus</i> 2072	$5 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	0
5	Sep3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 3	$5 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^4$
6	KP5030	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5030	$3 \cdot 10^{10}$	$2,6 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^7$

В результате проведенной работы по лиофилизации бактериофагов и определению титров бактериальных вирусов после лиофильного высушивания показано, что наиболее стабильными при лиофилизации оказались бактериофаги KP5030 (*Klebsiella pneumoniae* 5030), StaK2 (*Staphylococcus aureus* 2072) и Sep3 (*Staphylococcus epidermidis* 3), титры которых после лиофилизации практически не изменились. Бактериофаги PaK8 (*Pseudomonas aeruginosa* 175) при лиофилизации снижают литическую активность в 10–100 раз. В случаях Pm3 (*Proteus mirabilis* M32), Pv1 (*Proteus vulgaris* M10) наблюдается снижение титра фагов после лиофилизации на четыре порядка.

В качестве заключения...

Становится очевидным, что настало время для более внимательного рассмотрения потенциала фаготерапии как через поддержку новых исследований, так и через тщательное изучение уже доступных данных. Как заключают Barrow и Soothill «Фаготерапия может быть очень эффективна, и в определенных условиях имеет уникальные преимущества перед антибиотиками» [6].

На основании полученных данных установлено, что для достижения поставленной цели по формированию производственной коллекции бактериофагов и штаммов-хозяев необходимо придерживаться определенных критериев: каждый микроорганизм, перспективный для включения в коллекцию, должен быть тщательно изучен по показателям: биологические свойства и молекулярно-генетический анализ структуры генетического материала.

Проведенные исследования позволили установить, что выделенные бактериофаги обладают литической активностью к индикаторным культурам, которая изменяется при воздействии таких факторов, как температура, лиофильное высушивание, воздействие водородного показателя.

В заключение следует отметить, что важным моментом является сохранение соответствия препаратов бактериофагов этиологической структуре возбудителей инфекционных заболеваний, достигаемой за счет постоянной адаптации бактериофагов к циркулирующим, а также резистентным штаммам. Для этого необходимо обновление входящих в препарат рас бактериофагов, лизирующих вновь возникающие фагоустойчивые клоны возбудителей. Значительным условием, обеспечивающим эффект фаготерапии, является изолирование бактериального штамма, определение чувствительности выделенного штамма к препарату, либо индивидуальный подбор фага для лечения [19–23].

Научные исследования проводились при финансовой поддержке ООО «ФОРТ» на базе ФБУН ГНЦ ПМБ п. Оболеск.

Выражаем глубокую благодарность за выполнение работы коллективу лаборатории молекулярной биологии: канд. биол. наук В. В. Вережкину, канд. биол. наук В. М. Красильниковой, В. А. Баннову, В. П. Мякининой, В. П. Левчуку, заведующему лабораторией канд. биол. наук Н. В. Воложанцеву и заведующему отделом д-ру вет. наук, проф. Э. А. Светочу.

Литература

1. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and phage-derived proteins-application approaches. *Curr Med Chem*. 2015; **22**(14): 1757–73.
2. Косинец АН, Фролова АВ, Булавкин ВП, Окулич ВК. Антибиотикорезистентность. Новые возможности антибактериального воздействия. *Вестник ВГМУ* 2014; (2): 70–7.
3. Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Virol*. 2015; **89**(15): 7449–56.
4. Адамс М. Бактериофаги. М.: Иностранная литература; 1961.
5. Levin B, Bull JJ. Phage Therapy Revisited: The Population Biology of a Bacterial Infection and its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. *The American Naturalist* 1996; **147**: 881–98.
6. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of the potential. *Trends Microbiol* 1997; **5**: 268–71.
7. Алешкин АВ, Воложанцев НВ, Светоч ЭА и др. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов. *Астраханский медицинский журнал* 2012; **7**(3): 31–9.
8. Хайруллин И. Н. Роль микрофлоры хирургического отделения в развитии послеоперационных осложнений хирургических ран и их коррекция с помощью бактериофагов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Казань; 2004.
9. Крулова ЛС. Поливалентные бактериофаги: перспективы применения в дерматологии. *Клиническая дерматология и венерология* 2015; (1): 72–6.
10. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Glenn Morris J. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**(3): 649–59.
11. Кюттнер Э. Фаговая терапия: бактериофаги как антибиототики. СПб.; 2001.
12. Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol*. 2004; **2**(2): 166–73.
13. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol*. 2006; **296**(1): 5–14.
14. Зурабов АЮ, Каркищенко НН, Попов ДВ, Жиленьков ЕЛ, Попова ВМ. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов. *Биомедицина* 2012; (1): 134–8.
15. Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*. 2007; **29**: 995–1003.
16. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyayama K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; **64**: 270–4.
17. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Harald Brüssow H. In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia coli* Phages: Implications for Phage Therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; **48**: 2558–69.
18. Дарбеева ОС, Майская ЛМ, Обухов ЮИ. Доклинические исследования бактериофагов. В кн.: Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть II. М.: Гриф и К; 2012. С. 237–40.
19. Thiel K. Old dogma, new tricks — 21st Century phage therapy. *Nat Biotechnol*. 2004; **22**(1): 31–6.
20. Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol*. 2011; **14**(5): 524–31.
21. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol*. 1997; **5**(7): 268–71.
22. Тикунова НВ, Власов ВВ. Бактериофаги — враги наших врагов. *Наука из первых рук* 2013; **2**(50): 58–69.
23. Бондаренко ВМ. Новые горизонты бактериофагии. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН* 2013; (4): 1.

Об авторах

ООО «ФОРТ» (Биофармацевтическая компания ФОРТ). Российская Федерация, 127254, Москва, ул. Добролюбова, 3, стр. 1.

Сятчихина Евгения Николаевна. Микробиолог отдела разработки МИБП.

Набатников Павел Алексеевич. Начальник отдела разработки МИБП.

Коровкин Сергей Анатольевич. Заместитель генерального директора, д-р мед наук, профессор.

Катлинский Антон Викентьевич. Генеральный директор, д-р биол. наук.

Игнатъев Георгий Михайлович. Заместитель генерального директора по науке, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Сятчихина Евгения Николаевна; 993994@mail.ru

Selection criteria for bacterial strains and bacteriophages for the formation of industrial collection of specifically lysing bacteria: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*

E. N. Siatchikhina, P. A. Nabatnikov, S. A. Korovkin, A. V. Katlinsky, G. M. Ignatyev

«FORT» LLC (Biopharmaceutical company FORT), Moscow, Russia

The present article submits the results of work on the isolation and study of biological properties of bacteriophages, active against *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. It also shows the results of the study such as: lytic activity, the definition of the spectrum of lytic action, sensitivity to damaging environmental factors: pH, temperature, freeze drying. The data of molecular genetic studies are provided.

Key words: bacteriophages; bacteriophage production; lytic activity.

For citation: Siatchikhina EN, Nabatnikov PA, Korovkin SA, Katlinsky AV, Ignatyev GM. Selection criteria for bacterial strains and bacteriophages for the formation of industrial collection of specifically lysing bacteria: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 90–95.

References

1. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and phage-derived proteins-application approaches. *Curr Med Chem*. 2015; **22**(14): 1757–73.
2. Kosinets AN, Frolova AV, Bulavkin VP, Okulich VK. Antibiotic resistance. New features of the antibacterial effects. *Vestnik VGMU* 2014; (2): 70–7 (in Russian).
3. Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Virol*. 2015; **89**(15): 7449–56.
4. Adams M. Bacteriophages. Moscow: Inostrannaya literatura; 1961 (in Russian).
5. Levin B, Bull JJ. Phage Therapy Revisited: The Population Biology of a Bacterial Infection and its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. *The American Naturalist* 1996; 147: 881–98.
6. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of the potential. *Trends Microbiol* 1997; 5: 268–71.
7. Aleshkin AV, Volozhantsev NV, Svetoch EA, et al. Bacteriophages and means probiotics and decontamination of food products. *Ast-rahanskiy meditsinskiy zhurnal* 2012; **7**(3): 31–9 (in Russian).
8. Khairullin IN. The role of the microflora in the surgical department in the development of postoperative complications of surgical wounds and their correction by means of bacteriophages. *Cand. Med. Sci [thesis]*. Kazan; 2004 (in Russian).
9. Kruglova LS. Polyvalent bacteriophages: prospects for application in dermatology. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya* 2015; (1): 72–6 (in Russian).
10. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Glenn Morris J. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**(3): 649–59.
11. Kutter E. Phage therapy: bacteriophages as antibiotics. *St. Petersburg; 2001* (in Russian).
12. Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol*. 2004; **2**(2): 166–73.
13. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol*. 2006; **296**(1): 5–14.
14. Zurabov AY, Karkischenko NN, Popov DV, Zhilenkov EL, Popov VM. Creating a national collection of bacteriophages and principles for the development of therapeutic and prophylactic phage preparations. *Biomeditsina* 2012; (1): 134–8 (in Russian).
15. Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*. 2007; 29: 995–1003.
16. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyana K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 64: 270–4.
17. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Harald Brüssow H. In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia coli* Phages: Implications for Phage Therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; 48: 2558–69.
18. Darbeeva OS, Mayskaya LM, Obuhov Yul. Preclinical studies of bacteriophages. In: Mironov AN, ed. *Guidelines for preclinical studies of drugs (immunobiological drugs). Part II*. Moscow: Grif i K; 2012. P. 237–40 (in Russian).
19. Thiel K. Old dogma, new tricks — 21st Century phage therapy. *Nat Biotechnol*. 2004; **22**(1): 31–6.
20. Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol*. 2011; **14**(5): 524–31.
21. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: re-discovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol*. 1997; **5**(7): 268–71.
22. Tikunova NV, Vlasov VV. Bacteriophages — the enemies of our enemies. *Nauka iz pervyh ruk* 2013; **2**(50): 58–69 (in Russian).
23. Bondarenko V. New horizons of bacteriophagy. *Bulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN* 2013; (4): 1 (in Russian).

Authors

Biopharmaceutical company «FORT», Dobrolyubova street, 3-1, Moscow, 127254, Russian Federation.

Syatchikhina EN. Microbiologist of Department of medical immunobiological medicines development.

Nabatnikov PA. Head of Department of medical immunobiological medicines development.

Korovkin SA. Deputy Director General. Doctor of Medical Sciences, professor.

Katlinsky AV. Director General. Doctor of Biological Sciences.

Ignatyev GM. Deputy General Director for science. Doctor of Medical Sciences, professor.

Получение рекомбинантного слитого белка OprF-aTox *Pseudomonas aeruginosa*, обладающего защитными свойствами

А. В. Солдатенкова, Н. А. Михайлова, Е. М. Зими́на, Е. И. Леонова, А. А. Калошин

Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Поступила 03.03.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

Получен рекомбинантный слитый белок OprF-aTox, который содержал последовательности белка F наружной мембраны (OprF) и дефектной формы экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*. Этот рекомбинантный белок был синтезирован в клетках *Escherichia coli* и очищен с помощью никель-сефарозы. Показано, что слитый рекомбинантный белок OprF-aTox при иммунизации обладал защитными свойствами от инфекции, вызываемой вирулентной токсигенной культурой *Pseudomonas aeruginosa* штамма PA-103.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; белок F наружной мембраны; экзотоксин A; анатоксин; слитый рекомбинантный белок OprF-aTox; иммунизация.

Библиографическое описание: Солдатенкова АВ, Михайлова НА, Зими́на ЕМ, Леонова ЕИ, Калошин АА. Получение рекомбинантного слитого белка OPRF-ATOX *Pseudomonas aeruginosa*, обладающего защитными свойствами. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 96–100.

Среди внутрибольничных гнойно-септических инфекций синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) стабильно занимает второе-третье место. Распространение данная инфекция получила из-за высокой неприхотливости микроорганизма к условиям внешней среды, а так же чрезвычайно высокой резистентности к большинству применяемых в клиниках антибиотиков и химиотерапевтических средств [1–3]. Кроме того, этот патоген является причиной серьезных патологий у больных муковисцидозом, генетическим заболеванием, сопровождающимся увеличением и сгущением секрета, что рано или поздно приводит к колонизации легких *P. aeruginosa*, с образованием биопленки [3, 4].

Нами рассматривается создание вакцинного антисинегнойного препарата на основе рекомбинантных белков, полученных в клетках *Escherichia coli*. Ранее был получен продуцент высокоиммуногенного порообразующего белка F наружной мембраны (OprF), который является консервативным для всех иммунотипов синегнойной палочки. Показано, что рекомбинантный белок OprF в результате иммунизации способствовал повышению выживаемости мышей, экспериментально зараженных нетоксигенным штаммом *P. aeruginosa* PA-170015 [5]. Так же, был получен и исследован рекомбинантный анатоксин (нетоксичный вариант экзотоксина A без 106 C-концевых аминокислотных остатков) [6]. Экзотоксин A, ингибирующий синтез белков в эукариотических клетках, является одним из основных факторов поражения *P. aeruginosa*, играя важную роль в разрушении тканей организма хозяина [7].

Целью настоящих исследований явилось слияние генов, кодирующих OprF и анатоксин, с получением рекомбинантного белка, способного вызывать иммунные реакции против мажорного поверхностного белка и экзотоксина A *P. aeruginosa*. Для достижения данной цели были поставлены и выполнены следующие задачи: встраивание генов, кодирующих OprF и анатоксин, в один плазмидный вектор для экспрессии в клетках *E. coli*; получение рекомбинантного белка; изучение специфичности и защитных свойств рекомбинантного белка.

Материалы и методы

С целью создания конструкций для экспрессии генов слитых белков использована плаزمид (pET28-atox), предназначенная для синтеза рекомбинантного анатоксина [6]. В эту конструкцию встраивали последовательность гена *oprF* в двух вариантах, который амплифицировали с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовали конструкцию для синтеза рекомбинантного белка OprF (pQE30-oprF) [5]. При амплификации первого варианта, праймеры имели на 5'-концах дополнительный сайт рестрикции *XhoI* (5'-GAT CTC GAG TAT GAA ACT GAA GAA CAC CTT AG и 5'-CAT CTC GAG CTT GGC TTC AGC TTC TAC), а при втором – использовали праймеры с сайтами рестрикции *HindIII* (5'-GAT AAG CTT ATG AAA CTG AAG AAC ACC TTA G и 5'-CAT AAG CTT TTA CTT GGC TTC AGC TTC TAC). Первый амплификат встраивали в плазмиду pET28-aTox по сайту *XhoI*, второй – по сайту рестрикции *HindIII*. Продукты лигирования использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21 (DE3). Клоны отбирали с помощью рестриктивного анализа и секвенирования. Секвенирование осуществляли при помощи прибора ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer («Applied Biosystems»).

Синтез рекомбинантных белков индуцировали с помощью изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), а очистку осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием никель-сефарозы («Amersham») в 8 М буферном растворе мочевины, в соответствии с предварительными исследованиями [5]. Препараты рекомбинантных белков переводили в нативное состояние в результате диализа против физиологического раствора. Определенные концентрации белков проводили в спектрофотометре Genesys 6 («Thermoscientific») при длине волны 280 нм. Белковые продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли. В иммуноблоттинге использовали сыворотки крови кроликов, иммунизированных рекомбинантным белком OprF и рекомбинантным анатоксином.

Для иммунизации рекомбинантные белки сорбировали на гидроксиде алюминия из расчета 1 мг Al(OH)₃ на

1 мг белка. Сорбцию проводили в течение 12 часов при температуре 4°C. Препараты вводили внутривенно в объеме 0,5 мл мышам, массой 16–18 г (филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА).

При индукции экспериментальной инфекции животных заражали внутривенно в объеме 0,5 мл живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* штамма PA-103, после чего в течение семи суток проводили учет погибших и выживших животных. ЛД₅₀, вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина-Воробьева:

$$ЛД_{50} = 10^{(lgA - lg2 \cdot (B_1/C_1 + B_2/C_2 + B_3/C_3 + B_4/C_4 + B_5/C_5 - 0,5))};$$

где *A* — максимальная инфекционная доза в опыте, *B* — количество животных, павших в группе, *C* — первоначальное количество животных в группе.

Высококислородный штамм PA-103 был любезно предоставлен для музея лаборатории протективных антигенов НИИВС имени И. И. Мечникова доктором Liu (США) [8].

Все работы с животными проводили в соответствии с положениями «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Результаты и обсуждение

Ранее нами получена плазмидная конструкция для синтеза в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) дефектной формы экзотоксина A *P. aeruginosa*. У рекомбинантного белка отсутствовали 106 С-концевых аминокислотных остатков, что привело к нарушению домена, отвечающего за цитотоксическую функцию [6]. Этот делеционный вариант гена *toxA*, кодирующий рекомбинантный анатоксин, в конструкции pET28-atox был расположен между сайтами рестрикции *Hind*III и *Xho*I (рис. 1А). Встраивание последовательности гена *oprF* осуществляли в двух вариантах.

В первом случае, ген *oprF* встраивали со стороны 3'-конца гена анатоксина, т.е. по сайту рестрикции *Xho*I. В результате получена конструкция pET28-atox-oprF, предназначенная для синтеза рекомбинантного слитого белка аТох-ОprF (рис. 1Б). Прямой праймер для амплификации данного варианта после сайта рестрикции содержал дополнительный нуклеотид (Т), который был необходим для восстановления открытой рамки считывания слитого гена.

Во втором случае, встраивание осуществлялось со стороны 5'-конца гена анатоксина, т.е. по сайту рестрикции *Hind*III, в результате чего была получена конструкция pET28-oprF-atox, предназначенная для синтеза реком-

бинантного слитого белка OprF-aTox (рис. 1В). В последовательности обратного праймера для ПЦР этого варианта гена *oprF* отсутствовал терминаторный кодон (ТАА).

