

Критерии стандартизации клеточных препаратов для клинического использования

А.Ю. Устюгов^{1,2}, Е.Ю. Осипова^{1,3}, С.А. Румянцев¹⁻³

¹ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва;

²ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва;

³ГБОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)»
Министерства образования и науки России, Долгопрудный

Контакты: Сергей Александрович Румянцев s_rumyantsev@mail.ru

Использование различных клеточных препаратов прочно входит в технологии лечения многих заболеваний. Технологии производства и контроля качества такого продукта являются фактически биотехнологическим исследованием с множеством необходимых критериев. Система контроля качества в России отсутствует, поэтому авторами статьи предпринята попытка проанализировать и адаптировать критерии контроля качества GMP-производства клеточных препаратов FDA США и Евросоюза. Разработанная методика протестирована при приготовлении клеточных препаратов аллогенных и аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, подвергавшихся процедуре экспансии ex vivo для клинического использования в ряде экспериментальных терапевтических программ при онкогематологических заболеваниях у детей.

Ключевые слова: клеточные препараты, мезенхимальные стволовые клетки, ex vivo экспансия

Standardization criteria of cell preparation for clinical use

A. Yu. Ustyugov^{1,2}, E. Yu. Osipova^{1,3}, S. A. Rumyantsev¹⁻³

¹Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
Ministry of Health of Russia, Moscow;

²N.N. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow;

³Moscow Institute of Physics and Technology, Ministry of Education and Science, Dolgoprudny

Using of different cell preparations is an essential part of treatment of many diseases. Production technology and quality control of these products are actually biotechnology research with a variety of the necessary criteria. Quality control system in Russia is missing, so the authors attempt to analyze and adapt FDA and EU criteria for quality control GMP-producing cell preparations. The developed methodology has been tested on cell preparations of allogeneic and autologous mesenchymal stem cells undergoing ex vivo expansion for clinical use in a number of experimental therapeutic programs in pediatric hematologic malignancies.

Key words: cell preparations, mesenchymal stem cells, ex vivo expansion

В последнее время было предложено и введено в практику множество новых терапевтических методик, в том числе методик, связанных с ex vivo модификацией и возвращением в организм соматических клеток. Терапия соматическими клетками — это введение пациенту аутологичных, аллогенных или ксеногенных жизнеспособных клеток (отличающихся от входящих в состав компонентов крови), обработанных ex vivo. Производство препаратов для терапии соматическими клетками подразумевает культивирование ex vivo, экспансию и селекцию клеток, их обработку фармакологическими препаратами или внесение каких-либо других изменений в их биологические характеристики. Полученные клеточные препараты можно также использовать в целях диагностики или профилактики. Производителям клеточных препаратов необходимо придерживаться соответствия законодательным нормам, относящимся к терапии соматическими клетками и генной терапии.

Генная терапия — это разновидность терапевтического вмешательства, основанная на модификации генома живых клеток. Возможно внесение модификаций ex vivo с последующим введением клеток пациенту или введение генетического препарата напрямую пациенту с последующей in vivo модификацией генома. Если манипуляции с геномом клеток производятся ex vivo и измененные клетки вводятся в организм пациента, то такая терапевтическая методика рассматривается как разновидность терапии соматическими клетками. Модификация генома может быть направлена на достижение терапевтического или профилактического эффекта, либо маркировки клеток для последующей идентификации. Рекомбинантные ДНК-содержащие материалы, используемые при переносе генетической информации, рассматриваются как компоненты терапевтической методики и подлежат законодательной регуляции.

Терапевтическое воздействие

Терапевтический эффект методик, связанных с использованием соматических клеток, может основываться на имплантации клеток в качестве *in vivo* источника молекулярных продуктов, таких как ферменты, цитокины или факторы свертывания, инфузии активированных лимфоидных клеток, например лимфокин-активированных натуральных киллеров или инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, и имплантации модифицированных клеточных популяций, выполняющих различные биологические функции, например популяций гепатоцитов, миобластов или клеток островков поджелудочной железы.

Изначально генная терапия подразумевала введение измененных соматических клеток. Тем не менее разработаны новые подходы к генной терапии, например, введение напрямую ретровирусных векторов или генетического материала в другой форме. Изложенные ниже рекомендации относятся ко всем методам, хотя применяемые при тестировании методики могут отличаться.

Существует несколько путей введения используемых в терапевтических целях клеток. Например, можно произвести их инфузию или инъекцию, а также хирургическую имплантацию в виде агрегата или вместе с опорной структурой или капсулой. Любые формы материалов, используемых при создании опорной структуры, должны относиться к группе инертных материалов, дополнительных активных компонентов или медицинских устройств.

По причине потенциального взаимодействия между клетками и другими компонентами препарата дополнительные компоненты следует рассматривать как часть окончательного продукта, которую необходимо учитывать при проведении доклинических исследований.

