

## **Метрология, стандартизация, контроль**

УДК 615.1

### **Вопросы стандартизации клеток-продуцентов для биотехнологии**

© 2017 г. А.П. ОРЛОВ\*, Т.М. КАРГИНА, Е.И. САКАНЯН, И.Г. ОСИПОВА, Н.В. ШАЛУНОВА, Е.М. ПЕТРУЧУК

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Москва 127051

e-mail: orlovap@expmed.ru\*

Поступила 12.08.2016

Принята в печать 24.10.2016

Культуры клеток все шире используются в качестве продуцентов в биотехнологических процессах производства лекарственных препаратов. В связи с этим своевременной и актуальной является разработка стандартного подхода к показателям качества клеток-продуцентов. Впервые разработаны и включены в Государственную фармакопею РФ (XIII издание) две общие фармакопейные статьи (ОФС) «Требования к клеточным культурам-субстратам производства биологических лекарственных препаратов» и «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК». Они созданы на основе единого подхода к фармакопейному анализу клеток-продуцентов и с учетом международных требований зарубежных фармакопей и рекомендаций ВОЗ. В настоящей статье изложены основные положения этих ОФС.

*Ключевые слова:* биотехнология, государственная фармакопея, клетки-продуценты, клеточные линии, общая фармакопейная статья, система банка клеток, стандартизация.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-81-87

Широкое применение в различных областях медицины находят такие препараты биотехнологического производства, как цитокины, интерфероны, моноклональные антитела, рецепторы клеток, рекомбинантные факторы плазмы крови, вакцины на основе рекомбинантных белков – HBsAg, белков вируса папилломы – и др. В целях стимуляции биотехнологических исследований и производств таких препаратов Правительство РФ утвердило «Комплексную программу развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» ([http://www.bio-economy.ru/upload/bio\\_2020\\_programme.pdf](http://www.bio-economy.ru/upload/bio_2020_programme.pdf)). Основная задача программы – исследование, разработка и внедрение в отечественное производство более 50 инновационных лекарственных средств, получаемых с использованием биотехнологических процессов. Выполнение поставленных задач невозможно без создания нормативно-правовой базы, позволяющей стандартизовать подходы к оценке качества биотехнологических лекарственных препаратов (БтЛП). В этой связи первостепенную важность

приобретает создание российских фармакопейных стандартов качества БтЛП, в частности клеток-продуцентов ЛС, для внесения их в Государственную фармакопею Российской Федерации. Необходимо было выработать не только единый подход к фармакопейному анализу клеток-продуцентов, но и гармонизировать его с требованиями ведущих зарубежных фармакопей.

Целью данной статьи было описание результатов исследования методических подходов к формированию фармакопейных стандартов качества клеток-продуцентов, основанных на современных научных достижениях и требованиях зарубежных регламентирующих документов.

Согласно руководству ВОЗ, качество, безопасность и эффективность БтЛП в высшей степени зависят от надлежащего контроля исходных материалов, включая источник их получения; при этом значительное внимание должно уделяться вопросам контроля качества линий клеток-хозяев и клеток-продуцентов<sup>1</sup>. В основе технологии производства биопрепаратов лежит многоступенча-

---

*Список сокращений:* БтЛП – биотехнологические лекарственные препараты; ГБК – главный банк клеток; ЕФ – Европейская фармакопея; ЛС – лекарственное средство; ОФС – общая фармакопейная статья; РБК – рабочий банк клеток.

<sup>1</sup> 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, 2013.

тый сложный процесс, начинающийся с выбора клетки-хозяина, создания экспрессирующей конструкции, далее включающий культивирование клеток-продуцентов, выделение белка, его очистку, анализ качества полученного препарата, создание лекарственной формы и заканчивающийся ее хранением и транспортировкой. В процессе фосфорилирования, гликозилирования нативных протеинов и присоединении к ним липидов происходит их значительная модификация, что позволяет получать БтЛП с необходимыми свойствами<sup>2</sup>.