После проведения экспрессии отобранных конструкций выявлено, что синтез слитого рекомбинантного белка в существенных количествах происходил только с использованием конструкции pET28-oprF-atox. Размер рекомби-

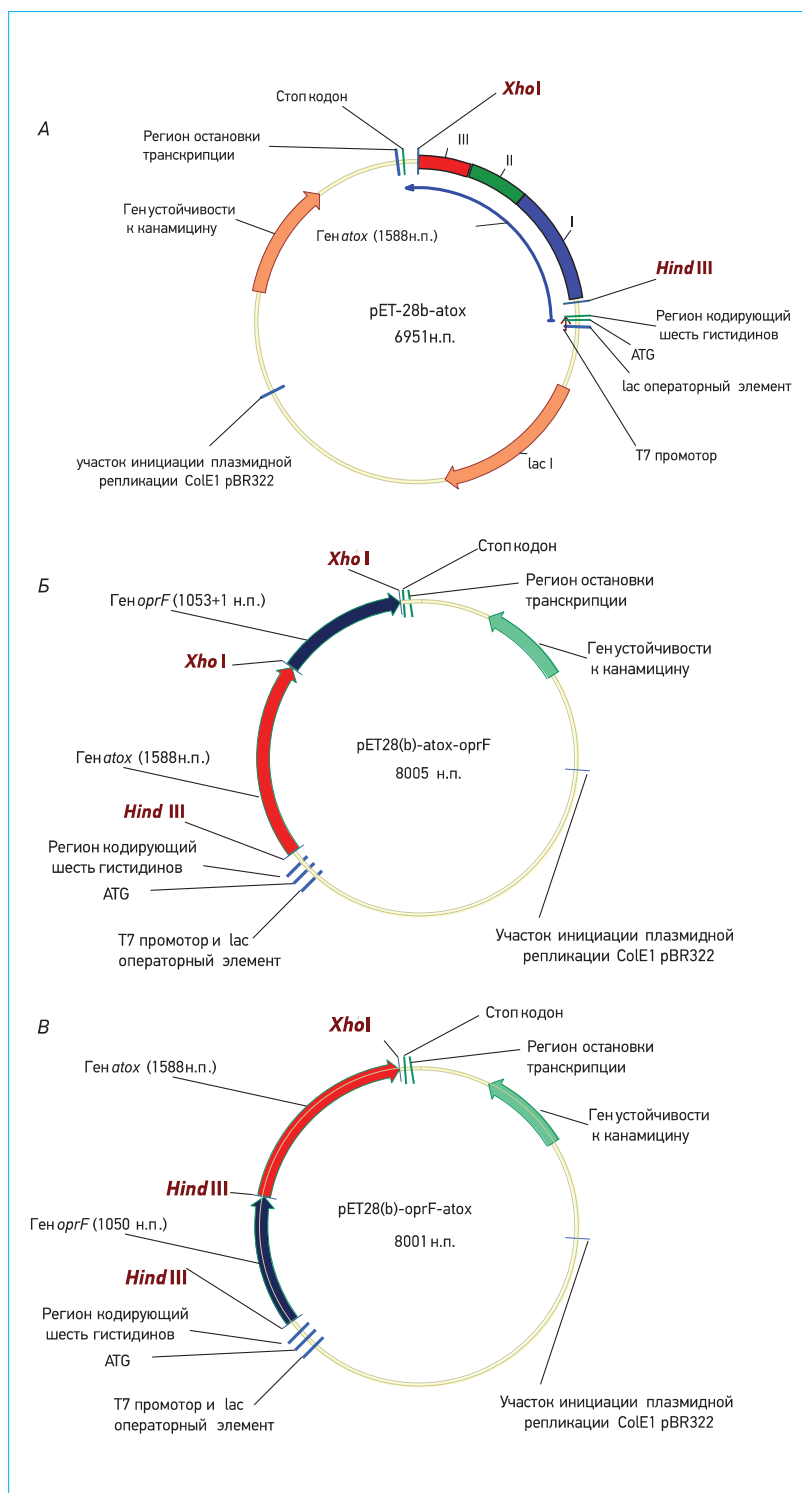


Рис. 1. Схема создания генно-инженерных конструкций для синтеза рекомбинантных слитых (гибридных) белков аТох-ОprF и OprF-аТох. А — pET28-atox; Б — pET28-atox-oprF; В — pET28-oprF-atox.

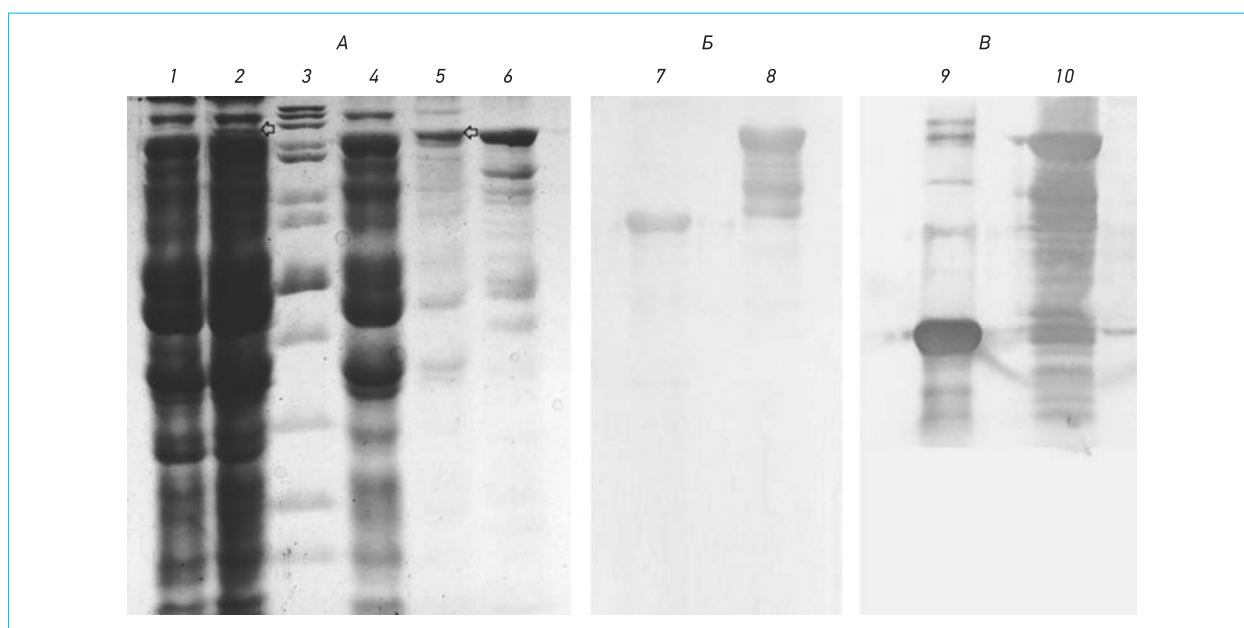


Рис. 2. Анализ белковых продуктов, полученных в результате экспрессии конструкций pET28-atox-oprF и pET28-oprF-atox в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). А — полиакриламидный гель, окрашенный Кумасси R-250; Б — нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга с сывороткой к рекомбинантному анатоксину; В — нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга с сывороткой к рекомбинантному OprF. 1 — белки, полученные в результате выращивания клеток трансформированных pET28-atox-oprF без экспрессии (без добавления ИПТГ); 2 — продукты, полученные при выращивании клеток трансформированных pET28-atox-oprF с экспрессией; 3 — весовой белковый маркер Fermentas-SM0661 (размеры фрагментов: 200, 150, 120, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 и 15 кДа); 4 — белки штамма-продуцента OprF-aTox, полученные при выращивании без экспрессии; 5 — белки штамма-продуцента OprF-aTox при выращивании с экспрессией; 6, 8 и 10 — очищенный рекомбинантный белок OprF-aTox; 7 — очищенный рекомбинантный белок aTox; 9 — очищенный рекомбинантный белок OprF. Стрелками отмечены рекомбинантные продукты.

нантного продукта составлял около 100 кДа (рис. 2А), что совпадало с расчетной (105 кДа). Очищенный рекомбинантный белок OprF-aTox в иммуноблоттинге специфично реагировал с сыворотками, иммунными как к рекомбинантному OprF, так и к анатоксину (рис. 2Б).

На следующем этапе рекомбинантный слитый белок OprF-aTox оценили по способности защищать мышей от экспериментальной инфекции токсигенным штаммом *P. aeruginosa*. Ранее при исследовании протективных свойств рекомбинантного белка OprF использовали куль-

Таблица 1. Защитные свойства рекомбинантных белков от экспериментальной инфекции *P. aeruginosa*

Вводимые препараты в дозе	Доза заражения (млн. м.к.)	Количество мышей павших/выживших	ЛД ₅₀ (млн. м.к.)	ИЭ*
Контроль (интактные мыши)	100	9/1	30,9	—
	50	7/3		
	25	4/6		
	12,5	2/8		
	6,25	0/10		
OprF, 25 мкг	200	8/2	66,1	2,1
	100	6/4		
	50	4/6		
	25	2/8		
	12,5	1/9		
aTox, 50 мкг	200	9/1	61,7	2,0
	100	7/3		
	50	3/7		
	25	2/8		
	12,5	1/9		
OprF-aTox, 25 мкг	200	10/0	43,7	1,4
	100	7/3		
	50	5/5		
	25	3/7		
	12,5	2/8		
OprF-aTox, 50 мкг	200	8/2	107,2	3,5
	100	3/7		
	50	2/8		
	25	1/9		
	12,5	0/10		
OprF-aTox, 100 мкг	200	8/2	93,3	3,0
	100	4/6		
	50	2/8		
	25	1/9		
	12,5	1/9		

* ИЭ — индекс эффективности.

туру *P. aeruginosa* штамма, который характеризуется отсутствием синтеза экзотоксина А. В то же время, для оценки рекомбинантного анатоксина использовали рекомбинантный функциональный экзотоксин А. Для исследования препарата, состоящего из мембранного и экзотоксинового компонентов, был взят штамм с основными факторами патогенности.

Исследование проводилось в сравнении с отдельным введением рекомбинантных OprF и анатоксина. OprF вводили в дозе 25 мкг, а анатоксин в дозе 50 мкг на мышь при однократном введении. Данные дозы были подобраны для двукратной иммунизации в предыдущих исследованиях. Слитый белок OprF-aTox вводили в дозах: 25, 50 и 100 мкг (при однократном введении). Контрольная группа включала мышей той же партии, которым вводили физиологический раствор. Животных иммунизировали двукратно, с двухнедельным интервалом. Экспериментальное заражение осуществляли через две недели после курса иммунизаций. Мышам контрольной группы вводили 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 млн. микробных клеток (млн. м.к.) культуры *P. aeruginosa*. ЛД₅₀ для этой группы животных составила 30,9 млн. м.к. При инфицировании мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, использовали следующие дозы: 12,5; 25; 50; 100 и 200 млн. м.к. культуры *P. aeruginosa*. Показано, что рекомбинантные OprF и анатоксин способны защищать иммунизированных мышей от *P. aeruginosa* штамма PA-103 с индексами эффективности (отношение ЛД₅₀ для иммунизированных мышей к ЛД₅₀ в контрольной группе) 2,1 и 2,0. ЛД₅₀ для этих групп были 66,1 и 61,7 млн. м.к., соответственно для OprF и анатоксина. В случае слитого белка OprF-aTox установлены следующие значения ЛД₅₀: 43,6 млн. м.к. — для иммунизирующей дозы 25 мкг; 107,2 млн. м.к. — для дозы 50 мкг

и 93,3 млн. м.к. ? для дозы 100 мкг. Индекс эффективности оптимальной дозы (50 мкг) составил 3,5 (табл. 1).

Полученные данные позволяют рассматривать рекомбинантный слитый белок OprF-aTox в качестве кандидата компонента вакцины, предназначенной для профилактики синегнойной инфекции.

Литература

1. Руднов ВА. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций вызванных *P. aeruginosa*. Русский медицинский журнал 2005; **13**(7): 485–90.
2. Илюкевич ГВ. Синегнойная инфекция: в новый век со старой проблемой. Медицинские новости 2004; (12): 3–8.
3. Лазарева АВ, Чеботарь ИВ, Крыжановская ОА, Чеботарь ВИ, Маянский НА. *Pseudomonas aeruginosa* патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2015; **17**(3): 170–86.
4. Бобровнический ВИ. Современные подходы к диагностике и лечению синегнойной инфекции у больных муковисцидозом. Медицинский журнал 2012; **1**(36): 4–9.
5. Калошин АА, Гатыпова ЕВ, Михайлова НА. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны (OprF) *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология 2011; (2): 74–84.
6. Калошин АА, Исаков МА, Михайлова НА, Вертнев ЮВ. Получение рекомбинантной атотоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2012; **154**(9): 330–5.
7. Вертнев ЮВ, Бродвинова НС, Мороз АФ. Экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa* и его роль в патогенезе синегнойной инфекции. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1981; (2): 13–9.
8. Станиславский ЕС, Жванецкая МИ, Машилова ГМ, Гладус МА. Бесклеточная Псевдомонас-вакцина. Сообщение I. Ферментативные свойства и вирулентность штаммов *P. aeruginosa*, протективная активность их водорастворимых антигенов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1980; (8): 66–71.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова». Российская Федерация, 105064, Москва, Малый Казенный переулок, 5А.

Солдатенкова Алена Владимировна. Научный сотрудник лаборатории протективных антигенов.

Михайлова Наталья Александровна. Заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией протективных антигенов, д-р мед. наук, профессор.

Зимина Екатерина Максимовна. Младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов.

Леонова Евгения Игоревна. Младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов.

Калошин Алексей Алексеевич. Ведущий научный сотрудник лаборатории протективных антигенов, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Калошин Алексей Алексеевич; alex-k-1973@yandex.ru

Obtaining the recombinant fusion protein OprF-aTox of *Pseudomonas aeruginosa* with protective properties

A. V. Soldatenkova, N. A. Mihailova, E. M. Zimina, E. I. Leonova, A. A. Kaloshin

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Into the cells of *Escherichia coli* (strain BL21(DE3)) two forms of the fusion protein *Pseudomonas aeruginosa* containing the full length outer membrane protein F (OprF) and nontoxic form of Exotoxin A (without 106 C-terminal amino acid residues) have been synthesized. Two recombinant genes were inserted into plasmid pET28 in different order: *oprF-atox* and *atox-oprF*. Only *oprF-atox* variant allowed to obtain the recombinant protein sufficient for purification by affinity chromatography on Ni-Sephadex. The recombinant fusion protein OprF-aTox showed a high specificity in interaction with the preparations of polyclonal immune rabbit serum to the recombinant OprF, the recombinant nontoxic form of Exotoxin A and the bacterial cells of *P. aeruginosa*. The purified recombinant fusion protein OprF-aTox after two immunizations protected the mice against toxigenic strain of *P. aeruginosa* (PA-103) being injected intraperitoneally. The index of efficiency of protective properties of OprF-aTox in the optimal dose (50 µg protein per mouse) was 3.5. This was more efficient than in

cases when the recombinant OprF and the recombinant toxoid were injected separately. The indexes of efficiency of protective properties of OprF and the toxoid were 2.1 and 2.0.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; outer membrane protein F; exotoxin A; toxoid; recombinant fusion protein OprF-aTox; immunization.

For citation: Soldatenkova AV, Mihailova NA, Zimina EM, Leonova EI, Kaloshin AA. Obtaining the recombinant fusion protein OprF-aTox of *Pseudomonas aeruginosa* whith protective properties. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 96–100.

References

1. Rudnov VA. Antibiotic treatment of hospital infections caused by *P. aeruginosa*. *Russkiy meditsinskiy zhurnal* 2005; **13**(7): 485–90 (in Russian).
2. Ilyukevich GV. *Pseudomonas* infection: the new century with an old problem. *Meditsinskie novosti* 2004; (12): 3–8.
3. Lazareva AV, Tchebotar IV, Kryzhanovskaya OA, Tchebotar VI, Mayanskiy NA. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity, Pathogenesis and Diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya* 2015; **17**(3): 170–86.
4. Bobrovnichy VI. Modern approaches to diagnosis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a patient with cystic fibrosis. *Meditsinskiy zhurnal* 2012; **1**(36): 4–9.
5. Kaloshin AA, Gatypova EV, Mikhailova NA. Obtaining recombinant forms of outer membrane protein F (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa* and assessment of their immunogenic properties. *Biokhimiya* 2011; (2): 74–84.
6. Kaloshin AA, Isakov MA, Mikhailova NA, Vertiev YuV. Preparation of Recombinant Atoxic Form of Exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* 2012; **154**(9): 330–5.
7. Vertiev YuV, Brodinova NS, Moroz AF. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its role in the pathogenesis of pyocyanus infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 1981; (2): 13–9.
8. Stanislavskii ES, Zhvanetskaia MI, Mashilova GM, Gladus MA. Cell-free *pseudomonas* vaccine. I. Enzyme properties and virulence of strains of *P. aeruginosa*; protective activity of their water-soluble antigens. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 1980; (8): 66–72.

Authors

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Maly Kazenny lane, 5A, Moscow, 105064, Russian Federation.

Soldatenkova AV. Researcher of Laboratory of protective antigens.

Mihaylova NA. Deputy Director General for the scientific work, head of Laboratory of protective antigens. Doctor of Medical Sciences, professor.

Zimina EM. Junior researcher of Laboratory of protective antigens.

Leonova EI. Junior researcher of Laboratory of protective antigens.

Kaloshin AA. Leading researcher of Laboratory of protective antigens. Candidate of Biological Sciences.

Исследование фармакодинамики препарата на основе терапевтических гуманизированных моноклональных антител против интерлейкина-17 на модели антиген-индуцированного артрита на кроликах

А. А. Недорубов, А. В. Грачев, М. А. Варава, Е. Л. Морозова

ЗАО «БИОКАД», п. Любучаны, Чеховский район, Московская область

Поступила 25.02.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

В настоящей статье представлен материал по оценке специфического действия препарата терапевтических гуманизированных моноклональных антител против интерлейкина-17 на модели антиген-индуцированного артрита на кроликах. Исследована фармакокинетика и иммуногенность препарата анти-IL-17A. Тяжесть развития артрита оценивали по степени повреждения суставов, уровню маркеров воспаления и гистологической шкале Мэнкина.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; моноклональные антитела; интерлейкина-17 (IL-17A); CRP; TNF- α .

Библиографическое описание: Недорубов АА, Грачев АВ, Варава МА, Морозова ЕЛ. Исследование фармакодинамики препарата на основе терапевтических гуманизированных моноклональных антител против интерлейкина-17 на модели антиген-индуцированного артрита на кроликах. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 101–107.

Ревматоидный артрит (РА) является хроническим воспалительным заболеванием суставов, характеризуется воспалением синовиальной оболочки, что приводит к разрушению хряща и кости [1]. Этиология заболевания связана как с гуморальным, так и с клеточным иммунным ответом [2]. Повреждение хрящевой ткани является следствием инфильтрации главным образом Т-клетками памяти, макрофагами, плазматическими клетками, которые показывают признаки активации [3]. Инвазия данных клеточных элементов в синовиальную оболочку приводит в большинстве случаев к прогрессирующей деструкции хряща и кости. Деструкция ткани опосредуется цитокинами, увеличением количества фибробластов и избыточной пролиферации воспалительных клеток, в основном макрофагов и лимфоцитов. Важнейшей характеристикой воспаленных суставов являются: пролиферирующие синовиальные фибробласты, постепенно разрушающие сустав и хрящ, инфильтрация CD4+ Т-клеток и аутоантител, увеличение числа иммунных клеток [4].

IL-17A, в значительных количествах присутствующий в синовии и синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом, вызывает синтез IL-1, фактора некроза опухоли α (TNF- α), IL-6, IL-8, гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (CSF), гранулоцитарно-макрофагального CSF и других провоспалительных факторов, а также *in vitro* стимулирует макрофаги из фракции мононуклеаров периферической крови к синтезу TNF- α и IL-1 [5]. Считается, что при РА Т-клетки являются основным источником IL-17A в синовиальной оболочке [6]. При этом имеется прямая зависимость уровня IL-17A от тяжести заболевания. Было продемонстрировано, что ингибирование IL-17A и IL-17RA имеет важные клинически терапевтические эффекты при псориазе и РА [7].

Доклинические исследования показали, что IL-17A является привлекательной терапевтической мишенью. На моделях артрита у животных было показано, что агенты, которые нейтрализуют IL-17A (например, анти-IL-17A антитела, IL17RA-IgG Fc fusion protein) уменьшают тяжесть

заболевания и предотвращают повреждение суставов у животных [8]. Исследования антител против IL-17A на мышинной модели коллаген-индуцированного артрита (CIA) показали значительное подавление воспаления сустава и предотвращение разрушения хряща и кости [9]. Несколько ингибиторов IL-17A продвинулись в клинических исследованиях, в том числе анти-IL-17A моноклональные антитела, secukinumab и ixekizumab и моноклональное антитело brodalumab анти-IL-17RA. Антитела показали положительный результат в доказательство правильности данной концепции [10].

Цель данной работы — исследовать специфическое действие препарата моноклональных антител против IL-17A, разработанного биотехнологической компанией ЗАО «БИОКАД» на модели антиген-индуцированного артрита на кроликах.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи: исследована фармакокинетика препарата моноклональных антител против IL-17A для расчета курса терапии. Оработана модель антиген-индуцированного артрита на кроликах. Исследовано содержание нейтрализующих антител. Эффективность терапии препаратом моноклональных антител против IL-17A оценивали по маркерам воспаления и гистологической картине.