Юридические аспекты

Во многих случаях биологические продукты — это сложная смесь компонентов, которой невозможно дать исчерпывающее определение. Необходим контроль качества на этапе производства и контроль качества итоговой продукции. При недостаточном контроле производственных процессов конечный продукт может содержать посторонние примеси или быть загрязнен, могут также наблюдаться скрытые (не выявляемые стандартными методами проверки на этапе производственного контроля) изменения биологических свойств или снижение стабильности продукта. По этой причине следует определить методы и реагенты, используемые при производстве продукта. Контроль качества необходим также при использовании клеточных банков и на всех важнейших промежуточных стадиях. Необходимо изучение общей воспроизводимости финального продукта и основных материалов, например, вектор-содержащих супернатантов.

Исследования I фазы, изучающие методы терапии, основанные на использовании соматических клеток,

должны быть достаточно безопасными и основанными на достоверных исследовательских данных. На ранних стадиях клинических исследований допустимо предоставление меньшего объема информации, чем на более поздних стадиях исследования метода; такой подход допустим при терапии жизнеугрожающих заболеваний. Основной массив данных должен относиться к безопасности применяемого метода.

На более поздних стадиях разработки необходимо предоставить данные о промежуточном тестировании продукта. Необходимо разработать количественный метод *in vivo* оценки биологической активности препарата, дополнительно изучается степень стабильности полученного препарата. Для лицензирования необходимы, помимо информации о безопасности, данные, свидетельствующие о клинической эффективности препарата.

Если в процессе разработки изменена форма препарата, то необходимо провести ее сравнение с предыдущей формой путем сравнения биологического потенциала и, если это возможно, оценки безопасности на доклиническом этапе. Если препарат, используемый на поздних стадиях исследования, значительно отличается от использованного на ранних стадиях, но результаты ранних стадий исследования имеют решающее значение для окончательной оценки, то необходимо продемонстрировать совместимость продуктов или рассмотреть возможность повторения исследований, принятых на ранних стадиях [1].

Разработка и тестирование клеточных популяций, применяемых для терапии

Забор клеток. Необходимо предоставить следующую информацию:

1. Типы клеток: тип (-ы) используемых клеток выделяются по их происхождению — аутологичные, аллогенные и ксеногенные. Необходимо предоставить информацию о ткани — источнике клеток и другие идентификационные данные.

2. Критерии выбора доноров: необходимо предоставить все значимые характеристики донора (-ов), в том числе возраст и пол. Минимизированные требования к аллогенным донорам — это соответствие требованиям для доноров компонентов крови. Необходимо описать тестовые процедуры и процедуры приема, а также все отклонения от процедур. При необходимости при составлении требований учитываются дополнительные рекомендации по отбору доноров органов и тканей. Критерии исключения должны основываться на возможности инфицирования ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирусами гепатита В и С, HTLV-1 или другими инфекционными агентами. Необходимо указать данные серологических и других диагностических тестов доноров, их клинические данные. В некоторых случаях следует принять меры для обеспечения наблюдения доноров и привести методы сбора данных и ведения записей и подробно описать эти меры.

При использовании аутологичных клеток необходимо учитывать дополнительные рекомендации по тестированию и маркировке дополнительных агентов. При использовании животных следует привести описание источников клеток, генетических особенностей и состояния популяции или колонии.

3. Тканевое типирование: если предполагается использование аллогенных доноров, то при необходимости включаются данные о типировании, например типировании полиморфизма групп крови. Необходимо рассмотреть значение типирования антигенов гистосовместимости (HLA I и/или II класса, иногда минорных антигенов) донора и реципиента, а также соответствующие процедуры и критерии.

При необходимости использования клеток от нескольких доноров следует уделить особое внимание их возможным взаимодействиям, иммунным реакциям или другим факторам, способным воздействовать на функцию клеток. Тестирование клеток от нескольких доноров может оказаться проблематичным. Клеточные препараты, полученные из нескольких источников, не будут соответствовать стандартным критериям.

4. Процедуры: необходимо предоставить данные о процедурах забора клеток, в том числе деталях расположения лаборатории, и используемых инструментах и материалах.

Процедуры культивирования клеток

1. Контроль качества: необходимо тщательное управление операциями по культивированию (качество материалов, контроль производства, экспертная оценка оборудования и мониторинг).

2. Среды для культивирования: необходимо определить критерии утверждения для всех сред и компонентов, в том числе критерии верификации чистоты сывороток и факторов роста, определения наличия примесей. Записи должны содержать подробное описание компонентов сред, их источников и номеров серий. Следует избегать использования компонентов сред, которые могут вызвать сенсибилизацию, например, некоторых сывороток животного происхождения, отдельных белков и компонентов крови, обладающих групповой специфичностью. Чтобы обеспечить воспроизводимость характеристик культур тканей, необходимо обеспечить одинаковое происхождение, чистоту и эффективность используемых факторов роста.

Не рекомендуется использовать антибиотики из группы бета-лактамов из-за риска развития сенсибилизации.

3. Дополнительные компоненты: необходимо предоставить документацию, свидетельствующую о том, что клетки получают, накапливаются и подвергаются лабораторным воздействиям в условиях, способных обеспечить минимальное загрязнение и минимум примесей. При длительном культивировании необходимо периодически проводить тесты на загрязнение. Тесты

должны гарантировать отсутствие бактерий, дрожжевых и плесневых грибов, микоплазм и вирусов.