Активной субстанцией биотехнологических лекарственных препаратов являются рекомбинантные белки, пептиды и их производные, получаемые с помощью систем экспрессии на основе бактерий, дрожжей, клеток млекопитающих и др., в геном которых встроены гены, кодирующие соответствующие целевые белки. Экспрессирующая конструкция должна быть стабильна, т.е. по-

следовательность ДНК, введенная в клетку-хозяина, должна соответствовать требуемому белку и сохраняться в клеточной культуре без изменений до конца продуктивного периода, о чем сказано в руководстве ICH «Q5B»<sup>2</sup>.

В данном руководстве представлен анализ экспрессионных конструкций клеток, применяемых в производстве белковых продуктов и полученных методом рекомбинантной ДНК. Определены характеристики этих конструкций и конечных очищенных белков, регламентированы общие требования к системе банков клеток и возрасту *in vitro* клеток, используемых в производстве.

В табл. 1 представлены примеры используемых в мировой биотехнологической практике клеток-продуцентов и получаемых активных веществ. Поддержание исходных клеточных свойств и контроль за их состоянием осуществляют национальные коллекции разных стран, в том числе

Таблица 1

### Клетки-продуценты различной таксономической принадлежности и получаемые активные вещества<sup>3</sup>

#### Producer cells of various taxonomic affiliation and obtained biologically active compounds<sup>3</sup>

Клетка-хозяин	Характеристика клетки-продуцента	Продуцируемые вещества
<b>Бактерии</b>		
Эубактерии: <i>Escherichia, Clostridium, Thermoanaerobacter, Bacillus, Acetobacter, Pseudomonas, Brevibacterium</i>	Высокая скорость размножения; способность некоторых видов к анаэробному росту; лабильный метаболизм	Инсулин, цитокины, пероксидаза хрена, витамины
Актиномицеты: <i>Streptomyces, Saccharopolispora, Micromonospora, Nocardia</i>	Высокая скорость пролиферации при наличии мицеллярного грибоподобного строения	Аминогликозидазы, тетрациклин, актиномицины, макролиды, акзамицины, лечебные диагностические бактериофаги
<b>Грибы</b>		
<i>Saccharomyces, Candida, Aspergillus, Cephalosporium, Fusarium, Penicillium</i>	Большой размер клетки, устойчивость к фагам	Витамины, факторы роста человека, $\alpha$ -амилаза, протеазы
<b>Клетки млекопитающих</b>		
Клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки селезенки мыши (MEL), клетки африканской зеленой мартышки (COS)	Необходимость сложного состава питательной среды и строгого контроля условий культивирования	Эритропоэтин, факторы свертываемости крови, моноклональные антитела, вакцины, интерфероны

<sup>2</sup> Q5B6: Quality of Biotechnological Products: Analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products. International Conference on Harmonisation (ICH), 1995.

<sup>3</sup> [http://www.cytspb.rssi.ru/eotk/pinaev\\_26\\_ru.pdf](http://www.cytspb.rssi.ru/eotk/pinaev_26_ru.pdf)

Российская межведомственная объединенная коллекция клеточных культур<sup>3</sup>. Наиболее распространенными продуцентами являются клетки бактерий, обладающие относительно высокой скоростью размножения и способностью усваивать широкий спектр питательных веществ. Производство биотехнологических лекарственных средств с использованием клеток-продуцентов основано на системе банков клеток, включающей главный банк клеток (ГБК) и рабочий банк клеток (РБК) производителя лекарственного средства. ГБК содержит производные отобранного клеточного клона, несущего экспрессирующую конструкцию; РБК включает гомогенную суспензию клеток, полученных на определенном уровне пассажа культивированием клеток из одного или более контейнеров ГБК; РБК используют для производства каждой серии готового продукта.