Материалы и методы

Животные

Исследование проведено на кроликах (самцах) породы «Шиншилла», приобретенных в питомнике ООО «КРОЛИНФО». Все манипуляции с животными выполнялись согласно национальному стандарт РФ ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Фармакокинетика anti-IL-17A

В исследовании были использованы дозы 0,1 и 8 мг/кг. Препарат антител вводили однократно подкожно в зону холки. Содержание anti-IL17A исследовали в сыворотке

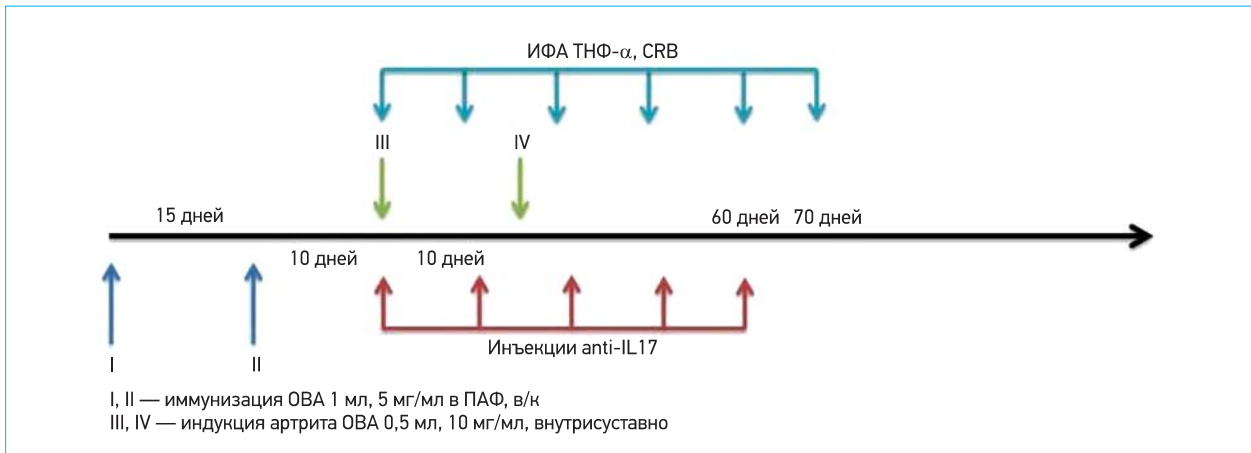


Рис. 1. Схема индукции антиген-индуцированного артрита.

крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента.

Определение концентрации препарата anti-IL17A в сыворотке крови проводили в трех повторах. Полученные результаты использовали для построения кривой изменения концентрации препарата anti-IL17A во времени для каждого из животных.

$AUC_{(0-460)}$ — суммарная площадь под кривой концентрации препарата от момента его попадания в организм до 460 ч.

$AUMC_{(0-460)}$ — суммарная площадь под кривой произведения времени на концентрацию препарата в организме до 460 ч.

По вычисленным значениям площадей $AUC_{(0-460)}$ и $AUMC_{(0-460)}$ при дозе (D) введенного препарата определяли следующие фармакокинетические параметры препарата anti-IL17A:

- среднее время пребывания в организме молекулы препарата (MRT);
- продолжительность периода полувыведения ($T_{1/2}$);
- константа скорости элиминации (L_z);

Эти данные использовали для планирования исследования специфической активности на модели АИА.

Иммуногенность anti-IL-17A

В исследовании были использованы дозы 10, 20 и 30 мг/кг. Препарат антител вводили подкожно в зону холки еженедельно, в течение трех месяцев, с последующим восстановительным периодом в один месяц. Для определения уровня антител к моноклональным антителам к IL17 в сыворотке крови кроликов была использована тест-система, разработанная в ЗАО «БИОКАД». Уровень антител к моноклональным антителам к IL17 в сыворотке крови оценивали с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. Эти данные использовали для планирования исследования специфической активности на модели АИА.

Индукция антиген-индуцированного артрита

Животных сенсибилизировали овальбумином 5 мг/мл в 1 мл полного адьюванта Фрейнда внутривенно в нескольких точках вдоль позвоночника. Через 14 суток проводили повторную сенсибилизацию по той же схеме. Через десять суток после повторной сенсибилизации, кроликов

тестировали на реакцию Артюса. Для этого, овальбумин 5 мг/мл в объеме 0,2 мл, вводили внутривенно. У кроликов, которые положительно среагировали на антиген (раздражение в месте укола), индуцировали артрит путем введения 0,5 мл стерильного раствора овальбумина (10 мг/мл) в полости сустава. Повторную индуцирующую инъекцию проводили через десять суток по той же схеме. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор. Через 24 ч после первой индукции начинали вводить исследуемый препарат антител против IL-17A. Препарат вводили подкожно один раз в неделю в течение пяти недель (рис. 1).

Тяжесть артрита

Тяжесть развития артрита оценивали по степени повреждения суставов (каждые трое суток с начала терапии). Для этого выбривали шерсть в области коленного сустава и проводили осмотр с регистрацией клинической картины [11]:

- 0 — норма;
- 1 — мягкая опухоль и краснота;
- 2 — умеренная припухлость и краснота;
- 3 — сильный отек, эритема, потеря функциональности двух лап;
- 4 — полная потеря функциональности трех лап.

Определение уровня CRP, TNF-α

Маркеры тяжести воспаления смотрели в сыворотке крови через 7, 14, 21 и 28 суток после начала терапии антителами. Для этого забирали кровь из ушной вены, готовили сыворотку по стандартной методике. Для определения уровня TNF-α и CRP (С-реактивный белок) в сыворотке крови кроликов была использована тест-система, разработанная в ЗАО «БИОКАД». Уровень TNF-α и CRP в сыворотке крови оценивали с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента.

Гистология

Гистологическую оценку проводили на сагиттальных срезах хряща из зоны поражения бедренного мыщелка и верхней суставной поверхности большеберцовой кости. Готовили серийные срезы (5 мкм) и окрашивали сафранином-О. Два независимых наблюдателя оценивали тяжесть ОА-поражений по шкале от 0 до 14 (табл. 1), используя гистологическую-гистохимическую шкалу Мэнкина [12]. По этой шкале тяжесть ОА-поражений оценивают на осно-

Таблица 1. Гистологическая шкала повреждения при артрите

	Оценка
Структура сустава:	
норма	0
поврежденная поверхность	1
нарушение паннуса и поверхности	2
трещины в переходной зоне	3
трещины в радиальной зоне	4
трещина в зоне кальцификации	5
полная дезорганизация	6
Клетки:	
норма	0
диффузная гиперцеллюлярность	1
пролиферация	2
гипоцеллюлярность	3
Окрашивание Safranin-O:	
норма	0
небольшое снижение	1
умеренное снижение	2
сильное снижение	3
нет окраски	4
Целостность tidemark:	
неповрежденные	0
скрещенные кровеносными сосудами	1

вании потери окрашивания сафранином-О (шкала 0–4), клеточных изменений (шкала 0–3), уровня инвазии кровеносными сосудами (шкала 0–1) и структурных изменений (шкала 0–6). По последней шкале 0 означает нормальную хрящевую структуру, а 6 означает эрозию хряща в субхондральной кости. Система баллов базируется на наиболее глубоких гистологических изменениях во множественных срезах [13]. Рассчитывали средние величины и SEM и проводили статистический анализ с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты

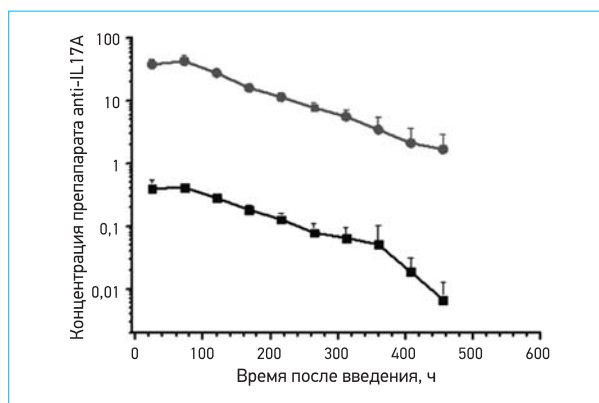
Фармакокинетика anti-IL-17A

Результаты исследования фармакокинетики препарата anti-IL17A в дозах 0,1 и 8 мг/кг при однократном подкожном введении кроликам Шиншилла позволили рассчитать основные фармакокинетические параметры (табл. 2).

На рисунке 2 представлены экспериментальные данные по изменению концентрации препарата anti-IL17A во времени в образцах сыворотки крови кроликов Шиншилла после однократного подкожного введения в дозах 0,1 и 8 мг/кг.

Иммуногенность anti-IL17A

Оценку иммуногенности anti-IL17A определяли по уровню связывающих препарат антител. Определение концентрации антител к anti-IL17A в сыворотке крови проводили в двух повторах. Полученные результаты использовали для построения кривой изменения концентрации антител к anti-IL17A во времени для каждого из животных (табл. 3, рис. 3). Из представленных результатов следует, что мак-

**Рис. 2.** Усредненная кривая ($n = 10$) изменения концентрации препарата anti-IL17A в сыворотке крови при однократном подкожном введении кроликам в дозе 0,1 (—■—) и 8 мг/кг (—●—).**Таблица 2.** Фармакокинетические параметры препарата anti-IL17A при однократном подкожном введении кроликам в дозе 0,1 и 8 мг/кг

Фармакокинетические параметры	anti-IL17A			
	0,1 мг/кг		8 мг/кг	
	X_{cp}	$\square$	X_{cp}	$\square$
C_{max} , мкг/мл	0,47	0,05	41,86	9,57
T_{max} , ч	43,20	26,29	52,80	26,29
$AUC_{(0-460)}$, мкг/(мл·ч)	89,78	5,27	7501,29	1048,72
Lz , 1/ч	0,006	0,001	0,010	0,002
T_{half} , ч	111,40	16,63	73,07	14,13
MRT , ч	176,17	15,33	147,06	7,55

Таблица 3. Экспериментальные данные по определению концентрации антител к anti-IL17A в сыворотке крови кроликов

Время после введения	№ кролика п/п	Концентрация антител к anti-IL17A, мкг/мл		
		10 мг/кг	20 мг/кг	30 мг/кг
1 месяц	1	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,000	0,000
	3	0,000	0,000	0,000
	4	0,000	0,000	0,000
2 месяц	1	0,000	2,129	2,514
	2	0,248	1,251	3,655
	3	0,000	0,000	0,000
	4	0,699	0,000	0,000
3 месяц	1	0,000	24,359	30,370
	2	31,082	26,514	60,380
	3	10,337	0,000	0,000
	4	21,518	0,000	0,000
Восстановительный период (1 месяц)	1	0,000	16,578	28,104
	2	26,713	22,915	39,052
	3	1,794	0,000	10,497
	4	13,055	0,000	0,000

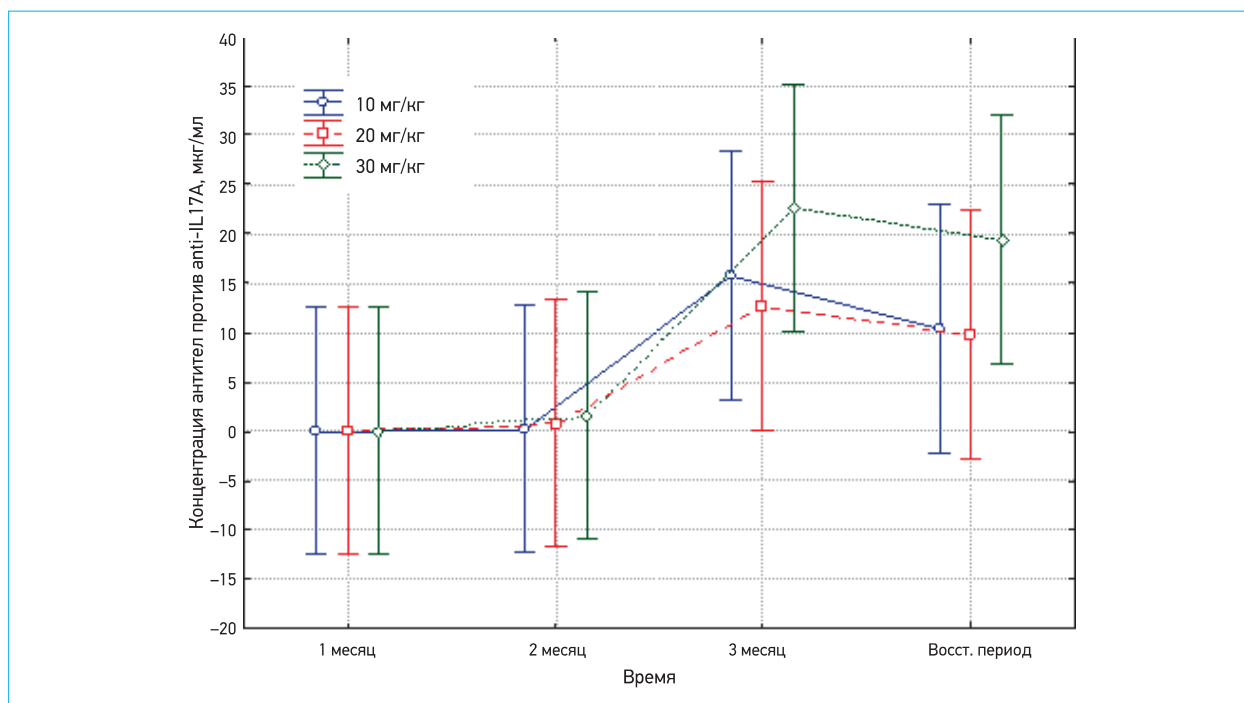


Рис. 3. Изменение концентрации антител к anti-IL17A во времени в сыворотке крови кроликов после многократного подкожного введения.

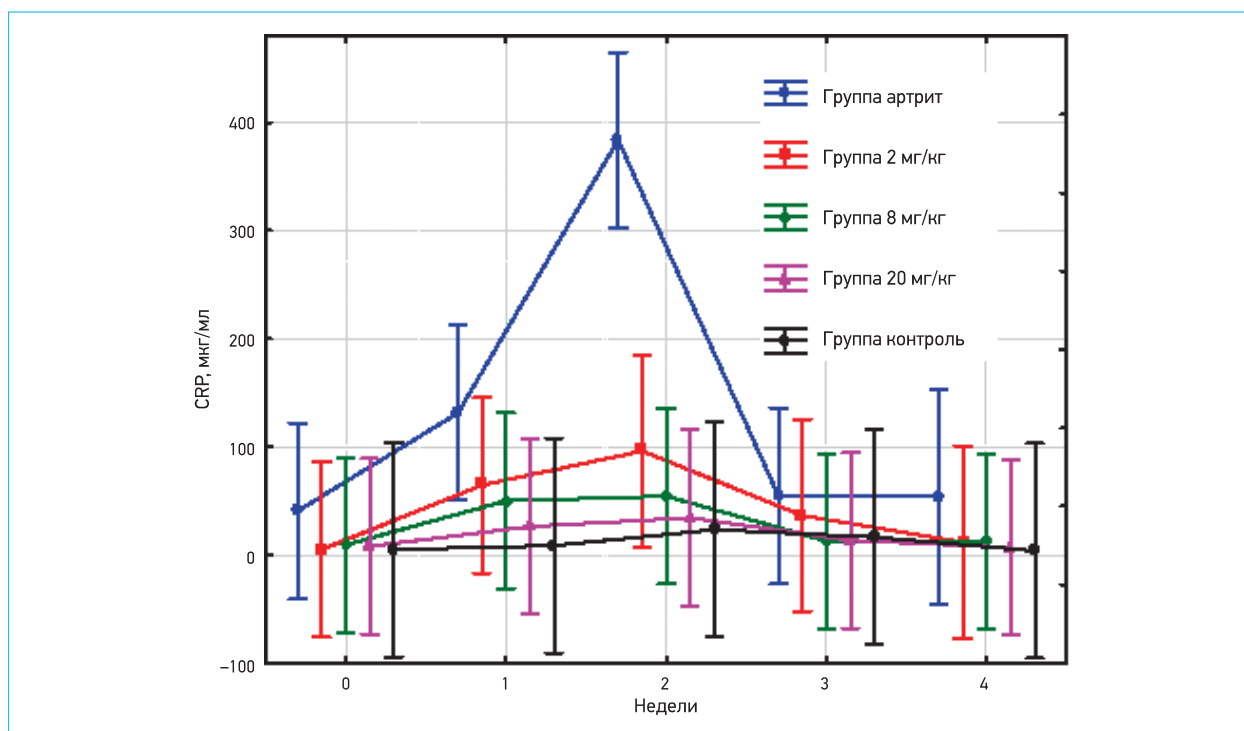


Рис. 4. Изменение концентрации С-реактивного белка во времени в сыворотке кроликов на модели АИА (среднее; 0,95 доверительный интервал).

симальный уровень антител против anti-IL17A наблюдался на третий месяц после начала введения препарата, достигая значения 60 мкг/мл (доза 30 мг/кг) и падает во время восстановительного периода.

Полученные результаты (табл. 3) использовали для построения кривой изменения концентрации антител к

anti-IL17A во времени в сыворотке крови кроликов (рис. 3).

Результаты, полученные в ходе исследования фармакокинетики и иммуногенности anti-IL17A, использовали для корректного планирования исследования специфической активности препарата anti-IL17A на модели антиген-индуцированного артрита.

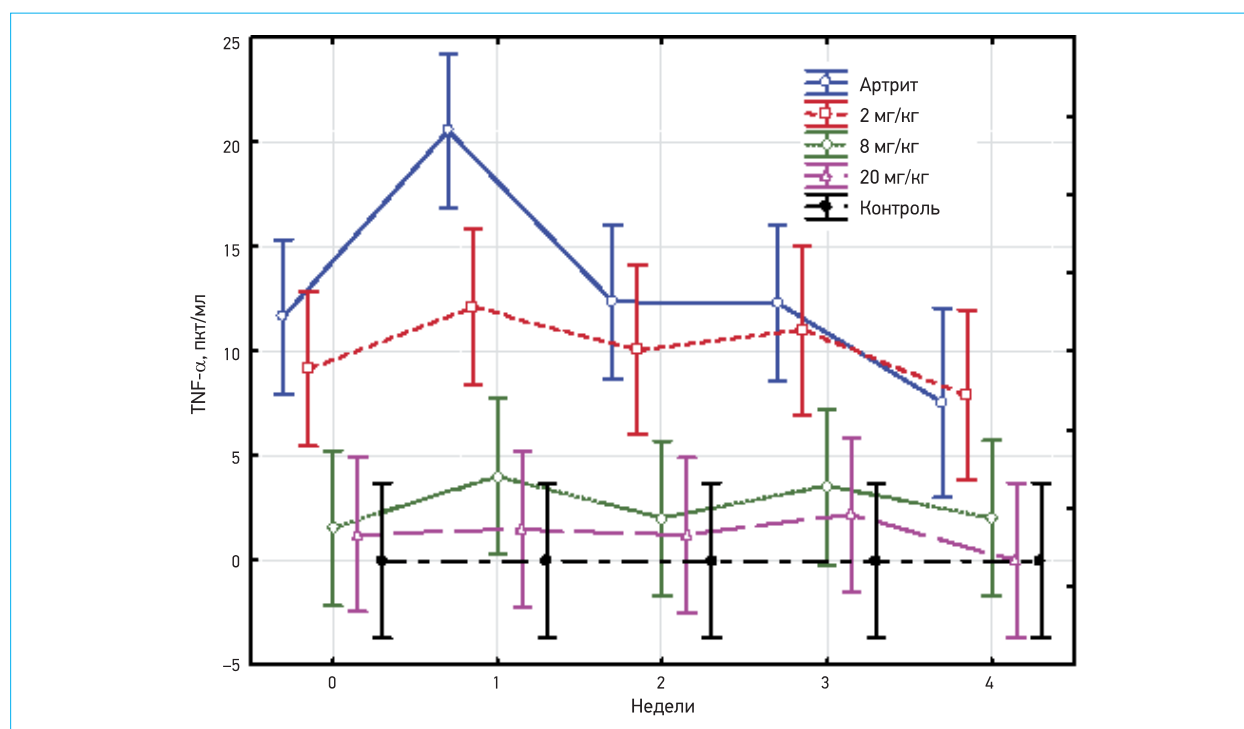


Рис. 5. Изменение концентрации TNF-α во времени в сыворотке крови кроликов на модели АИА (среднее; 0,95 доверительный интервал).