4. Мониторинг природы и гетерогенности клеток: чтобы обеспечить контроль природы и гетерогенности клеточных культур, необходимо использовать соответствующие производственные и тестовые процедуры.

Методы и технические средства, используемые при культивировании клеток, должны быть рассчитаны на предотвращение контаминации одной культуры другой.

При культивировании клеток может произойти значительное изменение свойств клеточной популяции или быть зафиксирован избыточный рост отдельного типа клеток, изначально представленного в небольшом количестве. Чтобы своевременно выявлять эти изменения, необходима качественная оценка культур, например путем мониторинга мембранных антигенов или биохимических маркеров. Выбранный метод идентификации должен быть способен выявить контаминацию культуры или ее замещение другим типом клеток, культивируемых в лаборатории. Необходимо задать допустимые нормы клеточного состава культуры. В качестве количественного метода оценки функции клеток может послужить иммунофенотипирование клеточных популяций. Функциональный мониторинг основных свойств клеток следует производить при манипуляциях с популяцией клеток с соблюдением периодичности. Тест на природу клеточной популяции должен включать в себя верификацию совместимости донор-реципиент и иммунофенотипирование.

5. Тестирование терапевтического агента: если желаемый терапевтический эффект клеточного препарата основан на синтезе клетками определенного вещества, то необходимо предоставить доказательства присутствия активной формы этого вещества.

6. Долговечность культуры: необходимо определить наиболее значимые характеристики культивируемой клеточной популяции (фенотипические маркеры, например мембранные антигены, функциональные свойства, биологическая активность) и оценить стабильность этих характеристик в культуре. Заданный профиль характеристик используется для оценки периода культивации.

Процедуры системы клеточных банков

Для использования при банкировании клеток, которые берутся для производства клеточных препаратов, или клеток, используемых при выращивании вирусных векторов, из одних и тех же источников (например, бактериальные клетки для производства плазмид или культуры клеток млекопитающих для культивации вирусных векторов) могут применяться системы Generation and Characterization of Master Cell Banks (MCB), Working Cell Banks (WCB) и Producer Cells Cell. При работе с этими культурами применяются системы формального банкирования

(часто это двуслойные системы). При описании банка клеток используются следующие параметры [1]:

1. Происхождение клеток: необходимо предоставить описание.

2. Процедуры: необходимо описать процедуры замораживания и размораживания клеток. Необходимо указать используемые криопротекторы (например, DMSO или глицерол). Необходимо указать число жизнеспособных клеток в размороженной культуре и условия хранения.

3. Тестирование: природу клеток необходимо подтвердить с помощью определения генных или фенотипических маркеров, а также часть популяции, экспрессирующую данные маркеры. При использовании трансдуцированных или вирус-продуцирующих клеток стабильность продукции вектора и культуры необходимо подтвердить с помощью тестов на активность белка, транскрибируемого с внедренного гена.

4. Тестирование на контаминацию микроорганизмами: необходимо подтвердить отсутствие контаминации МСВ биологическими агентами (бактериями, грибами, микоплазмами, посторонними вирусами).

При использовании бактериальных культур, несущих нужные плазмиды, тестирование на наличие бактериофагов не обязательно, но возможно при выявлении признаков снижения стабильности и продуктивности культуры.

5. Срок истечения годности: необходимо разработать план, включающий в себя демонстрацию срока, в течение которого клетки могут оставаться замороженными, сохраняя активность после размораживания.

6. Тестирование размороженных клеток: после размораживания и/или экспансии культуры клеток необходимо провести тестирование на природу и функциональную активность клеток. Необходимо сравнить долю жизнеспособных клеток и/или результаты количественных методов оценки функциональной активности до замораживания и после размораживания клеток. Необходимо подтвердить стерильность при оценке нескольких проб клеток.

При использовании системы WCB необходим ограниченный спектр генных и фенотипических маркеров. Ретенцию вектора и сохранение природы клеток необходимо подтверждать, так же как с МСВ, с помощью рестрикционного картирования или тестов на активность секретируемого белка. Необходимо дополнительное подтверждение отсутствия микробного или вирусного загрязнения [1].

Для производственных клеточных культур необходимо производить разовую оценку окончательной культуры на наличие новых контаминирующих агентов, которые могли быть внесены в культуру при ее росте, или свойств вирусного вектора. Спонсор исследования должен предоставить поэтапное расписание наиболее информативных и чувствительных тестов.

Допустимо использование отдельных процессов банкирования при клеточной терапии с индивидуальными условиями для каждого из пациентов, например при использовании аутологических клеток. Тем не менее не следует пропускать этап тестирования важнейших характеристик окончательного продукта.