Нуклеотидная последовательность гена должна быть подтверждена не только на стадии посевного материала, но и на конечной стадии роста клеточной популяции (при использовании для ферментации в производстве новой серии ГБК и РБК). Банки клеток должны быть охарактеризованы с учетом требований к экспрессирующей конструкции. Одновременно с этим проводят контроль молекулярной целостности экспрессируемого гена и значимых фенотипических и генотипических маркеров штамма-продуцента, охватывающих все этапы его жизненного цикла, микробиологическую чистоту, в том числе присутствие посторонних вирусов, эндотоксинов и микоплазм. При оценке клеточных линий животных и банков клеток животного происхождения необходимо руководствоваться рекомендациями ВОЗ по оценке культивируемых клеток животных, используемых в качестве субстратов в производстве лекарственных средств биологического происхождения, и инструкциями для описания характеристик банков клеток<sup>1,3</sup>.

Информация о клетках-продуцентах, используемых для получения биологических лекарственных препаратов (включая иммунобиологические и биотехнологические), представлена в статьях Европейской фармакопеи (ЕФ (8 изд.), 5.2.3. «Клетки-продуценты для производства вакцин для медицинского применения»; «Генно-инженерные рекомбинантные продукты»; «Моноклональные антитела для медицинского применения»).

В этих статьях содержатся определения используемых терминов, приведены требования к качеству сред и веществ животного и человеческого происхождения, к посевным культурам. Там же указана необходимость подтверждения соответствующей жизнеспособности линий клеток, их стабильности, отсутствия посторонних инфекционных агентов, отсутствия канцерогенности (линии *MRC-5*, *WI-38* и *RFhL-2* признаны неканцерогенными и не требуют исследований; испытания не проводятся на колониях клеток, о которых известно или предполагается, что они канцерогенны); также должно быть доказано, что диплоидные линии клеток действительно имеют диплоидный набор хромосом. Особое внимание в указанных статьях уделено вопросам системы банков клеток – ГБК и РБК. В монографии «Клетки-продуценты для производства вакцин для медицинского применения» приведен перечень испытаний, их этапов и используемых подходов в зависимости от происхождения линий культур клеток (табл. 2).

В фармакопее США (USP 34) в статье «Биотехнологические препараты» в разделе «Типовые производственные процессы» рассматривается производство на основе прокариотических (бактериальных) и эукариотических (клетки млекопитающих и дрожжей) систем, основные вопросы контроля процесса выращивания клеток и создания культур клеток. Показано, что «проблемы в области производства белков в бактериях» в основном касаются вопросов обеспечения генетической стабильности, постоянного выхода продукта и доказательства отсутствия загрязнения случайными организмами. Эти вопросы возникают и в процессе производства при использовании эукариотических культур клеток. Кроме того, при использовании иммортализованных клеточных линий необходимо решать проблему предполагаемого присутствия онкогенных ДНК/РНК и примесей белков из питательных сред<sup>4</sup>.

В фармакопеях ЕФ и США в настоящее время присутствует целый ряд требований, предъявляемых к культуре клеток при выборе биотехнологического продуцента. Эти требования включают такие показатели, как безвредность, подлинность и чистота, отсутствие посторонних агентов, устойчивость к фагам и вирусам, скорость роста и накопления биомассы, стабильность по произво-

<sup>4</sup> <http://www.usp.org/support>

**Испытания линии клеток в соответствии с Европейской фармакопеей (8 изд.)  
«Клетки-производители для производства вакцин для медицинского применения»**

**Trials of cell lines in accordance with European Pharmacopoeia Monograph 8  
“Producer cells for medical vaccines production”**