Определение уровня CRP, TNF-α

Протективные свойства препарата anti-IL17A анализировали по уровню маркеров воспаления: CRP и TNF-α. Уровень маркеров определяли в сыворотке крови еженедельно в течение четырех недель после индукции АИА. Анализ полученных данных показывает, что препарат anti-IL-17A в дозе 20 мг/кг максимально эффективно снижает уровни CRP и TNF-α в течение всего срока исследования (рис. 4 и 5). Так же хочется отметить, что уровень TNF-α и CRP максимально возрастают на первую и вторую неделю после индукции артрита. Что важно иметь в виду для использования данных маркеров воспаления для скрининга.

Гистология

Важным параметром эффективности препаратов, направленных на лечение ревматоидного артрита, является гистологическая оценка целостности суставов и прилегающих тканей. В ходе гистологического исследования коленных суставов кроликов на модели антиген-индуцированного артрита в группе с артритом выявили следующие изменения.

Суставная поверхность костей покрыта гиалиновым хрящом, имеющим нечеткое зональное строение. В наружной зоне наблюдается или исчезновение бесклеточной пластинки (lamina splendens) или ее набухание с разволокнением, а так же появление узур и трещин вплоть до радиальной и кальцинированной зоны хряща. Глубокая зона гиалинового хряща без четкой границы переходит в обызвествленную, линия обызвествления контурируется. Определяются поля лишенные клеток, чередующиеся с полями активного размножения.

Синовиальные оболочки ареолярного типа выступают в суставную полость в виде клинообразных складок, где выражен фибриноидный некроз ворсин. Определяется развитие клеточного паннуса с формированием зон краевых эрозий. Синовиоциты в большинстве полей зрения некротизированы и десквамированы. Сохранившиеся клетки разряжены или группируются близко друг к другу,

Таблица 4. Гистологическая оценка по системе оценки Мэнкина в баллах

Группа	Суммарная оценка (max = 14)
2 мг/кг	6,25
8 мг/кг	5,2
20 мг/кг	4,0
Артрит	9,0
Контроль	2,75

в несколько слоев. Ворсины синовиальной оболочки отекающие, в их строме — участки фибриноидного некроза. Экссудативная воспалительная реакция представлена отеком, фибриноидными изменениями, появлением полиморфно-ядерных лейкоцитов, макрофагов. Среди клеток воспаления встречаются гистиоциты. В субсиновиальном слое пролиферируют фибробласты с последующим разрастанием грануляционной ткани. Во всех случаях преобладают экссудативные процессы. При окрашивании Сафранином наблюдается снижение интенсивности окрашивания.

По оценке уровня повреждения суставов и окружающих тканей по шкале Мэнкина максимально протективный эффект наблюдается в группе 20 мг/кг (табл. 4).

В группе с дозой препарата 20 мг/кг отмечалось максимальное сокращение альтеративных процессов, уменьшение экссудативных и появление пролиферативных реакций, наблюдалось сокращение отека, уменьшалось выраженность некротических процессов.

Заключение

В ходе исследования фармакокинетики препарата антител против IL-17A рассчитали основные фармакокинетические параметры. Полученные данные использовали для плани-

рования исследования специфической активности препарата антител против IL-17A на модели антиген-индуцированного артрита. Исследование иммуногенности в течение трех месяцев показало, что связывающие антитела на anti-IL17A начинают образовываться на третий месяц еженедельного введения. Эти данные указывает на отсутствие потенциального блокирования антител против IL-17A в выбранной модели исследования.

В результате проведенного исследования специфической активности препарата anti-IL17A на модели антиген-индуцированного артрита была показана его эффективность по параметрам содержания уровня маркеров воспаления: С-реактивного белка и TNF- α , а также по данным гистологического исследования суставов и оценке по шкале Мэнкина.

Литература

1. Chew MWK, Hendersont B, Edwards JCW. Antigen-induced arthritis in the rabbit: ultrastructural changes at the chondrosynovial junction. *Int J Exp Path.* 1990; 71: 879–94.
2. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; 358: 903–11.
3. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85(3): 307–10.
4. Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014; 31(4): 256–61.

Об авторах

ЗАО «Биокад». Российская Федерация, 142380, Московская область, Чеховский район, п. Любучаны.

Недорубов Андрей Анатольевич. Старший научный сотрудник отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Грачев Александр Владимирович. Старший научный сотрудник отдела иммунохимии.

Варавко Мария Александровна. Старший научный сотрудник отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Морозова Елена Леонидовна. Руководитель отдела доклинических испытаний лекарственных средств.

Адрес для переписки: Недорубов Андрей Анатольевич; biocad@biocad.ru

The study of pharmacodynamics of a medicine based on humanized monoclonal antibodies against IL-17 in rabbit model of antigen-induced arthritis

A. A. Nedorubov, A. V. Grachev, M. A. Varavko, E. L. Morozova

CJSC «BIOCAD», village Lyubuchany, Chekhov district, Moscow region, Russia

The present article contains scientific data on the assessment of specific activity of therapeutic humanized monoclonal antibodies against IL-17 in rabbit model of antigen-induced arthritis. Pharmacokinetics and immunogenicity of anti-IL-17A preparation have been studied. The severity of rheumatoid arthritis progression has been assessed by the levels of joint damage, the levels of inflammatory markers and according to Menkin histological grade.

Key words: rheumatoid arthritis; monoclonal antibodies; interleukin-17 (IL-17A); CRP; TNF- α .

For citation: Nedorubov AA, Grachev AV, Varavko MA, Morozova EL. The study of pharmacodynamics of a medicine based on humanized monoclonal antibodies against IL-17 in rabbit model of antigen-induced arthritis. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 101–107.

References

1. Chew MWK, Hendersont B, Edwards JCW. Antigen-induced arthritis in the rabbit: ultrastructural changes at the chondrosynovial junction. *Int J Exp Path.* 1990; 71: 879–94.
2. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; 358: 903–11.
3. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85(3): 307–10.

5. Кологривова ИВ, Кологривова ЕН, Суслова ТЕ. Молекулярные аспекты функционирования Т-хелперов 17-го типа. *Бюллетень сибирской медицины* 2011; 10(4): 93–8.
6. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun.* 2015; 60: 1–11.
7. Mease PJ. Inhibition of interleukin-17, interleukin-23 and the TH17 cell pathway in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis. *Curr Opin Rheumatology* 2015; 27(2): 127–33.
8. van den Berg WB, McInnes IB. Th17 cells and IL-17a—focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. *Semin Arthritis Rheum.* 2013; 43(2): 158–70.
9. Khan D, Ahmed SA. Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Front Genet.* 2015; (6): 236.
10. Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2001; 167(2): 1004–13.
11. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JCT, Roesler R, Schwartzmann G, Cunha FQ, Xavier RM. Protective Effect of RC-3095, an Antagonist of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, in Experimental Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2011; 63(10): 2956–65.
12. Link TM, ed. *Cartilage Imaging. Significance, Techniques, and New Developments.* New York: Springer Science+Business Media; 2011.
13. Van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, Bulstra SK, Kuyper R, Drukker J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 1992; 10(1): 58–61.

4. Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014; 31(4): 256–61.
5. Kologrivova IV, Kologrivov EN, Suslova TE. Molecular aspects of the functioning of T-helper 17-type. *Bulleten sibirskoy meditsiny* 2011; 10(4): 93–98 (in Russian).
6. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun.* 2015; 60: 1–11.

7. Mease PJ. Inhibition of interleukin-17, interleukin-23 and the TH17 cell pathway in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis. *Curr Opin Rheumatology* 2015; **27**(2): 127–33.
8. van den Berg WB, McInnes IB. Th17 cells and IL-17a—focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. *Semin Arthritis Rheum.* 2013; **43**(2): 158–70.
9. Khan D, Ahmed SA. Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. *Front Genet.* 2015; (6): 236.
10. Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2001; **167**(2): 1004–13.
11. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JCT, Roesler R, Schwartzmann G, Cunha FQ, Xavier RM. Protective Effect of RC-3095, an Antagonist of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, in Experimental Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2011; **63**(10): 2956–65.
12. Link TM, ed. *Cartilage Imaging. Significance, Techniques, and New Developments.* New York: Springer Science+Business Media; 2011.
13. Van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, Bulstra SK, Kuyper R, Drukker J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 1992; **10**(1): 58–61.

Authors

CJSC «BIOCAD», Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region, 142380, Russian Federation.

Nedorubov AA. Senior researcher of the Department of preclinical trials of medicines.

Grachev AV. Senior researcher of the Department of immunochemistry.

Varavko MA. Senior researcher of the Department of preclinical trials of medicines.

Morozova EL. Head of the Department of preclinical trials of medicines.

Эффективность и безопасность нового препарата для лечения рассеянного склероза «пегилированный интерферон бета-1а человека» на обезьянах в сравнении с немодифицированным интерфероном бета-1а

Н. А. Спирина¹, Я. Ю. Устюгов¹, А. А. Александров¹, М. В. Артюхова¹, А. Б. Джелия²

¹ ЗАО «Биокад», п. Любучаны, Чеховский район, Московская область, Россия

² Научно-исследовательский институт Экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, Республика Абхазия, г. Сухум, гора Трапезия

Поступила 12.04.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

В статье представлены результаты исследований эффективности и безопасности препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на основе рекомбинантного человеческого интерферона бета-1а «Пегилированный интерферон бета-1а человека» (ПЭГ ИФН бета-1а) на макаках резус (*Macaca mulatta*) при подкожном и внутримышечном введении. Использовались следующие дозы: максимально переносимая доза — $3,0 \cdot 10^6$ МЕ/кг, промежуточная доза — $1,5 \cdot 10^6$ МЕ/кг и минимальная доза, эквивалентная терапевтической для человека немодифицированного интерферона бета-1а — $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг. Проводилась количественная оценка фармакодинамических параметров препарата ПЭГ ИФН бета-1а при однократном подкожном и внутримышечном введении. Оценивались уровень и характер патологических изменений внутренних органов (систем внутренних органов) экспериментальных животных, вызванных многократными подкожными и внутримышечными введениями ПЭГ ИФН бета-1а. На основании данных исследований препарата ПЭГ ИФН бета-1а на макаках резус показано, что препарат эффективен (как при однократном подкожном, так и при однократном внутримышечном введении) и не оказывает токсического действия (как при многократном подкожном, так и при многократном внутримышечном введении) при использовании в предполагаемой терапевтической дозе $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг.

Ключевые слова: интерферон бета-1а; пегилированный интерферон бета-1а; рассеянный склероз; фармакодинамика; безопасность; эффективность; токсичность.

Библиографическое описание: Спирина НА, Устюгов ЯЮ, Александров АА, Артюхова МВ, Джелия АБ. Эффективность и безопасность нового препарата для лечения рассеянного склероза «пегилированный интерферон бета-1а человека» на обезьянах в сравнении с немодифицированным интерфероном бета-1а. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 108–114.

Рассеянный склероз (РС) — наиболее распространенное (более 2 миллионов человек в мире и более 150000 в России) хроническое прогрессирующее заболевание, обусловленное развитием очагов демиелинизации в белом веществе центральной нервной системы, часто встречающееся в возрасте от 15 до 40 лет. Является одной из самых социально и экономически значимых проблем современной неврологии вследствие характера течения болезни и возможностей патогенетической терапии РС.

В связи с особенностями применения уже используемых препаратов и их комбинаций [1], изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС), такими как малое влияние на прогрессирование инвалидизации, необходимость частых инъекций в течение многих лет, наличие ряда побочных действий [2] — существует необходимость создания новых препаратов для предупреждения обострений, увеличения периода ремиссий и замедления болезни. Таким образом, цель настоящих исследований состояла в экспериментальном доказательстве более выраженной эффективности и сравнимой безопасности препарата ПЭГ ИФН бета-1а при использовании в дозе $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг в сравнении с немодифицированным ИФН бета-1а.

Материалы и методы

1. Экспериментальные животные. В соответствии с методическими рекомендациями и источниками литературы, описывающими проведение соответствующих исследований, определялись объем, схема и процедура проведения

экспериментов по определению степени повреждающего действия препарата ПЭГ ИФН бета-1а при его многократном введении [3–7]. Согласно требованиям нормативных документов [5], исследование препарата проводилось на животных, чувствительных к его действию — макака резус (*Macaca mulatta*), здоровых особях по данным гематологического анализа крови и наблюдения за общим состоянием, функцией пищеварительного тракта, температурой тела и в количестве, достаточном для регистрации изучаемых эффектов: 67 обезьян (34 обезьяны в эксперименте с многократным введением и 33 обезьяны в эксперименте с однократным введением возрастающих доз препаратов). В таблице 1 показано разделение обезьян по группам для экспериментов.

2. Препараты. Препараты животным вводили подкожно (в область холки) и внутримышечно (в область бедра) в виде свежеприготовленных растворов. При многократном введении частота инъекций составляла один раз в 2 недели, в течение 12 недель. Клинические наблюдения и тесты проводили на протяжении трех месяцев (90 дней) от начала инъекций. Продолжительность хронического токсикологического эксперимента составляла 90 дней с последующим 4-недельным наблюдением (общая продолжительность эксперимента — 120 дней). У животных групп однократного введения тесты проводились в течение 2 недель.

Плацебо — в состав препарата-плацебо входили: ацетат натрия до концентрации 3,14 мМ, ЭДТА до концен-

трации 0,15 мМ, Твин до концентрации 80 мг/л, маннитол до концентрации 54 мг/мл.

Препарат «ПЭГ ИФН бета-1а человека» был получен в «Биокад» путем присоединения активированного полиэтиленгликоля (ПЭГ) («LaysanBio», США) к высокоочищенному рекомбинантному ИФН бета-1а человека с последующей очисткой ПЭГ ИФН бета-1а методом ионообменной хроматографии. Серия препарата 300812.

Препарат, являющийся стандартом терапии РС, Неиммобилизованный ИФН бета-1а человека был получен в «Биокад» биосинтетическим путем с использованием технологии рекомбинантной ДНК, в культуре клеток яичника китайского хомячка. Серия: 100020812Р, срок годности — 1 год.

3. Исследование фармакодинамики (эффективности) ПЭГ ИФН бета-1а. Оценку фармакодинамической активности проводили по уровню неоптерина (как чувствительного и надежного маркера для мониторинга эффективности лечения ИФН бета-1а, аналогично определяемый в рамках проведения клинических исследований [8, 9]) в сыворотке крови приматов. Все процедуры выполняли в соответствии с инструкцией производителя использованной тест-системы («IBL», Германия).

На рисунке 1 показано, что при однократном подкожном и внутримышечном введениях препарата ПЭГ ИФН бета-1а, значения максимальной концентрации (C_{max}) и площади под кривой изменения концентрации во време-

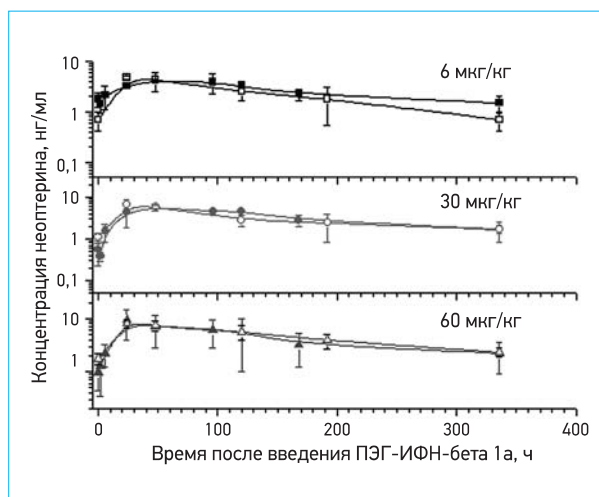


Рис. 1. Изменение концентрации неоптерина в сыворотке крови обезьян после однократного подкожного (закрытые символы) и внутримышечного введения (открытые символы) препарата ПЭГ ИФН бета-1а в различных дозах.

ни ($AUC_{(0-336)}$) для неоптерина были примерно одинаковы и увеличивались при повышении дозы.

4. Прижизненные манипуляции с животными. За животными наблюдали на протяжении 6 часов после введения препарата. Ежедневно проводился клинический ос-

Таблица 1. Дизайн исследований

Группа	Пол	Количество животных в группе	Препарат	Доза, МЕ/кг	Объем введения, мл	Режим введения
Однократное введение						
1	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	0,3·10 ⁶	6	Подкожно
2	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	Подкожно
3	♀	3	ПЭГ ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	Подкожно
4	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	0,3·10 ⁶	6	Внутримышечно
5	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	Внутримышечно
6	♀	3	ПЭГ ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	Внутримышечно
7	♂	3	ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	Подкожно
8	♀	3	ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	Внутримышечно
Многократные введения						
1	♀	2	Плацебо	0	6	1 раз в две недели, подкожно
	♂	2				
2	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	0,3·10 ⁶	6	1 раз в две недели, подкожно
3	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	1 раз в две недели, подкожно
4	♀	3	ПЭГ ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	1 раз в две недели, подкожно
	♂	3				
5	♀	3	ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	1 раз в две недели, подкожно
	♂	3				
6	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	0,3·10 ⁶	6	1 раз в две недели, внутримышечно
7	♂	3	ПЭГ ИФН бета-1а	1,5·10 ⁶	6	1 раз в две недели, внутримышечно
8	♀	3	ПЭГ ИФН бета-1а	3,0·10 ⁶	6	1 раз в две недели, внутримышечно

мотор, обезьян взвешивали до введения препаратов и 1 раз каждые 2 недели в ходе эксперимента. В течение всего срока эксперимента во всех группах обезьян гибель животных не наблюдалась. Введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а и немодифицированного препарата ИФН бета-1а не оказывало местно-раздражающего действия. При многократном подкожном и внутримышечном введении экспериментальным приматам исследуемого препарата в дозе $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг, а также при внутримышечном введении в дозе $1,5 \cdot 10^6$ МЕ/кг клинических проявлений интоксикации не наблюдалось. Оценка общего состояния животных, получавших многократно препарат ПЭГ ИФН бета-1а и препарат, являющийся стандартом терапии РС, в максимальной дозе, показала развитие клинических симптомов интоксикации: снижение активности и контактности с экспериментатором, снижение аппетита, функциональные нарушения желудочно-кишечного тракта и потерю массы тела. Полученные результаты согласуются с данными применения немодифицированных препаратов ИФН бета-1а в клинике [10].