Материалы, используемые при производстве

Материалы, используемые при *in vitro* манипуляциях, например антибиотики, сыворотки, протеин А, токсины, антитела, другие химические вещества или структурообразующие материалы, могут повлиять на безопасность, чистоту и терапевтическую активность конечного продукта. Необходимо предоставить определение этих продуктов и программу проверки, используемые в процессе производства. Если используемый материал относится к классу реагентов, то в программу проверки необходимо включить тестирование на безопасность, чистоту и активность компонента. При использовании компонентов для клинического применения может применяться сокращенная программа проверки. Материалы животного происхождения иногда необходимо тестировать на наличие примесей. Необходима сертификация этих компонентов в зависимости от страны происхождения на отсутствие опасности контаминации возбудителем губчатой энцефалопатии.

Необходимо задать предельные значения концентраций всех компонентов, которые могут обнаруживаться в конечном продукте. Необходимо предоставить результаты тестирования для подтверждения эффективности методик по удалению примесей и количественных методик (в том числе описание методов и их чувствительности). Некоторые из примесей (благодаря их связыванию или хранению в клетках) могут сохраняться в значимых количествах в конечной клеточной культуре. В этих случаях необходимо предусмотреть оценку их токсичности на животных или в соответствующих системах.

Окончательное тестирование препаратов для клеточной или генной терапии, в том числе клеток, подвергнутых *ex vivo* трансдукции генов для генной терапии

Конечный биологический препарат, а также процесс его производства и используемые материалы необходимо подвергнуть процедуре оценки качества. Необходимо определить характеристики конечного продукта и других элементов процесса производства, а также спектр значений для каждой из характеристик.

В качестве пробы биологического продукта расценивается определенный объем материала, смешанный в одной емкости. Эта концепция применима к соматическим клеткам и препаратам для генной терапии при планировании процедур тестирования образца. Это означает, что каждая из клеточных популяций, культур для производства вектора или другой препарат для кле-

точной терапии — это уникальное окончательное сочетание клеток, прошедшее процедуру тестирования образца. Препараты, предназначенные для введения одному реципиенту, отличаются от продуктов, произведенных крупными партиями; в этих случаях выбираются отдельные критерии для тестирования каждого из образцов. Степень воспроизводимости процедур определяется различиями между образцами.

Природа клеток. Количественное тестирование фенотипических и/или биохимических свойств используется для подтверждения природы клеток и оценки гетерогенности.

Терапевтический потенциал. Терапевтическое воздействие клеток (если известно) и/или синтезируемых ими продуктов определяется и обобщается в качестве меры их терапевтического потенциала.

Жизнеспособность. Определяется жизнеспособность клеток и задается ее нижнее пороговое значение.

Тестирование на наличие примесей. Тесты должны подтверждать отсутствие контаминации посторонними примесями и инфекционными агентами, например бактериями, грибами, микоплазмами и вирусами. Необходим свод правил для оценки отсутствия загрязнения микоплазмами при производстве, применимый в тех случаях, когда срок жизни конечного клеточного продукта перед введением пациенту слишком короток для традиционных методов исследования.

Чистота. Чистота или оценка уровня эндотоксинов при тестировании по методике LAL или другим подходящим методикам. Адекватность и точность методов тестирования на эндотоксины рассматривается для каждого отдельного случая. Следует удостовериться в том, что на результаты используемого теста на эндотоксины не влияют условия культивирования клеток.

Проверка общей безопасности. Тестирование на общую безопасность необходимо выполнять для конечного продукта. При необходимости могут использоваться модифицированные процедуры.

Банки замороженных клеток. При размораживании замороженных клеток для дальнейшего введения пациенту или экспансии необходимо тестирование каждого из замороженных образцов. Могут применяться правила, изложенные в части, посвященной банкированию клеток.

Дополнительные сферы применения: добавление к клеточным препаратам токсинов или радиоизотопов

Можно предложить несколько областей терапевтического и диагностического применения клеточных препаратов, модифицированных с помощью радиоизотопных меток или связывания с биологически активными веществами, например токсинами. Клетки могут использоваться как средство доставки не только тех веществ, которые синтезируются самой клеткой, но и других продуктов. Новые факторы, влияющие на безопасность, могут быть связаны с местом имплантации клеток и локализацией радионуклида или токсина,

а также с метаболическими свойствами клеток. Всегда следует ожидать и принимать в расчет эти изменения.

Доклиническая оценка препаратов для клеточной терапии [1]

Общие принципы. Доклинические исследования направлены на выявление фармакологических и токсических эффектов при использовании препаратов в терапии не только до начала клинического исследования, но и в процессе его проведения. У этих исследований следующие задачи: определить безопасные стартовые дозы и разработать схему их эскалации, определить органы-мишени токсических эффектов и группы пациентов, которым необходимо проводить мониторинг, а также группы риска развития токсических эффектов клеточного или генного препарата.

При дизайне доклинических исследований необходимо учесть следующее: 1) используемая клеточная популяция или класс вектора, 2) животные и физиологические состояния, больше всего подходящие для планируемых показаний к применению и класса продуктов, и 3) планируемые дозы, пути назначения и терапевтические режимы. Параметры, которые следует изучить, описаны ниже.