Критерии и методы оценки	Первичные клетки	ГБК	РБК	Клетки на максимальном уровне удвоения популяции или выше
<i>Подлинность и чистота культуры</i>				
Морфология	+	+	+	+
Подлинность: метод «пальцевых отпечатков» нуклеиновой кислоты: биохимический (например, изоферментный анализ), иммунологический (например, гистосовместимость), анализ цитогенетических маркеров	+	+	+	+
Кариотип (диплоидные линии клеток)	+	+	+*	+
Продолжительность жизни (диплоидные линии клеток)	–	+	+	–
<i>Наличие посторонних агентов</i>				
Бактерии и грибы	–	+	+	–
Микоплазмы	–	+	+	–
Спироплазмы (линии клеток, выделенные от насекомых)	–	+	+	–
Электронная микроскопия (линии клеток, выделенные от насекомых)	–	+*	–	+
Внешние агенты в клеточных культурах	–	–	+	–
Испытания на клеточных культурах	–	–	+	–
Совместное культивирование	–	–	+*	+
Испытания на животных и яйцах	–	–	+*	+
Специфические испытания на наличие возможных посторонних агентов в зависимости от источника происхождения клеток	–	–	+*	+
Ретровирусы	–	+*	–	+
<i>Канцерогенность</i>				
Канцерогенность	+*	–	–	+

*Примечание:* (+) – испытания должны проводиться; (–) – испытания не проводятся.

\*Испытания проводятся с использованием клеток на максимальном уровне удвоения популяции, применяемом на производстве, или выше его.

Trials are performed on primary cells using them at the state of maximum duplication or more used in a process.

длительности, чувствительность к условиям культивирования, использование оптимальных питательных сред, безопасность.

Таким образом, анализ европейского и мирового опыта в области регулирования обращения биотехнологических лекарственных средств позволил сформировать базис для создания национальных стандартов качества клеточных культур, используемых для производства биологических препаратов в нашей стране.

В Государственной фармакопее Российской Федерации общие фармакопейные статьи для культур клеток и методов их анализа не были представлены. Вместе с тем, наличие биотехнологических препаратов на отечественном фармацевтическом рынке и их востребованность в медицинской практике создают предпосылки для разработки общих фармакопейных статей.

Впервые в фармакопейной практике в РФ разработаны две общие фармакопейные статьи (ОФС): «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратов»<sup>5</sup> и «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК»<sup>6</sup>. Эти статьи сформулированы с учетом современных научных достижений и гармонизированы с требованиями аналогичных зарубежных нормативных документов. В данных ОФС приведены четкие определения используемых терминов («клетка-хозяин», «вектор», «штамм-производитель», «экспрессирующая конструкция», «главный банк клеток» (ГБК), «рабочий банк клеток» (РБК) и др.), так как только унификация терминологической системы позволяет однозначно понимать регламентируемые стандарты и положения. В указанных ОФС изложены общие требования к исходным материалам и веществам, в том числе животного и человеческого происхождения, качеству сред и посевным культурам. Далее обсуждаются основные положения данных фармакопейных статей.

В ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратов»<sup>5</sup> установлены требования к первичным и перевиваемым (диплоидным и гетероплоидным) клеточным культурам человека и животных, применяемым в качестве субстратов в производстве биологических лекарственных средств и их контроле. В данной статье

для клеточных линий животных и человека, а также клеток микроорганизмов определены значимые критерии, по которым клетки должны быть охарактеризованы в полном объеме; указано на необходимость документированного подтверждения чистоты линии культуры клеток, не контаминированной клетками других типов. Источник клеток, из которого был получен клеточный субстрат, подлежит четкой идентификации. Рекомендована аттестованная система клеточных банков ГБК и РБК с указанием методов исследования для подтверждения их характеристик. Регламентировано количество пассажей, через которые прошли клетки, приведены условия работы и хранения банков ГБК и РБК.