Результаты клинических лабораторных исследований (гематология, биохимия) и коагулометрии, полученные в течение всего срока эксперимента и представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что подкожное и внутримышечное введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а не влияет на показатели гемостаза, количество эритроцитов, тромбоцитов, скорость оседания эритроцитов [11], но сопровождается незначимым снижением уровня гемоглобина, а при использовании максимальных доз и уровня сывороточного железа. Также установлено, что препарат ПЭГ ИФН бета-1а оказывает действие на сезонную динамику клеток белой крови, опосредуя более низкое значение, характеризующее увеличение числа лейкоцитов в сравнении с фоновыми показателями. Для оценки влияния многократного введения обоих исследуемых препаратов на свертывающую систему крови определяли показатели активированного частичного тромбопластинового времени, концентрации фибриногена и протромбинового времени. Все показатели находились в пределах нормальных значений.

Влияние на сердечно-сосудистую систему определяли по биохимическим показателям (активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспаратаминотрансферазы (АСТ)) в сыворотке крови обезьян. Биоэлектрическую активность сердца исследовали с использованием кардиографа «Полли-Спектр» («Нейрософт», Россия). Применяли комбинацию из 6 стандартных дипольных отведений — трех нормальных (I, II, III) и трех усиленных (aVR, aVL, aVF). Электроды-зажимы размещали на локтевом сгибе (передние конечности) и на области сгибателя коленного сухожилия (задние конечности). На область кожи, куда помещали электрод, наносили гель электродный контактный. У животных сохранялся синусовый правильный ритм сердечбиения, признаков эктопических аритмий и электрокардиографических нарушений внутрисердечной проводимости не выявлено. Частота сердечных сокращений у всех животных находилась в пределах нормы.

Для оценки возможного повреждающего действия препарата ПЭГ ИФН бета-1а на печень проводили изучение биохимических показателей сыворотки крови, характеризующих белковую и ферментативную функции печени с помощью стандартных наборов реагентов на биохимическом анализаторе Humalyzer 3000 («Human GmbH», Германия). Многократное подкожное и внутримышечное введение исследуемого препарата во всех дозах и препарата,

являющегося стандартом терапии РС, в дозе $3,0 \cdot 10^6$ МЕ/кг не вызывало изменения содержания общего белка, билирубина и щелочной фосфатазы в сыворотке крови обезьян, однако сопровождалось изменением уровня трансаминаз при введении максимальных доз (наблюдалось повышение показателя АСТ и снижение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ)), что согласуется с данными применения немодифицированных препаратов ИФН бета-1а в клинических исследованиях [12].

Влияние на функцию мочевыделительной системы определяли по биохимическим показателям (мочевина, креатинин, концентрация Na, K) и общим анализом мочи (цвет/характер, pH, скрытую кровь, уробилиноген, глюкозу, билирубин, белок, кетоны, нитриты, лейкоциты). Образцы мочи анализировали на автоматическом анализаторе мочи DocUReader («77 Elektronika Kft.» Венгрия). Результаты исследований показали, что многократное подкожное и внутримышечное введение обоих препаратов не вызывает изменений уровней всех перечисленных показателей. В течение всего срока эксперимента показатели скорости диуреза и объема мочи у животных контрольной и экспериментальных групп не отличались. Таким образом, антидиуретическое действие исследуемого препарата и препарата, являющегося стандартом терапии РС, не установлено.

Оценку влияния препаратов на центральную нервную систему (ЦНС) проводили по поведенческим реакциям и эмоциональной активности животных: обращали внимание на возбудимость, реактивность, агрессивность, пугливость, двигательную, спонтанную и нервно-мышечную активность, рефлекс «позы» и способность сохранять неудобное положение тела.

5. Патоморфологические и гистологические исследования. На 12-й неделе эксперимента эвтаназии подвергли по одному животному из групп с дозой $3,0 \cdot 10^6$ МЕ/кг (немодифицированный препарат ИФН бета-1а, ПЭГ ИФН бета-1а подкожно, ПЭГ ИФН бета-1а внутримышечно) и группы контроль-плацебо. На 16 неделе — 8 животных по самке и самцу из групп, перечисленных выше. Эвтаназию осуществляли путем внутривенного введения препарата Листенон. Патоморфологическое исследование включало в себя некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание и гистологическое исследование внутренних органов (срезы окрашивали стандартно — гематоксилином и эозином, исследовали световой микроскопией).

Результаты и обсуждение

Исходя из результатов исследований ФД, препарат ПЭГ ИФН бета-1а в эффективности не уступает препарату, являющемуся стандартом терапии РС, но превосходит его по длительности действия. Таким образом, активность нового препарата пролонгированного действия, оцененная по уровню неоптерина, характеризуется продолжительностью действия, в 6 раз превышающей продолжительность действия немодифицированного препарата.

Анализ данных гематологии показал, что подкожное и внутримышечное введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а сопровождается проявлением функциональной активности исследуемого препарата, так как известно, что связывание интерферона со своим рецептором на поверхности клеток крови опосредует антипролиферативный эффект и сопровождается снижением общего количества лейкоцитов в периферической крови [13].

Таблица 2. Результаты гематологических и клинико-биохимических анализов крови

Сроки исследования	Контроль (плацебо)	ПЭГ-ИФН бета-1а, МЕ/кг						ИФН бета-1а, МЕ/кг
		п/к введение			в/м введение			
		0,3·10 ⁶	1,5·10 ⁶	3,0·10 ⁶	0,3·10 ⁶	1,5·10 ⁶	3,0·10 ⁶	3,0·10 ⁶
СОЭ, мм/ч								
Фон	4,8 ± 0,8	4,3 ± 1,9	6,8 ± 3,3	5,3 ± 1,2	4,7 ± 1,8	11,0 ± 7,0	4,3 ± 0,6	5,0 ± 0,7
6 нед	3,3 ± 1,1	3,0 ± 0,6	6,2 ± 1,0	3,3 ± 0,3	4,0 ± 0,6	3,3 ± 0,3	4,2 ± 0,4	3,5 ± 0,6
12 нед	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,3	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,0	3,3 ± 0,3	4,7 ± 0,9	2,3 ± 0,2	5,2 ± 0,8
16 нед	7,3 ± 1,8	6,7 ± 0,9	3,6 ± 0,2	4,0 ± 1,2	3,7 ± 0,9	4,3 ± 1,2	2,0 ± 0,8	3,8 ± 0,9
Эритроциты × 10 ¹² /л								
Фон	5,5 ± 0,4	5,7 ± 0,5	4,6 ± 0,4	5,0 ± 0,4	5,2 ± 0,5	5,2 ± 0,5	5,1 ± 0,4	5,2 ± 0,2
6 нед	5,2 ± 0,1	6,1 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,2
12 нед	5,7 ± 0,3	6,1 ± 0,2	5,9 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,5	4,2 ± 0,2	5,4 ± 0,2
16 нед	5,5 ± 0,1	6,0 ± 0,1	5,6 ± 0,3	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,1	4,3 ± 0,2	5,2 ± 0,2
Гемоглобин, г/л								
Фон	142,5 ± 4,3	158,7 ± 8,4	125,3 ± 25,6	138,7 ± 4,8	138,7 ± 11,0	143,3 ± 1,3	141,0 ± 7,0	138,0 ± 2,6
6 нед	133,3 ± 5,7	145,7 ± 3,7	117,3 ± 25,2	138,7 ± 3,7	130,3 ± 5,3	134,7 ± 2,4	118,5 ± 4,9*	129,7 ± 3,6
12 нед	146,8 ± 8,4	146,3 ± 5,2	115,7 ± 20,5	129,0 ± 3,0	134,3 ± 7,5	138,0 ± 12,9*	110,0 ± 11,7*	132,5 ± 6,3
16 нед	146,7 ± 1,5	141,0 ± 2,5	114,0 ± 14,7	131,0 ± 2,5	132,0 ± 9,3	135,3 ± 2,2	112,8 ± 11,8	121,4 ± 7,4
Количество лейкоцитов × 10 ⁹ /л								
Фон	6,7 ± 0,8	9,9 ± 2,1	8,5 ± 2,8	8,1 ± 0,6	11,8 ± 3,9	12,8 ± 2,6	10,6 ± 1,0	6,9 ± 0,6
6 нед	7,1 ± 0,3	8,4 ± 1,5	9,5 ± 2,9	7,3 ± 1,0	11,4 ± 2,2	8,7 ± 1,9	9,6 ± 1,4	6,4 ± 0,6
12 нед	9,6 ± 1,1	9,1 ± 0,2	12,3 ± 0,7	9,4 ± 0,9	10,4 ± 1,7	10,4 ± 3,2	9,4 ± 1,0	11,8 ± 2,4*
16 нед	7,3 ± 0,4	6,7 ± 1,3	9,3 ± 0,3	8,8 ± 1,7	10,6 ± 1,3	10,8 ± 2,0	8,9 ± 2,1	9,7 ± 0,8*
Количество нейтрофилов × 10 ⁹ /л								
Фон	46,8 ± 5,5	68,7 ± 6,4	63,7 ± 4,7	59,8 ± 5,3	53,7 ± 8,9	59,7 ± 8,0	61,7 ± 6,7	54,8 ± 4,8
6 нед	53,3 ± 2,1	56,7 ± 8,7	53,0 ± 11,4	45,8 ± 6,6	52,3 ± 8,8	58,3 ± 4,3	45,2 ± 10,6	38,3 ± 9,2
12 нед	50,8 ± 7,9	57,3 ± 7,7	54,3 ± 3,8	54,0 ± 2,2	55,3 ± 3,0	51,0 ± 3,6	45,0 ± 2,4	47,8 ± 6,6
16 нед	32,5 ± 13,7	57,3 ± 3,4	49,7 ± 4,9	40,2 ± 6,3	50,3 ± 9,8	44,3 ± 3,8	40,5 ± 12,5	51,2 ± 4,0
Количество лимфоцитов × 10 ⁹ /л								
Фон	38,5 ± 2,8	20,7 ± 3,9	26,0 ± 4,2	41,0 ± 8,8	33,0 ± 6,8	40,3 ± 4,8	27,3 ± 7,3	36,2 ± 5,3
6 нед	36,5 ± 2,8	32,0 ± 5,9	32,3 ± 5,0	45,8 ± 7,3	35,3 ± 9,9	42,7 ± 2,6	36,0 ± 8,7	38,8 ± 8,9
12 нед	39,3 ± 5,7	30,0 ± 9,7	35,7 ± 2,8	34,8 ± 3,2	31,0 ± 3,5	32,0 ± 3,2	29,7 ± 3,6	39,2 ± 6,0
16 нед	43,3 ± 8,3	27,3 ± 3,7	29,3 ± 1,7	50,0 ± 5,9	38,0 ± 7,5	32,0 ± 8,1	39,0 ± 9,5	40,4 ± 3,6
Количество моноцитов × 10 ⁹ /л								
Фон	10,0 ± 2,4	6,3 ± 1,3	7,0 ± 0,6	8,0 ± 1,9	6,3 ± 2,4	7,7 ± 2,0	7,0 ± 0,6	6,2 ± 1,8
6 нед	5,3 ± 1,1	7,7 ± 2,3	2,7 ± 0,3	4,8 ± 0,5	4,7 ± 1,2	5,7 ± 1,3	4,5 ± 1,1	5,0 ± 1,0
12 нед	5,0 ± 1,7	8,0 ± 3,5	4,3 ± 0,3*	6,7 ± 2,3	7,3 ± 2,0	8,7 ± 0,7	5,7 ± 1,5	6,8 ± 2,1
16 нед	6,0 ± 2,5	13,7 ± 0,9*	7,0 ± 2,5	8,0 ± 0,7	6,3 ± 2,3	5,7 ± 1,5	6,6 ± 1,5	4,0 ± 1,4
Количество эозинофилов × 10 ⁹ /л								
Фон	4,0 ± 2,1	3,3 ± 3,3	3,3 ± 0,9	0,5 ± 0,0	7,0 ± 0,4	1,0 ± 0,0	3,2 ± 0,8	2,3 ± 1,0
6 нед	4,8 ± 1,8	3,3 ± 2,3	4,3 ± 0,9	2,2 ± 0,2	7,3 ± 0,3	0,7 ± 0,0	3,7 ± 1,1	11,8 ± 9,7
12 нед	5,0 ± 2,1	4,7 ± 1,7	4,7 ± 0,7*	4,2 ± 1,0*	6,3 ± 1,2	0,7 ± 0,0	2,3 ± 0,7	1,0 ± 0,2
16 нед	6,7 ± 1,7	1,3 ± 0,3	10,0 ± 1,5	5,0 ± 2,0*	5,0 ± 0,6	2,7 ± 0,7	1,8 ± 0,4	3,0 ± 1,0
Количество базофилов × 10 ⁹ /л								
Фон	0,8 ± 0,5	0,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,0
6 нед	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,4	1,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,0
12 нед	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,0
16 нед	0,7 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,4

Таблица 2 (окончание)

Сроки исследования	Контроль (плацебо)	ПЭГ-ИФН бета-1а, МЕ/кг						ИФН бета-1а, МЕ/кг
		п/к введение			в/м введение			
		0,3·10 ⁶	1,5·10 ⁶	3,0·10 ⁶	0,3·10 ⁶	1,5·10 ⁶	3,0·10 ⁶	
Железо, мкМ/л								
Фон	16,9 ± 4,4	28,5 ± 1,7	36,5 ± 14,9	28,1 ± 6,7	30,0 ± 11,7	17,2 ± 1,8	28,8 ± 5,6	20,3 ± 8,1
6 нед	24,9 ± 9,0	33,3 ± 4,1	27,7 ± 9,0	19,3 ± 6,2	30,1 ± 8,7	26,0 ± 3,4	16,9 ± 4,7	27,7 ± 6,1
12 нед	28,8 ± 4,2	32,0 ± 4,0	40,9 ± 11,5	24,3 ± 6,5	17,2 ± 7,7	29,2 ± 3,6*	15,6 ± 4,8	21,9 ± 4,5
16 нед	29,7 ± 3,0	40,5 ± 3,9	38,8 ± 12,1	27,5 ± 8,2	36,5 ± 10,4	35,5 ± 0,5	23,2 ± 7,8	40,4 ± 8,7
Аспаратаминотрансфераза, Е/л								
Фон	29,9 ± 5,5	40,7 ± 10,2	20,7 ± 9,5	45,0 ± 2,5	45,6 ± 4,6	40,4 ± 4,2	58,1 ± 7,8	33,9 ± 6,7
6 нед	27,9 ± 4,8	51,9 ± 11,7	35,1 ± 3,8	33,6 ± 3,7	28,6 ± 5,4	32,4 ± 7,7	39,9 ± 3,8	40,1 ± 6,8
12 нед	33,8 ± 3,2	49,4 ± 8,1	39,7 ± 1,1	33,8 ± 3,1	27,1 ± 1,3	36,2 ± 13,6	38,8 ± 4,3	46,8 ± 4,1
16 нед	49,0 ± 2,1	60,1 ± 17,5	45,2 ± 68,1	36,2 ± 3,6	41,4 ± 7,7	53,4 ± 4,5	64,8 ± 15,4	61,3 ± 3,8*
Аланинаминотрансфераза, Е/л								
Фон	8,1 ± 2,7	15,2 ± 1,1	9,5 ± 5,3	9,8 ± 1,1	15,9 ± 0,9	20,2 ± 2,9	10,4 ± 1,0	10,2 ± 3,7
6 нед	12,6 ± 4,4	13,4 ± 5,1	11,5 ± 4,6	8,2 ± 0,5	8,6 ± 2,0	11,2 ± 2,5	16,9 ± 4,7	17,1 ± 3,6
12 нед	11,3 ± 2,1	19,2 ± 3,9	16,0 ± 2,9	13,2 ± 1,7	12,3 ± 3,2	14,2 ± 2,9	15,6 ± 4,8	25,1 ± 9,2
16 нед	12,4 ± 3,5	15,9 ± 11,9	20,7 ± 4,4	17,0 ± 4,2	20,0 ± 2,2	31,3 ± 2,1	23,2 ± 7,8	31,0 ± 5,9*
Белок общий, г/л								
Фон	90,1 ± 6,1	78,3 ± 9,3	79,7 ± 8,0	90,6 ± 5,0	62,7 ± 0,1	76,4 ± 5,3	88,2 ± 4,1	77,8 ± 3,9
6 нед	82,7 ± 5,9	77,9 ± 11,7	73,2 ± 4,5	79,6 ± 3,5	76,0 ± 7,4	65,6 ± 5,8	80,0 ± 3,6	79,7 ± 3,2
12 нед	95,6 ± 3,2	78,9 ± 7,4	66,9 ± 1,8	76,3 ± 28	76,0 ± 6,5	71,2 ± 5,2	80,1 ± 3,7	78,7 ± 2,7
16 нед	89,8 ± 2,1	75,1 ± 8,7	65,5 ± 2,8	83,3 ± 4,2	75,0 ± 5,1	71,2 ± 2,6	73,4 ± 5,0	83,3 ± 4,7
Щелочная фосфатаза, Е/л								
Фон	186,0 ± 92,9	187,0 ± 103,9	200,6 ± 26,2	263,2 ± 50,2	203,0 ± 30,8	329,0 ± 57,4	270,8 ± 93,4	141,0 ± 29,2
6 нед	168,9 ± 52,1	169,2 ± 22,9	196,1 ± 25,7	138,1 ± 36,9	176,2 ± 33,9	324,3 ± 106,6	175,4 ± 64,5	148,2 ± 26,5
12 нед	124,6 ± 29,2	147,6 ± 34,6	112,2 ± 58,3	154,4 ± 43,8	126,4 ± 22,5	287,3 ± 89,7	201,4 ± 100,9	131,4 ± 17,6
16 нед	116,3 ± 25,7	134,8 ± 29,1	96,6 ± 38,3	162,3 ± 70,0	131,1 ± 20,4	452,0 ± 64,0	236,5 ± 97,2	136,5 ± 17,9
Билирубин общий, мкМ/л								
Фон	2,5 ± 0,6	8,0 ± 4,2	6,3 ± 1,9	9,4 ± 4,7	4,1 ± 2,4	3,5 ± 0,9	11,1 ± 3,6	5,6 ± 2,6
6 нед	0,9 ± 0,5	7,0 ± 3,3	3,1 ± 1,4	5,5 ± 3,2	5,2 ± 1,7	5,6 ± 1,6	4,4 ± 1,4	8,6 ± 4,0
12 нед	1,7 ± 0,4	7,1 ± 2,2	3,5 ± 1,5	7,2 ± 1,6	7,6 ± 2,8	4,6 ± 2,2	6,5 ± 2,6	10,7 ± 2,8
16 нед	0,3 ± 0,3	6,3 ± 3,8	4,7 ± 1,2	6,7 ± 2,2	8,7 ± 4,8	3,3 ± 0,3	3,5 ± 0,7	6,5 ± 1,2

* $p \leq 0,05$ по отношению к фоновому показателю.

Оценка сывороточных биохимических маркеров и общих анализов мочи показала, что многократное введение ПЭГ ИФН бета-1а во всех исследуемых дозах не влияет на белково-образующую функцию печени, липидно-углеводный обмен и работу мочевыделительной системы как при подкожном, так и при внутримышечном введении, что в равной степени справедливо для самок и самцов *M. mulatta*. Однако многократное подкожное и внутримышечное введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а и ИФН бета-1а сопровождается изменением уровня анализируемых трансаминаз. Изменения носили дозозависимый характер, наиболее выраженный в группах приматов, получавших максимальную дозу. Отмечено, что немодифицированный препарат ИФН бета-1а в большей степени влиял на уровень оцениваемых трансаминаз при использованной схеме эксперимента.

Отсутствие электрокардиографических признаков нарушений биоэлектрической активности сердца и значимо-

го повышения уровня оцениваемых ферментов (ЛДГ, АСТ) в сыворотке крови приматов, получавших исследуемый препарат во всех дозах и способах введения, позволяет исключить его повреждающее действие на сердечно-сосудистую систему.