Учитывая уникальность и разнообразие продуктов, используемых для клеточной и генной терапии, обычные тесты на фармакологические свойства и токсические эффекты часто бывают неприменимы для определения безопасности и биологической активности этих агентов. В рамках дизайна исследований должны рассматриваться такие вопросы, как специфичность трансдуцированного гена, перmissивность для инфицирования вирусными векторами и сравнительная физиология. Доступные биологические модели, имитирующие заболевание, на терапию которого направлено воздействие, могут оказаться полезными в целях достижения достаточной безопасности и получения данных об эффективности до того, как препараты будут испытаны в рамках клинических исследований.

Если продукт можно сравнить с агентами, опыт использования которых уже есть или для которых смена экспрессионной кассеты, вероятно, не повлияет на токсичность или диссеминацию вектора, то объем доклинического исследования может быть меньше.

Если план исследования подразумевает быстрый набор пациентов, то ему должны предшествовать доклинические исследования.

Выбор лабораторных животных и использование альтернативных биологических моделей. Не для каждого из заболеваний бывают доступны биологические модели, пригодные для испытания системы для клеточной или генной терапии. В доклинических исследованиях фармакологических свойств и безопасности следует пользоваться наиболее подходящими и фармакологически адекватными биологическими моделями. Наиболее подходящими признаются те виды животных, биологический ответ которых на терапию более всего

схож с реакцией людей. Например, вектор, экспрессирующий человеческий цитокин, тестируется на тех животных, у которых экспрессируется рецептор для этого цитокина, аффинность которого не уступает аффинности человеческого рецептора и активация которого вызывает те же эффекты [1, 2].

Соматические клетки и терапия генно-модифицированными клетками. 1. Биологическая/фармакологическая активность *in vivo*: процедуру трансдукции, дозу размноженных или генетически модифицированных клеток и путь их назначения необходимо оценить в рамках доклинического исследования. Фармакологические исследования на животных могут предоставить полезную информацию о функциях *in vivo*, времени выживания клеток и их распределении.

2. Токсикологические исследования: тестирование на безопасность размноженных, активированных или генетически модифицированных соматических клеток следует проводить на животных. Данные по распределению и персистенции клеток *in vivo* служат и для определения безопасности их применения. По крайней мере, у подопытных животных необходимо проводить мониторинг общего состояния, биохимических показателей сыворотки и гематологических показателей. Необходимо провести гистопатологическую оценку тканей органов-мишеней.

Применение клеток напрямую *in vivo*. Разрабатывается ряд векторов для применения напрямую у людей. При этом может встать ряд вопросов, связанных с безопасностью, которые будут рассмотрены в данном разделе. При исследовании всех токсических эффектов и распределения клеток, в том числе описанные ниже исследования тканей гонад, необходимо использовать конечный продукт, потому что дополнительные компоненты (например, липосомы или вещества, влияющие на содержание электролитов или кислотность) могут повлиять на токсичность или распределение препаратов.

Специфические особенности для каждого из подклассов векторов необходимо исследовать отдельно для каждого из случаев.

1. Путь назначения: путь назначения векторов может повлиять на их токсичность *in vivo*. При оценке безопасности в ходе доклинических исследований необходимо пользоваться тем же путем и способом назначения, который будет применяться в клиническом исследовании. Если этого трудно достигнуть при использовании небольших животных, то путь и метод назначения должны как можно больше соответствовать тому, который планируется использовать в клинике. Например, интрапульмональная инстиляция аденовирусных векторов трансназально хомячкам или мышам — это допустимая альтернатива интрапульмональному введению через бронхоскоп.

2. Выбор подопытных животных: при выборе для доклинического токсикологического исследования вида животных следует руководствоваться их чувствительностью к инфекции и сходством патофизио-

логических последствий инфицирования вектором, а также их пригодностью в качестве биологической модели для конструктора вектора. Часто грызуны демонстрируют более характерную патологическую картину вирусного поражения, чем обезьяны. Если оценивать активность вектора удобно, то на основании исследования биологической модели можно собирать данные о безопасности и о патологических изменениях в ответ на введение вектора.

3. Выбор дозы: выбор доз вектора для доклинического исследования должен быть основан на изучении его активности в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Необходимо определить дозу, которой недостаточно для достижения клинического эффекта, дозу, обладающую излишней токсичностью, а также несколько промежуточных доз, проверенных на контроле, например на животных, которые не подвергались воздействию вирусов или получили вирус-носитель. Для продуктов, доза которых ограничена, или тех, токсичность которых невелика, максимальная доза составляет максимальную из использованных на стадии доклинических исследований. Доклиническая оценка безопасности должна включать в себя не менее одного режима доз, эскалированного по сравнению с запланированным в клиническом исследовании; дозировки, необходимые для определения безопасного для пациентов диапазона, могут отличаться для каждого из применяемых классов векторов, данные, полученные на различных моделях, также могут не совпадать. Схема расчета доз на основании веса или площади поверхности тела схожа у разных биологических видов. Полученная информация может помочь определить безопасные границы доз для использования в клинических исследованиях и выявить пригодную схему эскалации дозировок.

4. Токсикологическое тестирование: у подопытных животных необходимо проводить мониторинг общего состояния, биохимических показателей сыворотки и гематологических показателей, а также гистопатологическую оценку тканей органов-мишеней.