В соответствии с разработанной ОФС «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратов» для подтверждения подлинности и чистоты клеточной культуры проводят следующие испытания: 1) изучение морфологии клеточных культур (методом световой микроскопии, в некоторых случаях используют также электронную микроскопию); 2) определение видовой идентичности – идентификация клеточных культур, определение и изучение стабильности клеточных признаков (методами электрофореза, кариологического анализа хромосом и молекулярно-генетическими методами, например ПЦР); 3) определение внутривидовой и видовой контаминации клеточных культур (анализ полиморфизма изоферментов). Такими изоферментами являются глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, нуклеозидфосфорилаза и др. Изоферменты можно выявить при помощи электрофореза в полиакриламидном и агарозном гелях или на пленках из ацетата целлюлозы; 4) определение стабильности кариотипа культур клеток (методом кариологического анализа хромосом в соответствии с требованиями к кариологическим параметрам видовой идентификации клеток). Кариологический анализ хромосом проводят на фиксированных препаратах в период митотической активности клеток, используя методы дифференциального окрашивания; 5) оценка генетического соответствия клеточной линии (секвенирование полноразмерного генома, метод мультиплексной ПЦР с видоспецифическими праймерами). Метод основан на выявле-

<sup>5</sup> Государственная фармакопея РФ XIII изд., Т. 2, 2016, ОФС.1.7.2.0011.15. «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратов».

<sup>6</sup> Государственная фармакопея РФ XIII изд., Т. 2, 2016 г. ОФС.1.7.2.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

нии видоспецифических участков митохондриальной ДНК (мтДНК) в области гена, кодирующего субъединицу 1 цитохром *c*-оксидазы (СОХ1) и цитохром *b*-оксидазы с помощью видоспецифичных праймеров с детекцией результатов методами электрофореза и ПЦР в реальном времени. Реакцию проводят в соответствии с инструкциями по применению тест-систем после валидации методики; б) идентификация клеточной линии иммунологическими методами (реакция гемагглютинации, метод смешанной агглютинации, реакции гемадсорбции, иммунофлуоресценции, определение антигенов гистосовместимости и различий в чувствительности клеток разных видов животных к отдельным группам вирусов). Существует также ряд методов, основанных на применении специфического связывания антител с клеточной поверхностью: иммунный лизис (с использованием антител к нежелательным клеткам, например, фибробластам в популяции эпителиальных клеток), направленная доставка цитотоксина, сортировка клеток с активацией флуоресценции или на магнитных гранулах с иммобилизованными антителами.

Оценка туморогенной активности клеток, согласно ОФС<sup>5</sup> проводят с применением двух биологических систем: *in vivo* – на бестимусных мышцах линии *Balb/c* с мутацией по гену *nude* (генотип *nu/nu*); и *in vitro* методом инвазивности в органные культуры кожи куриного эмбриона.

Оценку онкогенности клеточной культуры *in vivo* проводят путем введения клеточного лизата новорожденным бестимусным мышам, новорожденным крысам или хомякам, новорожденным мышам линии *NIH Swiss*. Онкогенная активность клеточного субстрата может быть обусловлена соответствующими компонентами, присутствующими в клетке (клеточной или вирусной ДНК, РНК или трансформирующими белками). Присутствие онкогенной ДНК контролируют методом ПЦР.

Испытание БтЛП на присутствие посторонних вирусов проводят на клеточных культурах, лабораторных животных и куриных эмбрионах в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов»<sup>7</sup>.

Испытание клеточных культур на стерильность выполняют, как указано в ОФС «Стерильность»<sup>8</sup>. Если субстратом производства является

культура клеток птичьего происхождения, тестирование на присутствие микобактерий туберкулеза проводят на адекватных питательных средах в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов»<sup>7</sup>. Выявление микоплазм осуществляют микробиологическим и цитохимическим методами (ОФС «Испытание на присутствие микоплазм»<sup>9</sup>). В качестве дополнительного метода может быть применена ПЦР в соответствии с методикой, изложенной в ОФС «Полимеразная цепная реакция»<sup>10</sup>.