Многократное подкожное (в дозах 1,5·10⁶ МЕ/кг и 3,0·10⁶ МЕ/кг) и внутримышечное (в дозе 3,0·10⁶ МЕ/кг) введения исследуемого препарата сопровождалось снижением активности и контактности с экспериментатором.

Данные макроскопического и гистологического исследований позволяют сделать заключение, что многократное введение препарата ПЭГ ИФН бета-1а и немодифицированного препарата не вызывает дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных тканях и строме изучаемых органов.

Разработанный компанией «Биокад» препарат ПЭГ ИФН бета-1а для лечения РС обладает более продолжительным действием и сопоставимым уровнем безопасно-

сти в сравнении с немодифицированным препаратом, что позволит сделать его применения более удобным для пациентов.

Выводы

1. ПЭГ ИФН бета-1а в дозе, эквивалентной терапевтической дозе немодифицированного ИФН бета-1а для человека, столь же эффективен, как и препарат, являющийся стандартом терапии РС, но превосходит таковой по длительности действия.
2. Установлено, что ПЭГ ИФН бета-1а при подкожном и внутримышечном введении в дозе $0,3 \cdot 10^6$ МЕ/кг не оказывает токсического воздействия на организм экспериментальных животных.

Литература

1. Limmroth V, Putzki N, Kachuck NJ. The interferon beta therapies for treatment of relapsing remitting multiple sclerosis: are they equally efficacious? A comparative review of open label studies evaluating the efficacy, safety, or dosing of different interferon beta formulations alone or in combination. *Ther Adv Neurol Disord.* 2011; 4(5): 281–96.
2. Walther EU, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: side effects of interferon therapy and their management. *Neurology* 1999; 53: 1622–7.
3. ГОСТ Р 53434–2009. Принципы надлежащей лабораторной практики.
4. Об утверждении Правил лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 708н от 23 августа 2010 г.
5. Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012.
6. Draft consensus guideline Addendum to ICH S6 — Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 2009.
7. ICH S6 — Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 1997.
8. Rejdak K, Leary SM, Stelmasiak Z, et al. Urinary nitric oxide metabolites and neopterin as markers of longitudinal interferon beta-1a treatment in primary progressive multiple sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences* 2005; 238: 244.
9. Bagnato F, Durastanti V, Finamore L, Volante G, Millefiorini E. Beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2003; 24: 301–4.
10. Matson MA, Zimmerman TR, Tuccillo D, Tang Y, Deykin A. Dose titration of intramuscular interferon beta-1a reduces the severity and incidence of flu-like symptoms during treatment. *Curr Med Res Opin.* 2011; 27(12): 2271–8.
11. Куксова МИ. Кровотворная система обезьян в норме и патологии. М.: Медицина; 1972.
12. Tremlett HL, Oger J. Elevated aminotransferases during treatment with interferon-beta for multiple sclerosis: actions and outcomes. *Mult Scler.* 2004; 10: 298–301.
13. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 2006; 108: 3253–61.

Об авторах

ЗАО «Биокад», Отдел экспериментальной биологии. Российская Федерация, 142380, Московская область, Чеховский район, п. Любучаны.

Спирина Наталья Александровна. Научный сотрудник.

Устюгов Яков Юрьевич. Руководитель отдела.

Александров Алексей Александрович. Старший научный сотрудник.

Артюхова Марина Владимировна. Научный сотрудник.

Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, Республика Абхазия, г. Сухум, гора Трапезия.

Джелія А. Б. Младший научный сотрудник

Адрес для переписки: Спирина Наталья Александровна; spirina@biocad.ru

Efficacy and safety of the new drug against multiple sclerosis «PEGylated Interferon beta-1a Human» in monkeys compared with unmodified interferon beta-1a

N. A. Spirina¹, Ja. Ju. Ustjugov¹, A. A. Aleksandrov¹, M. V. Artjuhova¹, A. B. Dzhelija²

¹ CJSC "BIOCAD", Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region, Russia

² Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Sciences of Abkhazia, the Republic of Abkhazia, Sukhum, Trapecija Mountain

The article presents the results of studies on the safety and efficacy of long-acting drug for the treatment of multiple sclerosis on the basis of recombinant human interferon beta-1a «PEGylated interferon beta-1a Human» (PEG IFN beta-1a) in monkeys *Macaca mulatta* in subcutaneous and intramuscular injection. The following doses were used: the maximum tolerated dose — $3.0 \cdot 10^6$ IU/kg, the intermediate dose — $1.5 \cdot 10^6$ IU/kg and the minimum dose, which was equivalent to human therapeutic dose of unmodified interferon beta-1a — $0.3 \cdot 10^6$ IU/kg. Quantify the parameters of pharmacodynamics of the PEG IFN beta-1a after single subcutaneous and intramuscular administration of increasing doses of different groups of monkeys. Evaluated the level and nature of the pathological changes of internal organs (visceral systems) of experimental animals caused by repeated subcutaneous and intramuscular injections of PEG IFN-beta 1a. Based on these studies the drug PEG IFN beta-1a in rhesus monkeys indicated that the drug is efficient (both in single subcutaneous and intramuscular administration) and does not have toxic effects (both in multiple subcutaneous and intramuscular administration) when using a therapeutic dose $0.3 \cdot 10^6$ IU/kg.

Keywords: interferon beta-1a; PEGylated interferon beta-1a; multiple sclerosis; pharmacodynamics; safety; efficiency; toxicity.

For citation: Spirina NA, Ustjugov JaJu, Aleksandrov AA, Artjuhova MV, Dzhelija AB. Efficacy and safety of the new drug against multiple sclerosis «PEGylated Interferon beta-1a Human» in monkeys compared with unmodified interferon beta-1a. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 108–114.

References

1. Limmroth V, Putzki N, Kachuck NJ. The interferon beta therapies for treatment of relapsing remitting multiple sclerosis: are they equally efficacious? A comparative review of open label studies evaluating the efficacy, safety, or dosing of different interferon beta formulations alone or in combination. *Ther Adv Neurol Disord.* 2011; 4(5): 281–96.
2. Walther EU, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: side effects of interferon therapy and their management. *Neurology* 1999; 53: 1622–7.
3. State Standard P 53434 – 2009. Principles of Good Laboratory Practice (in Russian).
4. On approval of the Rules of laboratory practices. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation dated August 23, 2010, № 708n (in Russian).
5. Mironov AN, ed. Guidelines for conducting pre-clinical trials of medicinal products. Moscow: Grif i K; 2012 (in Russian).
6. Draft consensus guideline Addendum to ICH S6 — Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 2009.
7. ICH S6 — Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals; 1997.
8. Rejdak K, Leary SM, Stelmasiak Z, et al. Urinary nitric oxide metabolites and neopterin as markers of longitudinal interferon beta-1a treatment in primary progressive multiple sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences* 2005; 238: 244.
9. Bagnato F, Durastanti V, Finamore L, Volante G, Millefiorini E. Beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2003; 24: 301–4.
10. Matson MA, Zimmerman TR, Tuccillo D, Tang Y, Deykin A. Dose titration of intramuscular interferon beta-1a reduces the severity and incidence of flu-like symptoms during treatment. *Curr Med Res Opin.* 2011; 27(12): 2271–8.
11. Kuksova MI. Hematopoietic system of monkeys in health and disease. Moscow: Meditsina; 1972 (in Russian).
12. Tremlett HL, Oger J. Elevated aminotransferases during treatment with interferon-beta for multiple sclerosis: actions and outcomes. *Mult Scler.* 2004; 10: 298–301.
13. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 2006, 108: 3253–61.

Authors

CJSC «BIOCAD», Experimental Biology Department, Lyubuchany village, Chekhov district, Moscow region, 142380, Russian Federation.

Spirina NA. Researcher.

Ustjugov JaJu. Head of Department.

Aleksandrov AA. Senior Researcher.

Artjuhova MV. Researcher.

Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Sciences of Abkhazia, the Republic of Abkhazia, Sukhum, Trapecija Mountain.

Dzhelija AB. Junior Researcher.

Набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции

Л. М. Рустамова, С. Ф. Семенов, Н. Л. Богданова, А. С. Владыко, А. Г. Красько

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь

Поступила 09.11.2015. Принята к публикации 22.04.2016.

Своевременная диагностика особо опасных инфекций, вызванных вирусами Ласса и Эбола, является ключевым моментом в организации противоэпидемических мероприятий в случае завоза заболевания на территорию республики Беларусь. Основным методом быстрого реагирования при выявлении геморрагических лихорадок Ласса и Эбола, по-прежнему, является метод непрямой иммунофлуоресценции. В работе представлена разработка набора для выявления антител к особо опасным вирусным инфекциям Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции «Белар-РИФ-ЛАС-ЭБОЛ» ТУ ВУ 100558032.194–2011.

Ключевые слова: особо опасные вирусные инфекции; аренавирусы; вирус Ласса; филовирусы; вирус Эбола; антитело, метод непрямой иммунофлуоресценции.

Библиографическое описание: Рустамова ЛМ, Семенов СФ, Богданова НЛ, Владыко АС, Красько АГ. Набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 115–119.

В последние годы происходят существенные изменения эпидемических проявлений геморрагических лихорадок Ласса, Эбола, Марбург. Очевидна глобализация эпидемического процесса — масштабность, рост заболеваемости, сокращение интервалов между эпидемическими вспышками, нарастание опасности распространения инфекции из очага на эндемичные территории.

В соответствии с положениями Международных медико-санитарных правил, являющихся основополагающим документом в деле создания и обеспечения эффективного функционирования механизмов предупреждения вспышек заболеваний, имеется целый ряд государственных обязательств и обязанностей для сдерживания международного распространения эпидемий. Необходимость обеспечения биологической безопасности обусловлена сохраняющейся угрозой распространения опасных и особо опасных инфекций, что связано с неблагополучной эпидемической ситуацией в мире. По итогам совещания Комитета Международных медико-санитарных правил по чрезвычайной ситуации в отношении вспышки лихорадки Эбола в 2014 г. в Западной Африке, после дискуссий и обсуждения представленной информации Комитетом сделано следующее заключение: вспышка Эбола в Западной Африке представляет «чрезвычайное событие» и риск для здоровья населения в других странах; возможные последствия дальнейшего международного распространения особенно серьезны ввиду вирулентности и контагиозности вируса [1]. Обратной стороной прогресса транспортного сообщения и глобализации является угроза распространения возбудителя инфекции из очага на другие территории. Существуют стойкие природные очаги особо опасных инфекций на территории государств, с которыми имеются постоянные взаимоотношения, функционирует ряд объектов, представляющих биологическую опасность, возможны террористические акты с применением биологических поражающих агентов [2, 3]. Поэтому государство должно быть готово к такому развитию событий и

иметь в арсенале средства и методы диагностики, что является ключевым моментом в организации противоэпидемических мероприятий и обеспечения безопасности здоровья населения страны. Одним из простых и относительно дешевых методов диагностики при быстром реагировании для выявления геморрагических лихорадок является метод непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ). Потребности Республики Беларусь, а также сопредельных государств в препаратах такого рода определяются масштабами возникшей эпидемической ситуации и необходимостью создания неснижаемого запаса референс-препаратов с ежегодным обновлением.

Целью настоящей работы является разработка набора для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции. Для достижения поставленной цели определены следующие основные задачи:

- восстановление штаммов вируса Ласса и вируса Эбола для дальнейшего использования в экспериментальных исследованиях;
- подготовка суспензионных антиген содержащих препаратов;
- получение иммунных сывороток морских свинок к вирусам Ласса и Эбола и оценка их специфической активности в реакции непрямой иммунофлуоресценции;
- подготовка набора и испытания с референс-сыворотками.

Все исследования с зараженными вирусом Ласса и вирусом Эбола культурами клеток, а также лабораторными животными выполнены в условиях лаборатории уровня биобезопасности BSL 3–4.

Материалы и методы

В работе использовали вирус Ласса, штамм Josiah, регистрационный номер СКВБ V-I-2014-017; вирус Эбола, штамм Заир, регистрационный номер СКВБ V-I-2013-007, полу-

ченные из Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Восстановление и накопление вирусов осуществляли методом пассажей в перевиваемой линии клеток почки африканской зеленой мартышки Vero E6. Восстановленный вирус Ласса и вирус Эбола хранили при температуре минус 70°C и использовали для получения антигенсодержащих препаратов. Идентификацию восстановленных вирусов проводили с использованием молекулярно-генетических методов исследования — обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами на матрицах РНК, выделенных из культуральной жидкости, содержащей вирусы Ласса или Эбола. Амплификация полученных специфических кДНК-фрагментов свидетельствует о наличии РНК вирусов Ласса или Эбола в вируссодержащей жидкости и подтверждает аутентичность вирусов.

Для получения антигенсодержащих препаратов использовали монослой культур клеток Vero E6, зараженный вирусами Ласса или Эбола с множественностью инфицирования 1 БОЕ/клетка. Адсорбция вируса продолжалась 1,5 ч при температуре 37°C. В качестве поддерживающей вносили среду Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, «Sigma», США) с добавлением 2% эмбриональной сыворотки коров («Sigma», США), 2 мМ L-глутамин («Sigma», США), 50 мкг/мл гентамицина («Белмедпрепараты», Республика Беларусь). В контрольных незараженных культурах проводили лишь смену ростовой среды на среду поддержки. Через 6–7 сут культивирования монослой инфицированных и контрольных культур клеток Vero E6 дважды отмывали раствором Хенкса («Sigma», США). Культуры клеток Vero E6 снимали в 2 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) («Sigma», США). Полученную суспензию клеток наносили на подготовленные 8-луночные предметные стекла (ООО «Онега», РФ). Аналогично готовили препараты незараженных клеток для контрольного образца. Препараты фиксировали охлажденным при минус 20°C ацетоном в течение 20 мин и инактивировали ультрафиолетовым облучением в течение 1 ч, используя лампы Ultra Violet TUV 30w/630T8 на расстоянии 20 см от источника излучения [4]. Контроль полноты инактивации вируса в антигенных препаратах проводили методом трехкратного пассирования клеточного материала, снятого с предметных стекол в культуре клеток Vero E6, с последующим титрованием остаточной инфекционной активности вируса методом бляшек под агарозным покрытием [5]. Препараты хранили при температуре минус 20°C и применяли в качестве антигена для исследований сывороток методом непрямой иммунофлуоресценции.

Лабораторные серии иммунных сывороток получали после иммунизации морских свинок референс-штаммами вирусов Ласса и Эбола. Каждым штаммом вируса иммунизировали отдельную группу животных возрастающими дозами вируса. Первую и вторую иммунизации проводили инактивированным вирусом в дозе 10 и 100 БОЕ/животное с полным и неполным адъювантом Фрейнда («Sigma», США) соответственно с интервалом в 3–4 недели. Третью иммунизацию проводили неинактивированным вирусом в дозе 1000 БОЕ/животное, без применения адъюванта. Через 10–12 сут осуществляли тотальное кровопускание экспериментальных животных и получали сыворотки крови морских свинок по общепринятой методике.

Оценку специфической активности сывороток проводили в реакции непрямой иммунофлуоресценции. Готовили двукратные разведения сывороток на растворе ФСБ, которые наносили на подготовленные антигенные препараты. Препараты помещали во влажную камеру и выдерживали 30 минут при температуре 37°C, затем промывали ФСБ и дистиллированной водой, подсушивали при комнатной температуре и наносили двукратные разведения контрольных сывороток. Препараты инкубировали в тех же условиях в течение 30 мин, промывали, высушивали. На препараты наносили соответствующие флуоресцирующие антивидовые иммуноглобулины (филиал «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России) в рабочем разведении, указанном на этикетке ампулы. После инкубации при 37°C в течение 30 мин препараты отмывали, высушивали при комнатной температуре и просматривали в люминесцентном микроскопе. Для исследований использовали микроскоп Nikon Eclipse 80 с объективом 40х. Фотографирование исследуемых препаратов осуществляли с помощью камеры Levenhuk C510NG. Регистрацию результатов исследований проводили визуально.

В качестве референс-сывороток к вирусам Ласса и Эбола использовали сыворотки человека: сыворотка к вирусу Ласса — № 95312, титр 1:128, Институт тропической медицины, Антверпен, Бельгия; сыворотка к вирусу Эбола — № 096023, титр 1:256, Центр по контролю над инфекционными заболеваниями, Атланта, США.

Для оценки специфичности набора использовали сыворотки лиц, выздоровевших после заболевания клещевым энцефалитом, лимфоцитарным хориоменингитом, геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. У всех переболевших клинический диагноз был подтвержден лабораторно.

Подготовлен набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции. В состав набора входят 5 предметных стекол с антигенсодержащим препаратом культуры клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса; 5 предметных стекол с антигенсодержащим препаратом культуры клеток Vero E6, инфицированных вирусом Эбола; сыворотка крови морской свинки, содержащая антитела к вирусу Ласса в рабочем разведении, 0,2 мл; сыворотка крови морской свинки, содержащая антитела к вирусу Эбола в рабочем разведении, 0,2 мл; конъюгат — антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченые ФИТЦ в рабочем разведении, 1,5 мл; конъюгат — антитела диагностические против иммуноглобулинов морской свинки, меченые ФИТЦ в рабочем разведении, 0,5 мл; концентрат цитратно-фосфатного буферного раствора (ЦФБ) × 25 — 20 мл и инструкция по применению.

Результаты и обсуждение

В качестве основного компонента при подготовке набора использовали суспензионные препараты антигенсодержащих клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса или вирусом Эбола и фиксированных на поверхности лунок предметных стекол, специально предназначенных для постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции. С помощью набора представляется возможным определять в сыворотках крови инфицированных пациентов антитела к возбудителям лихорадки Ласса или Эбола за счет взаимодействия с иммобилизованным на предметных стеклах антигеном. По рекомендациям ВОЗ эталон-

Таблица 1. Оценка специфичности и чувствительности набора для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции

Сыворотка крови	Количество	ИРИФ с антителами к вирусам	
		Ласса	Эбола
Сыворотка крови человека, перенесшего ГЛПС	12	–	–
Сыворотка крови человека, перенесшего КЭ	10	–	–
Сыворотка крови человека, перенесшего ЛХМ	7	–	–
Сыворотка крови человека к вирусу Ласса (№ 95312)	1	+	–
Сыворотка крови человека к вирусу Эбола (№ 096023)	1	–	+
Сыворотка крови морской свинки к вирусу Ласса	1	+	–
Сыворотка крови морской свинки к вирусу Эбола	1	–	+

Примечание. ГЛПС — геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, КЭ — клещевой энцефалит, ЛХМ — лимфоцитарный хориоменингит.

ным диагностическим препаратом считают сыворотку крови реконвалесцента из эпидемического очага заболевания [6]. Специфичность адсорбированного антигена проверяли методом непрямой иммунофлуоресценции с референс-сыворотками. В качестве референс-сывороток к вирусам Ласса и Эбола при оценке антигенсодержащих препаратов нами использованы сыворотки крови реконвалесцентов, перечисленные в разделе материалы и методы (табл. 1). Для вирусов Ласса (рис. 1) и Эбола (рис. 2) характерна локализация специфического антигена с четкой гранулярной структурой в цитоплазме клеток. Яркое изумрудно-зеленое гранулярное свечение большинства клеток при люминесцентном микроскопировании четко просматривается на фоне темного окрашивания структуры клеток в отличие от контрольных культур (рис. 3). Подготовленные антигенные препараты содержат от 30% антигенсодержащих клеток, что является показателем их пригодности для диагностических целей. Для оценки специфичности набора исследованы сыворотки крови пациентов с подтвержденными клиническими диагнозами заболеваний клещевым энцефалитом (КЭ), геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС), лимфоцитарным хориоменингитом (ЛХМ) (табл. 1).