5. Распределение вектора в организме: рекомендуется проводить дополнительные исследования, направленные на изучение распределения вектора после его введения. Если это возможно, то лучше пользоваться запланированным путем введения. В исследовании можно использовать дополнительные группы животных, которым препарат вводится внутривенно, для демонстрации «наихудшего из возможных» вариантов диссеминированного распределения вектора. Перенос гена, помимо первоначального органа-мишени, в нормальные окружающие или отдаленные ткани должен оцениваться с помощью наиболее чувствительных методов определения персистенции гена. Дозы препарата выбираются в соответствии с известными токсическими эффектами. Если наблюдается аберрантная или непредвиденная локализация гена, то необходимо изучить его влияние на функцию ткани, в которой он персистирует.

а. Экспрессия продукта гена и индукция иммунного ответа

Экспрессия терапевтического продукта гена в ткани-мишени или другой ткани может быть связана с непредвиденными токсическими эффектами, которые следует изучить на стадии доклинических исследований. Важным фактором может стать воспалительный, иммунный или аутоиммунный ответ, индуцированный продуктом экспрессии гена. Срок проведения исследований на животных должен быть достаточно длительным, чтобы позволить проявиться этим эффектам. Иммунный ответ на вирусные или трансгенные белки может лимитировать полезный эффект клинического применения препарата.

б. Локализация вектора в репродуктивных органах

При назначении вектора напрямую следует оценить риск его персистенции в половых клетках. Необходимо проанализировать пробы яичек или яичников подопытных животных на наличие нуклеотидных последовательностей вектора. Если в клетках гонад выявляется вирусная ДНК, то следует оценить, не приводит ли это к последствиям, которые отличаются от наблюдаемых в соматических тканях; при этом можно использовать различные методики, не ограничиваясь выделением материала с помощью полимеразной цепной реакции *in situ* и т.д. Для выяснения степени внедрения вектора в половые клетки у взрослых особей, в том числе у самцов мышей, забираются образцы спермы.

6. Иммунный статус реципиента и его влияние на вектор: при оценке соотношения риск/преимущества продукта необходимо учитывать иммунный статус предполагаемых реципиентов, особенно если речь идет о вирусном векторе. Если исключение из протокола пациентов с иммунодефицитом недопустимо, то в ходе предварительного тестирования с целью оценки потенциального риска можно использовать животных в состоянии фармакологической иммуносупрессии, генетическими дефектами иммунной системы или новорожденных животных.

Эффективность использования технологии

Эффективность использования технологии оценена на примере приготовления индивидуальных клеточных препаратов аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК). В работе был использован метод, предложенный проф. А.Я. Фриденштейном в модификации проф. Е.Б. Владимирской [3, 4]. При использовании данного метода, начиная с 3-го пассажа, морфология культуры не менялась, МСК имели мономорфный вид и состояли из клеток веретенообразной формы, что соответствует гистологическому описанию МСК.

Оценивая дифференцировочные потенции клеток культуры МСК, получаемых в процессе длительного культивирования, мы определили, что способность клеток монослойной культуры к дифференцировке в адипоциты и остециты на ранних и поздних пассажах сохраняется, что является характерным свойством МСК.

Таким образом, мы стремились гистологически подтвердить, что в данной культуральной системе при использовании нами методики выделения и культивирования МСК костного мозга *in vitro* поддерживается рост МСК, а также сохраняется характерная способность МСК к дифференцировке в адипоциты и остециты на ранних и поздних пассажах [5].

По светооптическим характеристикам МСК как на ранних, так и на поздних пассажах представляли собой гомогенную популяцию крупных по размеру клеток, отличающуюся от гемопоэтических клеток.

В связи с отсутствием специфических маркеров для точной идентификации МСК принято идентифицировать МСК в культуре по определенной совокупности маркеров. Используя полученные данные при оценке экспрессии маркеров, характерных для гемопоэтических, эндотелиальных и мезенхимальных предшественников на ранних и поздних пассажах культивирования МСК, было показано, что при длительном культивировании МСК костного мозга на 3–4-м пассаже наблюдалась высокая экспрессия маркеров, характерных для МСК: CD90, CD105, CD166, CD73. Стромальные клетки костного мозга не несли маркеры CD45, CD34, CD133, CD3, CD19, CD25, CD38, CD45, CD106, CD31 (% положительных клеток < 5 %). С увеличением количества пассажей МСК из культур исчезают примеси гемопоэтических клеток (CD45⁺, CD34⁺, CD133⁺). При увеличении срока культивирования МСК до 10–12-го пассажа снижалось количество клеток, экспрессирующих CD90, CD105 и CD166.

Динамика изменения экспрессии маркеров, характерных для гемопоэтических предшественников и МСК, представлена на рис. 1–4.

Различий в экспрессии CD133 ($p = 0,77$) и CD34 ($p = 0,77$) между инициальным образцом и 4-м пассажем не найдено. Наблюдается резкое уменьшение экспрессии CD45 в 4-м пассаже ($p = 0,0015$).