Испытание на эндогенные ретровирусы проводят электронно-микроскопическим методом, с помощью ПЦР, а также методами иммунофлюоресценции или ИФА с использованием адекватных тест-систем в соответствии с инструкциями по применению после валидации методики. Если в тестируемых клетках обнаруживается активность обратной транскриптазы, необходимо провести испытание на определение инфекционной способности, связанной с реплицирующимся вирусом. Электронная микроскопия позволяет изучать ультратонкие срезы клеток и получать изображения вирусов-контаминантов.

Сыворотка крови крупного рогатого скота и трипсин, применяемые при культивировании клеточных культур, должны быть проверены на присутствие вирусов, бактерий (включая микоплазмы) и грибов. Тестирование происходит в соответствии с ОФС «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов»<sup>7</sup>.

Оценка стерильности сыворотки и трипсина и присутствия в них микоплазм осуществляют с помощью методов, изложенных в ОФС «Стерильность»<sup>8</sup> и ОФС «Испытание на присутствие микоплазм»<sup>9</sup>.

В качестве дополнительных методов для выявления вирусов (парвовируса свиней типа 1, цирковирусов свиней 1 и 2 типов, аденовирусов, вирусов, вызывающих гастроэнтериты, вирусов энцефалита свиней и др.) возможно использование иммуноферментного анализа (ИФА) и ПЦР в соответствии с инструкциями по применению после валидации методик.

Для инактивации потенциальных вирус-контаминантов возможно использование  $\gamma$ -облуче-

<sup>7</sup> Государственная фармакопея РФ XIII издание, Том 2, 2016 г. ОФС.1.7.2.006.15 «Испытание вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов».

<sup>8</sup> Государственная фармакопея РФ XIII издание, Том 1, 2016 г. ОФС.1.7.2.4.0003.15 «Стерильность».

<sup>9</sup> Государственная фармакопея РФ XIII издание, Том 2, 2016 г. ОФС.1.7.2.0031.15 «Испытание на присутствие микоплазм».

<sup>10</sup> Государственная фармакопея РФ XIII издание, Том 2, 2016 г. ОФС.1.7.2.0013.15 «Полимеразная цепная реакция».

ния в дозах, которые не изменяют биологические свойства облучаемых материалов.

Таким образом, в ГФ (XIII издание) впервые включены две ОФС: «Требования к клеточным культурам – субстратам производства биологических лекарственных препаратов» и «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК», разработанные с учетом совре-

менных требований и гармонизированные с зарубежными фармакопеями (ЕФ и фармакопея США).

Включенные в ГФ фармакопейные стандарты качества собраны в общие фармакопейные статьи для клеток-продуцентов (включая методы их анализа) и отражают комплексный подход к обеспечению качества и стандартизации биотехнологических лекарственных препаратов.

## Standardization of Producer Cells in Biotechnology

A.P. ORLOV\*, T.M. KARGINA, E.I. SAKANYAN, I.G. OSIPOVA, N.V. SHALUNOVA, and E.M. PETRUCHUK

*The Research Center for Expertise of Medical Products, 127051, Moscow Russia*

*e-mail: orlovap@expmed.ru\**

Received August 12, 2016

Accepted October 24, 2016

**Abstract** – Cell cultures have increasingly been used as producers in biotechnological processes of medicine manufacturing. In view of this, the problem of a standard approach to qualitative characteristics of producer cells seems to be timely and relevant. Two Pharmacopoeia General Monographs (PGMs) «Requirements to cell substrates for the production of biological drugs» and «Drugs produced by recombinant DNA technology» were developed for the first time and included in the State Pharmacopoeia of Russian Federation (XIII edition). They were created on the basis of the unified approach to the pharmacopoeia analysis of producer cells and taking into account international requirements of foreign Pharmacopoeias and recommendations of the World Health Organization. The present article discusses main aspects of the above PGMs.

*Key words:* biotechnology, cell bank system, cell lines, Pharmacopoeia General Monograph, producer cells, standardization, State Pharmacopoeia.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-3-81-87