Проведенные исследования выявили высокую чувствительность и специфическую активность разработанного диагностического набора.

Заключение

Своевременная диагностика особо опасных инфекций, вызванных вирусами Ласса и Эбола, является ключевым моментом в организации противоэпидемических мероприятий в случае завоза заболевания на территорию республики. Основным методом быстрого реагирования при выявлении геморрагических лихорадок, по-прежнему, является метод непрямой иммунофлуоресценции. С целью разработки набора для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции нами подготовле-

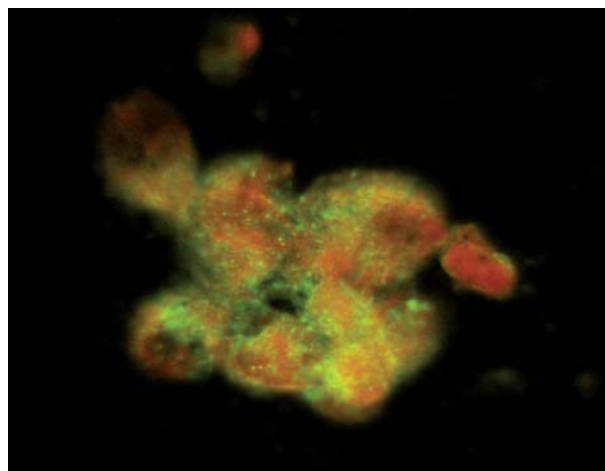


Рис. 1. Иммунофлуоресценция культур клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса. Увеличение ×400, окраска флуоресцинизоотиоцианатом (ФИТЦ).

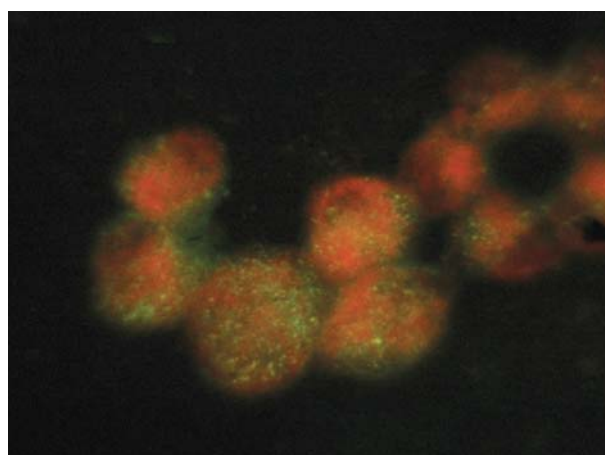


Рис. 2. Иммунофлуоресценция культур клеток Vero E6, инфицированных вирусом Эбола. Увеличение ×400, окраска флуоресцинизоотиоцианатом (ФИТЦ).

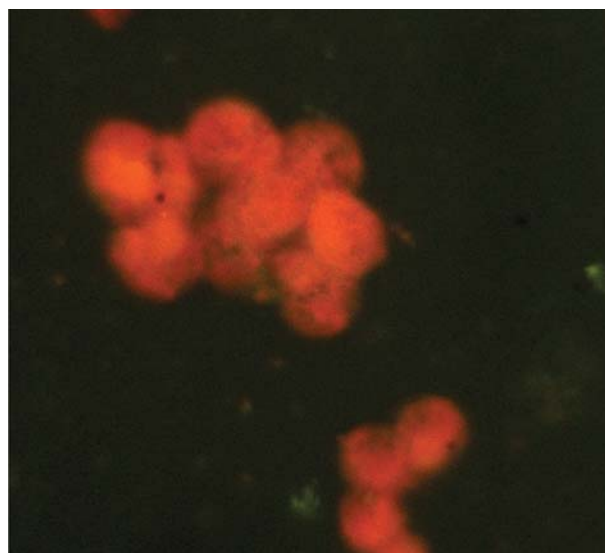


Рис. 3. Иммунофлуоресценция контрольных культур клеток Vero E6. Увеличение ×400, окраска флуоресцинизоотиоцианатом (ФИТЦ).

ны суспензионные препараты антигенсодержащих клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса и антигенсодержащих клеток Vero E6, инфицированных вирусом Эбола. Получены иммунные сыворотки крови морских свинок к вирусам Ласса и Эбола и оценена их специфическая активность в реакции непрямой иммунофлуоресценции. Подготовлен и зарегистрирован набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции «Белар-РИФ-ЛАС-ЭБОЛ». В связи со складывающейся эпидемиологической обстановкой по лихорадке Эбола в странах Западной Африки и необходимостью усиления настороженности в отношении возможных завозных случаев заболевания, нами разработана схема лабораторной диагностики геморрагической лихорадки Эбола с использованием набора для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции. Набор с успехом применен на практике при обследовании лихорадящих больных, прибывших из Нигерии, Сьерра-Леоне.

Выводы

Подготовлены суспензионные препараты антигенсодержащих культур клеток Vero E6, инфицированных вирусом Ласса и антигенсодержащих культур клеток Vero E6, инфицированных вирусом Эбола. Оценена специфическая активность антигенных препаратов с использованием референс-сывороток.

Получены иммунные сыворотки крови морских свинок к вирусам Ласса и Эбола и оценена их специфическая активность в реакции непрямой иммунофлуоресценции.

Об авторах

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Республика Беларусь, 220114, Минск, ул. Филимонова, 23.

Рустамова Лариса Михайловна. Ведущий научный сотрудник, руководитель Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, канд. мед. наук.

Семенов Сергей Федорович. Научный сотрудник лаборатории биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов.

Богданова Наталья Леонидовна. Научный сотрудник лаборатории биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов.

Владыко Александр Станиславович. Заведующий лабораторией биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных вирусных инфекций, д-р мед. наук, профессор.

Красько Анатолий Геннадьевич. Заведующий лабораторией биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов, канд. мед. наук, доцент.

Адрес для переписки: Рустамова Лариса Михайловна; larisa.rustamova@gmail.com

Подготовлен и зарегистрирован набор для выявления антител к возбудителям особо опасных вирусных инфекций Ласса и Эбола методом непрямой иммунофлуоресценции «Белар-РИФ-ЛАС-ЭБОЛ», который применен для обследования лихорадящих больных, прибывших в Республику Беларусь из стран Западной Африки (Нигерии, Сьерра-Леоне).

Литература

1. *Заявление ВОЗ по итогам совещания Комитета Международных медико-санитарных правил по чрезвычайной ситуации в отношении вспышки Эболы 2014 г. в Западной Африке.* Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/ebola-20140808/ru/>.
2. Красько АГ, Рустамова ЛМ, Счесленок ЕП, Семизон ПА, Владыко АС, Горбунов ВА. Диагностика и профилактика особо опасных вирусных инфекций в Республике Беларусь. В кн.: *Материалы XII Межгосударственной научно-практической конференции, Саратов, 25–26 ноября 2014 г. Саратов; 2014. С. 123.*
3. Frame ID, Verbrugge GP, Gill RG, Pinneo L. The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyd.* 1984; 78: 319–24.
4. Трофимов НМ, Климашевская ЛМ, Ерофеева НИ. Влияние некоторых физико-химических факторов на аренавирусы. *Вопросы вирусологии* 1981; (2): 240–2.
5. Устинова ЕН, Шестопалов АМ, Бакулина ЛФ, Чепурнов АА. Титрование вируса Эбола и Марбург по бляшкообразованию под полужидким агаровым покрытием. *Вопросы вирусологии* 2003; (1): 43–4.
6. Маркин ВА. Методология коллекционирования патогенов. *Вопросы вирусологии* 2010; (5): 4–9.

The kit for identification of antibodies against Lassa and Ebola viruses by indirect immunofluorescence

L. M. Rustamova, S. F. Semenov, N. L. Bogdanova, A. S. Vladiko, A. G. Krasko

Republican Research & Practical Centre for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

Timely diagnosis of particularly dangerous infections caused by viruses Ebola and Lassa is crucial in organization of anti-epidemic measures in the case of important of the disease on the territory of the Republic of Belarus. The main method of rapid response at revealing hemorrhagic fevers Lassa and Ebola still is the method of indirect immunofluorescence. In this work the elaboration of the kit for detection of antibodies to excitors of extremely dangerous viral infection Lassa and Ebola by indirect immunofluorescence method is described.

Key words: extremely dangerous viral infections; arenaviruses; Lassa virus; filoviruses; Ebola virus; antibody, the method of indirect immunofluorescence.

For citation: Rustamova LM, Semenov SF, Bogdanova NL, Vladiko AS, Krasko AG. The kit for identification of antibodies against Lassa and Ebola viruses by indirect immunofluorescence. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 115–119.

References

1. WHO statement after the meeting of the Committee of the International Health Regulations Emergency in relation to outbreaks of Ebola in 2014 in West Africa. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/ebola-20140808/ru/> (in Russian).
2. Krasko AG, Rustamova LM, Scheslenok EP, Semizhon PA, Vladyko AS, Gorbunov VA. Diagnosis and prevention of dangerous viral infections in the Republic of Belarus. In: Proceedings of the XII Inter-State scientific-practical conference, Saratov, 25–26 November 2014. Saratov; 2014. P. 123 (in Russian).
3. Frame ID, Verbrugge GP, Gill RG, Pinneo L. The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyd.* 1984; 78: 319–24.
4. Trofimov NM, Klimashevskaya LM, Erofeeva NI. The influence of some physical and chemical factors on arenaviruses. *Voprosy virusologii* 1981; (2): 240–2 (in Russian).
5. Ustinova EN, Shestopalov AM, Bakulina LF, Chepurnov AA. Titration of the Ebola virus and Marburg on the plaque under the semi-liquid agar surface. *Voprosy virusologii* 2003; (1): 43–4 (in Russian).
6. Markin VA. The methodology of collecting pathogens. *Voprosy virusologii* 2010; (5): 4–9 (in Russian).

Authors

The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Republic of Belarus, 23 Filimonova Street, Minsk, 220114, Republic of Belarus.

Rustamova LM. Leading researcher, head of Specialized collection of viruses and bacteria, pathogenic for humans. Candidate of Medical Sciences.

Semenov SF. Researcher of Laboratory of biosafety with the collection of pathogens.

Bogdanova NL. Researcher of Laboratory of biosafety with the collection of pathogens.

Vladyko AS. Head of Laboratory of biotechnology and immunodiagnostics of especially dangerous virus infections. Doctor of Medical Sciences, professor.

Krasko AG. Head of Laboratory of biosafety with the collection of pathogens. Candidate of Medical Sciences, docent.

Разработка метода определения биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro*

Н. А. Гаврилова¹, С. А. Черепушкин², Н. В. Рыкалина², Ю. И. Обухов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Министерства образования и науки Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 03.03.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

Разработан метод оценки биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro* на культуре чувствительных клеток TF-1. Исследованы особенности измерения и расчета биологической активности эритропоэтинов с различным уровнем гликозилирования в тестах *in vivo* и *in vitro*. Диапазоны линейного ответа клеточной линии на эритропоэтин и его гипергликозилированный аналог отличались и составляли (0,39–0,56 нг/мл) и (3,1–12,5 нг/мл) соответственно. Проведенный анализ полученных результатов показывает возможность применения клеточного теста для сопоставления и количественной оценки активности аналогов эритропоэтина в международных единицах стандарта биологической активности (МЕ), принятых для эритропоэтина.

Ключевые слова: биологическая активность; эритропоэтин; дарбэпоэтин; клеточная линия TF-1; пролиферативный ответ.

Библиографическое описание: Гаврилова НА, Черепушкин СА, Рыкалина НВ, Обухов ЮИ. Разработка метода определения биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro*. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 120–124.

Препараты рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) и его аналогов до сих пор являются одними из наиболее распространенных в медицинской практике биотехнологических лекарственных средств [1]. В последнее десятилетие были получены и нашли широкое применение так называемые пролонгированные формы эритропоэтина с повышенной биологической активностью [2–5]. Активно разрабатываются аналоги эритропоэтина в виде гибридных молекул, обладающие рядом других, в том числе цитопротекторных функций [5, 6]. Биологические функции препаратов эритропоэтинового ряда определяются, прежде всего, способностью взаимодействовать с рецепторами клеток-предшественников эритроидного ряда и стимулировать их дифференцировку, а также структурой молекул, которая определяет конечную эффективность препарата, способствуя оптимизации его фармакокинетических параметров.

Биологическая активность является одним из основных параметров качества эритропоэтина и определяется в соответствии с рекомендациями Европейской фармакопеи *in vivo* путем измерения числа ретикулоцитов в крови экспериментальных животных [7]. Активность эритропоэтина определяется в единицах международного стандарта, распространяемого Европейским директором по качеству медицинских препаратов [8]. В то же время, в нормативных документах РФ в настоящее время метод определения биологической активности препаратов эритропоэтинового ряда не регламентирован. Серьезную проблему представляет также отсутствие в России собственного государственного стандартного образца (ГСО) на эритропоэтин [9]. Кроме того, зарегистрированные за рубежом и на российском рынке препараты аналогов эритропоэтина, такие как Аранесп фирмы «Амджен Европа Б. В» (Нидерланды), имеют дозировки без указания величины гемопозитической активности. Таким образом, ряд препаратов одной терапевтической группы в отсутствии единой системы из-

мерений невозможно сопоставить по основному параметру качества — биологической активности.

С другой стороны, трудоемкость и вариабельность результатов определения активности *in vivo*, связанная с объективными трудностями воспроизводимости результатов в живом организме, диктует необходимость разработки других способов измерения активности белков эритропоэтинового ряда, например, с использованием культур клеток, более легко стандартизуемых по параметрам воспроизводимости и надежности, и не менее чувствительных. Применение этих методов особенно актуально на этапе получения новых рекомбинантных молекул, описания их свойств, а также выбора клонов продуцентов и разработки технологических процессов [5, 10, 11]. Несмотря на невозможность полноценной оценки биологических функций белков, эти методики позволяют определить подлинность и антигенную структуру белка по его способности взаимодействия с рецептором-мишенью. Кроме того, зависимость скорости пролиферации чувствительных клеток от количества ЭПО, добавленного в ростовую среду может быть оценена с помощью колориметрического теста. В зарубежной практике примером использования теста *in vitro* являются Аранесп («Амджен Европа Б. В», Нидерланды) [4], гибридные молекулы ЕРО-Fc [12, 13] и другие.

Во ФГУП ГосНИИгенетики разработан метод определения биологической активности ЭПО и его аналогов в культуре клеток *in vitro* с использованием клеточной линии TF-1 ATCC CRL-2003. Целью настоящего исследования была оценка возможности использования клеточного теста для определения биологической активности ЭПО, а также разработка формата методики для определения биологической активности эритропоэтинов с различным уровнем гликозилированности.

Материалы и методы

Стандартные и исследуемые белки. В качестве стандартного образца использовали препарат эталонного рекомбинантного эритропоэтина человека Erythropoietin BRP (EPO(BRP) E1515000), распространяемый Европейским директором по качеству медицинских препаратов. Измерение биологической активности проводили в образцах коммерческих препаратов Эпостим (ООО «Фармапарк», Россия) и Аранесп («Амджен Европа Б. В», Нидерланды).

Биологическую активность *in vivo* для препаратов Аранесп и Эпостим определяли в экспериментах с лабораторными мышами BALB/c (питомник ГУ НЦБТ РАМН «Столбовая», самки, 20–22 г), которые проводили в соответствии с методическими рекомендациями Европейской фармакопеи [7]. Эксперименты выполняли с использованием проточного гемоцитометра-анализатора ADVIA 120 (Bayer Diagnostics («Simens»), Германия) и программы обработки данных Multispecies Software 2120. В качестве стандартного образца использовали препарат эталонного рекомбинантного эритропоэтина человека Erythropoietin BRP (EPO(BRP) E1515000), распространяемого Европейским директором по качеству медицинских препаратов. Для определения биологической активности (стимуляция генерации ретикулоцитов у нормоцитемических мышей) животным вводили подкожно по 0,5 мл раствора, содержащего 80, 40 или 20 МЕ/мл стандарта EPO(BRP) или по 0,5 мл двукратных разведений анализируемых белков. В предварительных экспериментах был найден диапазон разведений, позволяющий получать линейный ретикулоцитарный ответ. По истечении четырех суток со дня инъекции в крови подопытных животных инструментально измеряли число ретикулоцитов и их процентное соотношение с количеством зрелых эритроцитов (RET %).

Биологическую активность *in vitro* определяли в культуре чувствительных к эритропоэтину клеток линии TF-1 ATCC CRL-2003.

Клетки линии TF-1 (ATCC CRL-2003) культивировали при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂, в среде RPMI (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («GE Healthcare Life Sciences HyClone Laboratories», США), гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия) до концентрации 1 мг/мл и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) («ReproTech EC Ltd», Великобритания) в конечной концентрации 2 нг/мл. Пересев клеток выполняли каждые 2–3 сут. Концентрация клеток в культуре составляла от 30 до 500 тыс. кл/мл и не превышала 700 тыс. кл/мл. Для проведения использовали клетки, подготовленные по особой схеме (описание в тексте). Подготовленные клетки вносили в лунки 96-луночного планшета, содержащие по 50 мкл приготовленных разведений стандартного или испытуемого образца ЭПО (максимальная концентрация 50 нг/мл, каждая концентрация в 4 повторах), а также ростовой среды, в качестве контроля. Планшет инкубировали в течение 68–72 ч при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂. После окончания инкубации в каждую ячейку планшета, включая ячейки для контроля среды, прибавляли по 10 мкл субстратной смеси WST-1 («Roche Diagnostics», США). Далее инкубировали планшет при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂ в течение не менее 2 и не более 5 ч при визуальном контроле развития окраски. Затем измеряли оптическую плотность в лунках планшета при длине волн 450 нм на планшетном спектрофотометре.

Для расчета специфической активности для стандартного и испытуемых образцов по результатам тестов *in vivo* или *in vitro* в программе Microsoft Excel строили зависимость между логарифмом концентрации (в нг/мл) испытуемого и стандартного растворов и специфическим ответом в виде пролиферативного (оптическая плотность) или гемопозитического (количество ретикулоцитов, %) ответа. Полученная для стандартного и испытуемого препарата зависимость имела вид:

$$A = a \cdot \lg C + b,$$

где A — уровень биологического сигнала; C — концентрация раствора в нг/мл; b — угол наклона регрессионной прямой; a — свободный член уравнения регрессии.

Далее вычисляли концентрацию испытуемого белка, которая вызывает такое же биологическое действие, как и каждая доза стандартного белка с известной величиной биологической активности.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования было проведено измерение биологической активности двух коммерческих препаратов Эпостим («ООО Фармапарк», Россия) и Аранесп («Амджен Европа Б. В», Нидерланды) в тесте *in vivo* относительно стандарта гемопозитической активности EPO(BRP). Измеренная биологическая активность препарата эритропоэтина (Эпостим) соответствовала заявленной производителем спецификации и составляла 1005 МЕ/мл. Препарат дарбэпоэтина с указанной производителем дозировкой 500 мкг/мл разводили до концентраций 0,05; 0,1; 0,2 мкг/мл в соответствии с определенным в более ранних исследованиях диапазоном линейной зависимости ретикулоцитарного ответа от концентрации пролонгированных форм эритропоэтина [5, 6]. Рассчитанное значение активности препарата Аранесп составляло около 523767 МЕ/мл или 1047534 МЕ/мг белка. Полученное значение согласуется с данными других исследователей, которые оценивали гемопозитическую активность дарбэпоэтина как в 5 и более раз превосходящую активность эритропоэтина [4, 12]. На рисунке 1 представлены графики, характеризующие полученные линейные зависимости для стандартного белка, образцов коммерческих эритропоэтина и дарбэпоэтина.