Различий в экспрессии CD133 ($p = 0,68$) и CD34 ($p = 0,22$) между 4-м и 10-м пассажем не найдено. Отмечается дальнейшее уменьшение экспрессии CD45 в 10-м пассаже ($p = 0,05$). Следовательно, содержание гемопоэтических предшественников в результате культивирования не нарастает, а снижается за счет экспрессии CD45.

Отмечается значительный рост экспрессии маркеров дифференцировки CD90 ($p = 0,0015$), CD105 ($p = 0,0015$), CD166 ($p = 0,009$), CD73 ($p = 0,008$), характерных для фибробластов, в 4-м пассаже по сравнению с инициальными значениями.

При сравнении экспрессии маркеров дифференцировки фибробластов между 4-м и 10-м пассажем отмечается снижение CD90 ($p = 0,04$), CD105 ($p = 0,04$), CD166 ($p = 0,02$), CD73 не изменялся.

При анализе интенсивности экспрессии характерных для МСК антигенов на ранних и поздних пассажах наблюдалось, что при увеличении срока культивирования МСК до 10–12-го пассажа, несмотря на снижение количества CD90⁺- и CD105⁺-клеток, интенсивность экспрессии этих антигенов повышалась.

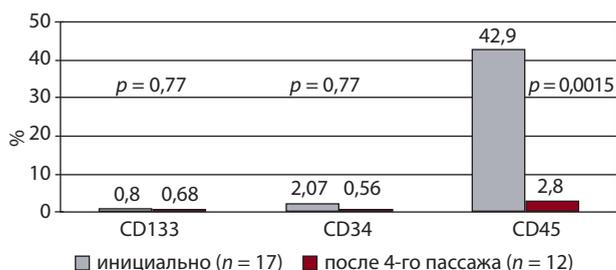


Рис. 1. Динамика изменения маркеров, характерных для гемопоэтических предшественников в процессе культивирования между инициальными показателями и 4-м пассажем

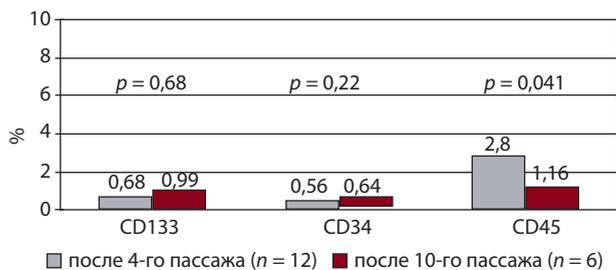


Рис. 2. Динамика изменения маркеров, характерных для гемопоэтических предшественников в процессе культивирования между 4-м и 10-м пассажами

По остальным антигенам не выявлено достоверных изменений интенсивности экспрессии на поверхности МСК при экспансии *in vitro* (табл. 1).

Оценивая динамику роста клеточной популяции, используя данные по количеству МСК, полученных нами на разных пассажах, мы пришли к выводу, что при длительном культивировании *in vitro* МСК костного мозга человека 3–4-го пассажа обладали значительно более высокой пролиферативной активностью по сравнению с культурами после 10–12-го пассажа.

Кратность прироста клеток составила 5,4 и 2,1 соответственно. Скорость увеличения клеточной популяции была максимальна на 3–4-м пассаже, несколько

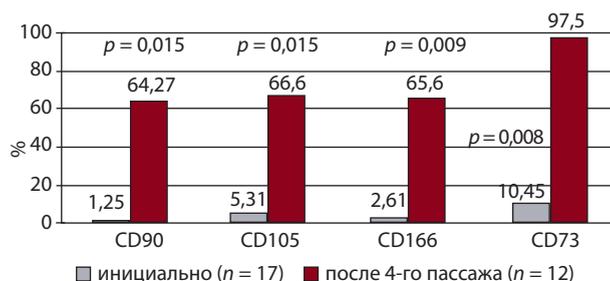


Рис. 3. Динамика изменения маркеров, характерных для МСК в процессе культивирования между инициальными показателями и 4-м пассажем

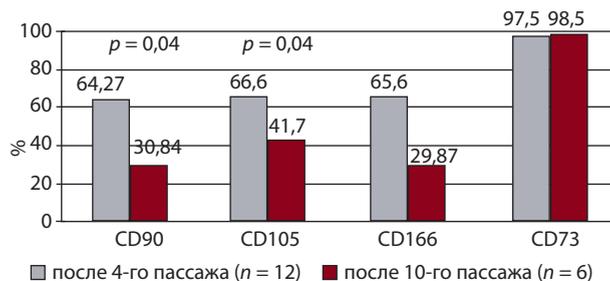


Рис. 4. Динамика изменения маркеров, характерных для МСК в процессе культивирования между 4-м и 10-м пассажами

снижалась к 5–6-му пассажу и достоверно уменьшалась на поздних (10–12) пассажах. Так же в части образцов МСК костного мозга начиная с 7-го пассажа отмечалось отсутствие роста клеточной популяции (табл. 2).

При оценке влияния времени доставки материала для выделения и культивирования МСК показано, что наибольшее содержание МСК после первого пассажа отмечалось в образцах, доставленных в течение 6 ч, по сравнению с образцами, доставленными после 6 ч и более (табл. 3).