Полученные результаты были использованы при постановке клеточного теста *in vitro*. Перед использованием в тесте по определению специфической активности клетки проходили так называемую стадию «голодания»: инкубацию в течение 22–26 ч в среде с минимальным содержанием сыворотки без добавления ГМ-КСФ и других факторов роста. Клетки, прошедшие стадию голодания, отмывали от культуральной среды путем центрифугирования при 1200 об/мин, отбора супернатанта и ресуспендирования осадка клеток в холодном растворе Хенкса без фенолового красного. Процедуру повторяли три раза. После третьей процедуры центрифугирования клеточный осадок суспендировали в таком объеме ростовой среды (без ГМ-КСФ), чтобы получившаяся концентрация клеток была в пределах 600–800 тыс. кл/мл. Данный формат метода подготовки клеточной суспензии был разработан в результате отдельного исследования по выбору оптимальных условий проведения эксперимента с соотношением уровней сигналов фона и максимального пролиферативного ответа не менее 1.

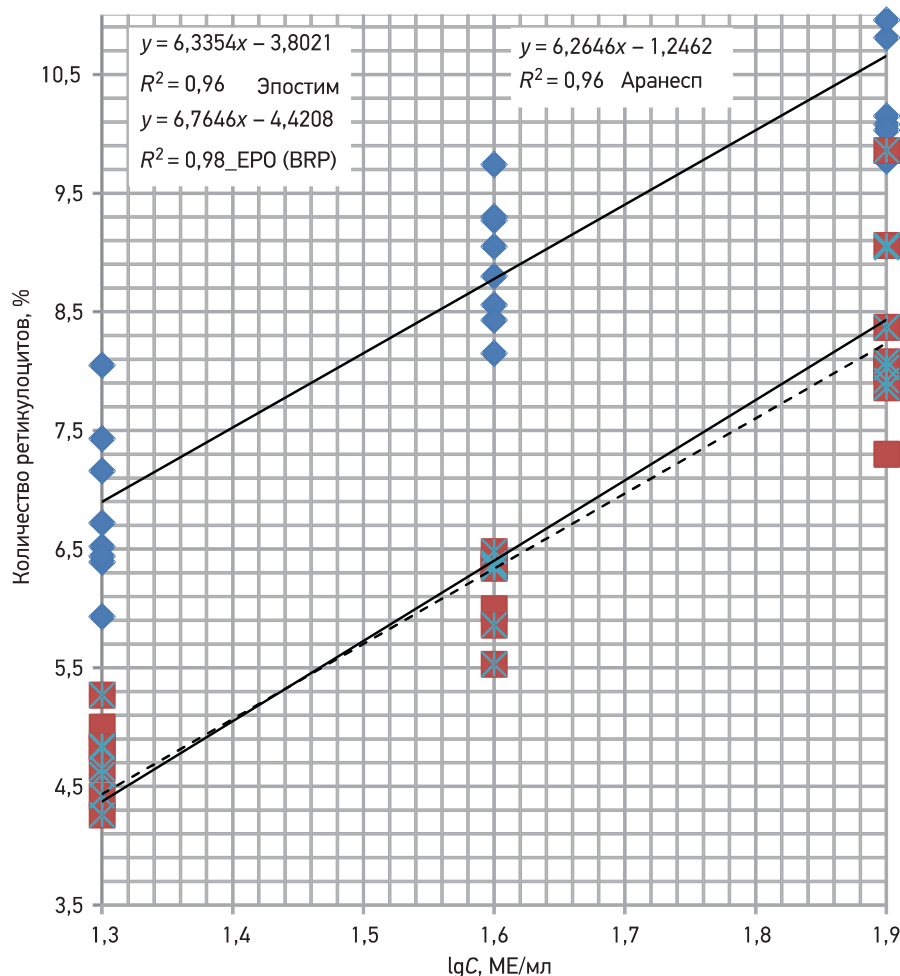


Рис. 1. Графическая зависимость уровня биологического ответа у мышей от концентрации стандартного образца эритропоэтина (EPO(BRP)), исследуемого образца препарата Эпостим и образца препарата Аранесп.

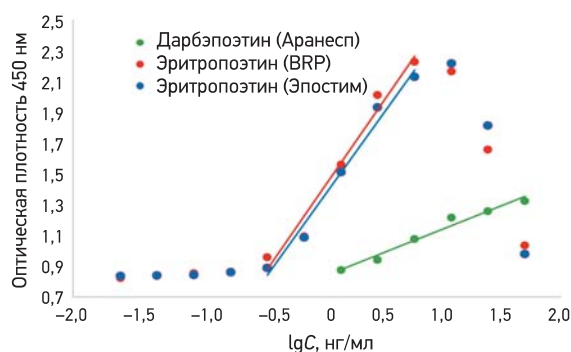


Рис. 2. Графическая зависимость уровня биологического ответа клеточной линии TF-1 от концентрации стандартного образца эритропоэтина (EPO(BRP)), исследуемого образца препарата Эпостим и образца препарата Аранесп.

Оба исследуемых препарата Эпостим и Аранесп были разведены кратно в соответствии с их биологической активностью до концентраций, соответствующих линейному диапазону пролиферативной активности, определенной

Таблица 1. Изменение активности препарата Аранесп при ускоренном хранении при температуре 25°C

Длительность хранения препарата, сутки	Активность, МЕ/мг	Активность, % от исходного результата определения
0	1047534	100,0
1	876785	83,7
7	675659	64,5
14	677754	64,7

Примечание. В графе активность указано среднее значение, полученное по результатам трех повторностей одного эксперимента.

ранее для EPO(BRP) и составляющей (0,39–6,25 нг/мл). Графические зависимости уровня пролиферативного ответа от логарифма концентрации белка представлены на рисунке 2.

Концентрация эритропоэтина, необходимая для инициации пролиферативного ответа чувствительной линии TF-1, почти в 10 раз ниже, чем для дарбэпоэтина. Этот результат полностью соответствует данным литературы о более слабой аффинности дарбэпоэтина к рецептору-мише-

ни, что обусловлено структурными изменениями белка и, прежде всего, его гипергликозилированием [12], а также результатам, полученным для обоих белков в экспериментах *in vivo*.

Таким образом, величина биологической активности препаратов эритропоэтинового ряда с разным уровнем гликозилирования не может быть прямо рассчитана по активности ЕРО(BRP) в рамках одного теста. Требуется наличие соответствующего стандартного образца, с тем же уровнем взаимодействия с рецептором чувствительных клеток или внутреннего стандартного образца, предварительно оцененного в единицах МЕ.

Тем не менее, с целью подтверждения возможности использования клеточного пролиферативного теста для оценки биологической активности препаратов эритропоэтинового ряда с различным уровнем гликозилирования, было проведено исследование с ускоренным хранением коммерческого препарата Аранесп и мониторингом в клеточном тесте изменения его активности. Результаты представлены в таблице 1. В условиях хранения, несоответствующих специфицированным, при температуре 25°C в течение 14 суток, активность препарата Аранесп изменялась с 1047534 до 677754 МЕ/мл. Конечный результат был подтвержден соответствующим измерением активности в тесте на мышах.

Заключение

Таким образом, эритропоэтин и его гликозилированный аналог взаимодействуют с рецептором, вызывая пролиферацию чувствительных клеток TF-1, что позволяет проводить сопоставление биологической активности белков эритропоэтинового ряда с различным уровнем гликозилирования.

Диапазоны линейного ответа клеточной линии на эритропоэтин и его гипергликозилированный аналог различаются и составляют (0,39–1,56 нг/мл) и (3,1–12,5 нг/мл) соответственно.

Результат клеточного пролиферативного теста может быть оценен количественно в единицах биологической активности, аналогично результатам метода *in vivo*. Разработанный метод позволяет сопоставить активность препарата эритропоэтина со стандартным образцом с аттестованной активностью и произвести расчет его активности в МЕ/мл. Препараты гипергликозилированных аналогов эритропоэтина, таких как Аранесп также могут быть оценены в соответствии с принятой для эритропоэтинов системой единиц измерения. Дальнейшие исследования и оценка основных валидационных характеристик клеточ-

ного теста позволят оценить возможность его применения не только для исследовательских целей, но и для оценки качества и стандартизации препаратов ЭПО.

Литература

1. Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007; **109**(3): 868–3.
2. Macdougall IC, Eckardt K-U. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential treatments for anaemia. *Lancet* 2006; **368**(9539): 947–53.
3. Cossar JD, Lawrence M, Donald S. Pegylated erythropoietic compounds. WO2004009627; 2004.
4. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater *in vivo* potency than recombinant erythropoietin. *Exp Hematol*. 2003; **31**(4): 290–9.
5. Joung CH, Shin JY, Koo JK, Linn JJ, Wang JS, Lee SJ, et al. Production and characterization of long-acting recombinant human albumin-EPO fusion protein expressed in CHO cell. *Protein Expr Purif*. 2009; **68**(2): 137–45.
6. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**(41): 14907–12.
7. European Pharmacopoeia 8.0 / 8.4. «Erythropoietin Concentrated Solution».
8. List of European Pharmacopoeia Reference Standards. Available from: <http://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-ordere-catalogue>.
9. Яковлев АК, Гайдарова ЛА, Алпатова НА, Лобанова ТН, Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ. и др. Этапы стандартизации препаратов эритропоэтинов. *Биопрепараты* 2015; (4): 17–20.
10. Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, et al. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol*. 1989; **140**(2): 323–34.
11. Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, et al. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol*. 2004; **32**(12): 1146–55.
12. Гаврилова НА, Черемных АМ, Бобренёва РА, Аскерова ЕВ, Калинин ТИ, Булушова НВ и др. Гемопоэтическая активность и фармакокинетика гибридных белков ЕРО-Fc, ЕРО-Fcneo и Alb-EPO — производных эритропоэтина человека. *Биотехнология* 2012; (5): 38–49.
13. Черемных АМ, Аскерова ЕВ, Бобренёва РА, Гаврилова НА, Калинин ТИ. Гибридный белок на основе рекомбинантного эритропоэтина человека, обладающий пролонгированным действием (варианты), и способ его получения. Патент Российской Федерации, № 2515914; 2013.

Об авторах

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

Гаврилова Наталья Андреевна. Аналитик 1-й категории Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Обухов Юрий Иванович. Начальник Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Министерства образования и науки Российской Федерации. Российская Федерация, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

Черепушкин Станислав Андреевич. Научный сотрудник отдела медицинской биотехнологии.

Рыкалина Наталия Владимировна. Научный сотрудник лаборатории иммунологии.

Адрес для переписки: Гаврилова Наталья Андреевна; Gavrilova@expmed.ru

The development of a method for determining the biological activity of erythropoietin preparations *in vitro*

N. A. Gavrilova¹, S. A. Cherepushkin², N. V. Rykalina², Yu. I. Obukhov¹

¹ Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² State Research Institute of Selection of Industrial Microorganisms of The Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Moscow, Russia

The method for the assessment of biological activity of erythropoietin preparations *in vitro* on TF-1 sensitive cells culture has been developed. The special characteristics of measurements and calculations of the biological activity of erythropoietin with different levels of glycosylation *in vivo* and *in vitro*. Linear response ranges for cell lines to erythropoietin and its hyperglycosylated analogue differ and make (0.39–0.56 ng/ml) and (3.1–12.5 ng/ml), respectively. The results have shown the possibility of using cellular test for comparing and assaying the activity of erythropoietin analogues in standard international units of biological activity (IU) set for erythropoietin.

Key words: biological activity; erythropoietin; darbepoetin; cell line TF-1; proliferative response.

For citation: Gavrilova NA, Cherepushkin SA, Rykalina NV, Obukhov Yul. The development of a method for determining the biological activity of erythropoietin preparations *in vitro*. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 120–124.

References

1. Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007; **109**(3): 868–3.
2. Macdougall IC, Eckardt K-U. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential treatments for anaemia. *Lancet* 2006; **368**(9539): 947–53.
3. Cossar JD, Lawrence M, Donald S. Pegylated erythropoietic compounds. *WO2004009627*; 2004.
4. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater *in vivo* potency than recombinant erythropoietin. *Exp Hematol.* 2003; **31**(4): 290–9.
5. Joung CH, Shin JY, Koo JK, Linn JJ, Wang JS, Lee SJ, et al. Production and characterization of long-acting recombinant human albumin-EPO fusion protein expressed in CHO cell. *Protein Expr Purif.* 2009; **68**(2): 137–45.
6. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**(41): 14907–12.
7. European Pharmacopoeia 8.0/8.4. «Erythropoietin Concentrated Solution».
8. List of European Pharmacopoeia Reference Standards. Available from: <http://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-orders-catalogue>.
9. Yakovlev AK, Gayderova LA, Alpatova NA, Lobanova TN, Batuashevili TA, Simutenko LV, et al. The stages in standardizing erythropoietin preparations. *Biopreparaty* 2015; (4): 17–20 (in Russian).
10. Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, et al. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol.* 1989; **140**(2): 323–34.
11. Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, et al. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol.* 2004; **32**(12): 1146–55.
12. Gavrilova NA, Cheremnykh AM, Bobreneva RA, Askerova EV, Kalinina TA, Bulushova NV, et al. The haemopoietic activity and pharmacokinetics of EPO-Fc, EPO-Fcneo and Alb-EPO fused proteins, derivatives of human erythropoietin. *Biotechnologiya* 2012; (5): 38–49 (in Russian).
13. Cheremnykh AM, Askerova EV, Bobreneva RA, Gavrilova NA, Kalinina TA, Jurin VL. Hybrid protein based on recombinant human erythropoietin, having prolonged action (versions), and method of its production. Patent RF, № 2515914; 2013 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky Boulevard, 8-2, Moscow, 127051, Russian Federation.

Gavrilova NA. Analyst of Office of expertise of antibacterial medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Obukhov Yul. Head of Office of expertise of antibacterial medical immunobiological preparations of Center of expertise and control of medical immunobiological preparations.

Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 1st Dorozhnyj Proezd, 1, Moscow, 117545, Russian Federation.

Cherepushkin SA. Researcher of Department of medical biotechnology.

Rykalina NV. Researcher of Laboratory of immunology.



Юрий Витальевич Олефир (к 55-летию со дня рождения)

Yuri Vitalievich Olefir (on the 55th anniversary)

11 апреля 2016 года исполнилось 55 лет доктору медицинских наук, старшему научному сотруднику генеральному директору ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации Юрию Витальевичу Олефиру.

Ю. В. Олефир родился 11 апреля 1961 года в городе Родинское Донецкой области. В 1984 г. с отличием окончил Военно-медицинскую академию им. С. М. Кирова. После окончания учебы Ю. В. Олефир проходил военную службу в частях и учреждениях Министерства обороны Российской Федерации.

В 1984–1987 гг. — начальник медицинской службы атомной подводной лодки Северного флота. Участник пяти дальних походов.

В 1987–1989 гг. — обучение в клинической ординатуре Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова по специальности «Урология».

В 1989–2008 гг. Ю. В. Олефир служил в Центральном клиническом авиационном госпитале Министерства обороны Российской Федерации (Москва). Прошел путь от младшего научного сотрудника до начальника урологического центра — ведущего уролога госпиталя, полковника медицинской службы.

В 2008 году прошел профессиональную переподготовку в Российском государственном медицинском университете Росздрава по специальности «Организация здравоохранения и общественное здоровье».

Ю. В. Олефир обладает большим опытом управленческой работы в здравоохранении: в 2008 г. Юрий Виталье-

вич работал председателем комитета по охране здоровья населения Новгородской области, в 2008–2009 гг. — министром здравоохранения Иркутской области, в 2010–2012 гг. — советником губернатора Самарской области. С 2012 до 2015 гг. занимал должности заместителя генерального директора, генерального директора ОАО «РТ-Биотехпром» Госкорпорации «Ростех».

Ю. В. Олефир возглавил ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в апреле 2015 года. Под руководством Ю. В. Олефира в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России происходит модернизация ключевых направлений деятельности в области экспертной оценки лекарственных средств и научной работы учреждения, унификация научных подходов при проведении экспертизы лекарственных средств, совершенствование лабораторной базы испытательных центров учреждения, внедрение показателей эффективности научной деятельности и результатов исследований при решении прикладных вопросов экспертной работы.

Юрий Витальевич Олефир — автор 230 публикаций, трех патентов на изобретения, подготовил четырех кандидатов медицинских наук.

За высокие достижения в профессиональной деятельности Ю. В. Олефиру присвоено почетное звание «Заслуженный врач Российской Федерации». Он награжден орденом Почета, медалью Жукова, медалями «70 лет Вооруженных Сил СССР», «300 лет Российскому Флоту», «В память 850-летия Москвы» и другими ведомственными наградами.



Наталья Ивановна Лонская
(к 75-летию со дня рождения)

Natalia Ivanovna Lonskaya
(on the 75th anniversary)

2 мая 2016 г. исполнилось 75 лет со дня рождения кандидата медицинских наук Наталии Ивановны Лонской.

Наталья Ивановна родилась в 1941 г. После окончания школы поступила в Первый Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова, который успешно закончила в 1965 г. по специальности медико-санитарное дело.

После аспирантуры Наталья Ивановна начала трудовую деятельность в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова.

В 1971 году поступила на работу в ГИСК им. Л. А. Тарасевича, где прошла трудовой путь от младшего научного сотрудника до заведующего лаборатории гриппа, парагриппа и других ОРЗ. С апреля 2011 года по апрель 2016 года работала в должности главного эксперта Управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Наталья Ивановна Лонская, являясь высококвалифицированным специалистом с богатым научным опытом в области разработки и внедрения в практику вакцин для профилактики гриппа, неоднократно участвовала в международных конференциях различного уровня, представляя достижения отечественной науки в области профилактики гриппа, парагриппа и других острых респираторных вирусных инфекций мировому научному сообществу.

Н. И. Лонская является заместителем председателя Межведомственной комиссии по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам Российской Федерации. Лично и в соавторстве опубликовала более 120 научных работ.

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

ПЕЧАТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, РЕАЛИЗУЕМЫЕ ФГБУ «НЦЭСМП»



Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.

Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

Цена: 934,63 руб.

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты)

Часть вторая / Под ред. А. Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 536 с.

Цена: 1489,71 руб.

Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств.

Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 244 с.

Цена: 622,80 руб.

Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / Под ред. А. Н. Миронова. —

М.: Гриф и К, 2012. — 212 с.

Цена: 622,80 руб.



(Цены указаны с учетом НДС)

Информацию о порядке приобретения можно получить по телефонам:

+7 (499) 241-90-73; +7 (964) 538-92-94; +7 (964) 538-92-95

или на официальном сайте ФГБУ «НЦЭСМП» www.regmed.ru

ПЕЧАТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, РЕАЛИЗУЕМЫЕ ФГБУ «НЦЭСМП»



**Руководство по экспертизе
лекарственных средств. Том I. —**
М.: Гриф и К, 2013. — 328 с.

Цена: 748,30 руб.



**Руководство по экспертизе
лекарственных средств. Том II. —**
М.: Гриф и К, 2013. — 280 с.

Цена: 711,47 руб.

(Цены указаны с учетом НДС)

Информацию о порядке приобретения можно получить по телефонам:
+7 (499) 241-90-73; +7 (964) 538-92-94; +7 (964) 538-92-95
или на официальном сайте ФГБУ «НЦЭСМП» www.regmed.ru