В связи с тем, что при длительном культивировании МСК *in vitro* возможна спонтанная трансформация, был проведен генетический анализ культивируемых

Таблица 1. Интенсивность экспрессии характерных для МСК антигенов при культивировании

Поверхностный маркер	Антитело	Интенсивность экспрессии		Достоверность различий
		МСК 3–4-й пассаж (n = 32), медиана	МСК 10–12-й пассаж (n = 30), медиана	
Маркер миелоидных клеток	CD13	422	647	p = 1,0
В-1 интегрин	CD29	400	727	p = 0,89
НСАМ-1	CD44	5309	4725	p = 0,34
SH3	CD73	2577	1538	p = 0,74
Thy-1	CD90	496	703	p = 0,047*
Эндоглин, SH2	CD105	1507	2060	p = 0,038*
Маркер стволовых клеток	CD133	13	20	p = 0,64
SB 10/ALKAM	CD166	354	374	p = 0,26

Таблица 2. Динамика прироста МСК в культуре при длительном культивировании *in vitro*

№ пассажа	3, 4	5, 6	7, 8, 9	10, 11, 12
Кратность прироста МСК	5,88 ± 0,84, n = 32	4,81 ± 0,33, n = 32	2,63 ± 0,11, n = 32	2,03 ± 0,08, n = 25
Величина p	$p_{3,4-10,11,12} = 0,01$			

Таблица 3. Зависимость содержания МСК в культуре при расчете на 1 мл начального образца костного мозга

Время доставки	< 6 ч	> 6 ч
Количество образцов	18	40
Медиана	0,06	0,03
Величина p	$p = 0,2$	

нами МСК на ранних и поздних пассажах с целью оценки генетической безопасности МСК. Картирование МСК в 9 культурах на ранних и поздних пассажах показало, что во всех случаях хромосомный набор культур МСК соответствовал нормальному – 46, XY или 46, XX и не менялся в процессе культивирования. При анализе частоты анеуплоидии в культурах МСК на ранних и поздних пассажах было изучено около 25 000 ядер. Число нормальных клеток с одной хромосомой X составило 99,4 % на ранних и 99,5 % – на поздних пассажах. Частота ядер с 2 хромосомами X варьировала от 0,1 до 1,07 %, в среднем составляя 0,52 % и 0,46 % соответственно. Нуллисомия по хромосоме X зафиксирована как крайне редкое явление. Такие клетки могут быть выявлены благодаря чувствительности метода FISH на интерфазных ядрах и, скорее всего, для них уже запущен механизм апоптоза, так как нуллисомия по хромосоме X не совместима с выживанием клетки. На ранних и поздних пассажах были зафиксированы ядра, нуллисомные по хромосоме Y. Спонтанная частота потери хромосомы Y в культурах МСК варьировала от 0 до 0,87 % на разных пассажах. Частота гиперплоидии (дисомия) составила $0,19 \pm 0,10$ % как на ранних, так и на поздних пассажах. Таким образом, частота анеуплоидии по половым хромосомам не менялась в процессе культивирования. Тем не менее

в одной культуре МСК выявлен клеточный клон с трисомией по хромосоме 8. Клон выявлялся уже на 4-м пассаже и составлял 24 % общего числа проанализированных клеток, на 6-м пассаже выявлено уже 34 % ядер с трисомией по хромосоме 8. Однако к 12-му пассажу наблюдали только 16 % трисомных клеток в этой культуре. Условия культивирования и пересевов клеточных культур были стандартными, поэтому появление аномальных клонов клеток можно объяснить их селективным преимуществом в размножении.

Изменение размера клона может свидетельствовать о разной скорости его деления в процессе культивирования. Возможно, что процессы пролиферации и старения в анеуплоидных клетках протекают быстрее, чем в нормальных.

Перед применением в клинической практике все полученные *in vitro* образцы МСК были тестированы на предмет бактериологической и вирусологической безопасности. По нашим данным, среды, в которых выращивались образцы МСК, не были контаминированы исследованными микроорганизмами. Также отсутствовала ДНК CMV.

Таким образом, продемонстрирована эффективность использования свода правил для производства и тестирования клеточных препаратов для клинического использования.

ЛИТЕРАТУРА

- Осипова Е.Ю., Никитина В.А., Астрелина Т.А. и др. Динамика скорости роста, иммунофенотипа и генетическая стабильность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека на ранних и поздних пассажах при культивировании *ex vivo*. Онкогематол 2009;1:44–50.
- Osipova E.U., Astrelina T.A., Purbueva V.B. et al. Dynamics of immunophenotype of human bone marrow MSCs on early and late passages during *ex vivo* expansion. 35th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2009. P. 265.
- Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцев А.Г. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. М.: ИД Медпрактика, 2005.
- Мейл Д., Бростофф Дж., Ротт Д.Б., Ройтт А. Иммунология. М.: Логосфера, 2007.
- A Proposed Approach to the Regulation of Cellular and Tissue-based Products. FDA USA (1997–2011).