DOI: 10.17117/na.2016.11.02.403

<http://ucom.ru/doc/na.2016.11.02.403.pdf>

Поступила (Received): 30.11.2016

Танагузова Б.М., Лосева И.В., Джангозина Д.М., Болдыш С.К. Инактивация вирусов в лекарственных препаратах с биологическим содержанием

Tanaguzova B.M., Loseva I.V., Dzhangozina D.M., Boldysh S.K.
The virus inactivation of drugs with biological content

Проблема обеспечения вирусной безопасности биопрепаратов на различных этапах технологического процесса является актуальной для фармацевтических производств. В статье обсуждается опыт использования на производстве различных методов индикации вирусов и их инактивации

Ключевые слова: производство биопрепаратов, вирусная контаминация, инактивация вирусов

The problem of ensuring viral safety of biological products at various stages of the process is relevant for the pharmaceutical industries. The article discusses the experience with the production of various methods of virus detection and inactivation

Key words: manufacturing biologics, viral contamination, inactivation of viruses

Танагузова Береке Мейрамбековна

Кандидат фармацевтических наук, зам. директора
Карагандинский фармацевтический комплекс
г. Караганда, ул. Ботаническая, 12

Tanaguzova Bereke Meirambekovna

Candidate of Pharmaceutical Sciences, Deputy
Director
Karaganda pharmaceutical complex
Karaganda, Botanicheskaya st., 12

Лосева Ирина Викторовна

Кандидат биологических наук, доцент, зав.
кафедрой
Карагандинский государственный медицинский
университет
г. Караганда, ул. Гоголя, 40

Loseva Irina Viktorovna

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,
Head of Department
Karaganda state medical university
Karaganda, Gogolya st., 40

Джангозина Долорес Мукушевна

Доктор медицинских наук, профессор
Карагандинский государственный медицинский
университет
г. Караганда, ул. Гоголя, 40

Dzhangozina Dolores Mukushevna

Doctor of Medical Sciences, Professor
Karaganda state medical university
Karaganda, Gogolya st., 40

Болдыш Светлана Камашевна

Доцент
Академия «Болашак»
г. Караганда, ул. Ерубаева, 16

Boldysh Svetlana Kamashevna

Associate Professor
Academy Bolashak
Karaganda, Yerubayev st., 16

В последние годы количество препаратов, получаемых методами биотехнологии, используемых для лечения различных заболеваний растет в геометрической прогрессии. Это препараты для лечения различных видов рака,

сахарного диабета, инфекционных заболеваний (например вирусных гепатитов, ВИЧ), а также сердечно-сосудистых, неврологических и аутоиммунных заболеваний. Фармацевтическая промышленность сейчас использует различные инновационные технологии, позволяющие получить совершенно новые активные субстанции, мало доступные ранее. Для этой цели активно применяются методы биотехнологии, в том числе технологии рекомбинантных ДНК и клеточной инженерии, а также разнообразные биоматериалы [1]. В такую категорию препаратов входят молекулярные и рекомбинантные вакцины, интерфероны, интерлейкины, моноклональные антитела, гормоны, иммунные диагностикумы и другие.

Производство биологических активных субстанций и биопрепаратов имеет свою специфику, определяемую природой продукции и технологией производства. Характер производства, контроля и применения биологических лекарственных средств требует особых мер предосторожности [2].

В 1982 году FDA (США) одобрило первую лекарственную форму, полученную с помощью биотехнологических процессов – рекомбинантный человеческий инсулин для лечения пациентов с сахарным диабетом, который сегодня доступен в различных концентрациях, различного терапевтического действия (инсулин лизпро, инсулина аспарт, инсулин гларгин) и в различных лекарственных формах (внутримышечного, подкожного введения) [3].

В отличие от обычных лекарственных средств, которые производятся с использованием стандартизированных химических и физических методов, позволяющих получать продукт с высокой степенью однородности, производство биологических активных субстанций и лекарственных препаратов связано с использованием биологических материалов (кровь, органы животных, клеточная биомасса и др.) и биологических процессов, таких как культивирование клеток или экстракция из биологических субстратов. Эти процессы характеризуются вариабельностью, поэтому диапазон и характер сопутствующих продуктов может изменяться [4].

К процессам биотехнологического культивирования привлекаются пять разных групп организмов: клетки бактерий (например, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Erwinia herbicola*, *Lactococcus Lactis* и *Bacillus subtilis* и др.), грибов (например *Saccharomyces Cerevisiae*, представители родов *Pichia* (*Hansenula*), *Trichoderma* и *Aspergillus*), растений (например, растительный табак, рапс и трансгенный картофель), насекомых (например *Spodoptera frugiperda*) и млекопитающих (например, яичника китайского хомячка (линия CHO), почек хомячка (линия ВНК и др.) [5, 6].

При этом риск вирусной контаминации – особенность всех биотехнологических препаратов, получаемых из клеточных линий. Такая контаминация может быть результатом заражения исходных клеточных линий (субстратов клеток) или случайного инфицирования вирусом в течение процесса производства и, в дальнейшем, может иметь серьезные клинические последствия. Предполагается, что безопасность данных препаратов в отношении вирусной контаминации может быть в разумной степени обеспечена применением программы

тестирования на наличие вируса, а также оценкой эффективности удаления (элиминации) и инактивации вируса в процессе производства.

Обеспечение вирусной безопасности лекарственных средств для пациентов состоит в сочетании трех усилий:

а) предотвращение доступа вируса при скрининге с первых этапов использования сырья / материалов (банки клеток, тканей или биологических жидкостей) и добавок, используемых в производственных процессах (питательные среды, источники факторов роста и т.д.);

б) включение надежных методов для удаления вирусов в процессе производства;

в) контроль производства с использованием соответствующего скрининга клеточных культур, выращенных в среде, содержащей бычий пептон, желчь и др. биологические материалы [7].

Надежное удаление крупных вирусов (>50 нм) может быть осуществлено с использованием фильтров с соответствующими размерами пор. Кроме того, сегодня предлагаются и фильтрационные материалы для удаления мелких вирусов (~25 нм). Для физического устранения вирусов можно использовать и хроматографические методы [8].

Существуют самые разнообразные способы инактивации вирусных патогенов, основанные на воздействии физических и химических факторов. Одним из примеров такого способа является метод постепенной, многостадийной тепловой обработки препаратов крови: фибриногена и факторов свертывания крови VIII, IX. Однако тепловые способы инактивации не обеспечивают полноценной инактивации таких вирусных патогенов, как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит В [9].

К физическим методам инактивации вирусов также относится использование γ -облучения. Однако γ -облучение обладает инактивирующим воздействием и на функционально активные и необходимые белковые компоненты плазменной фракции.

Использование химических методов инактивации вирусов, таких как применение фенола, ограничивает высокая токсичность бензольных и им подобных соединений. Одним из актуальных направлений в сфере борьбы с вирусными патогенами в препаратах донорской крови является применение методов, основанных на фотодинамических реакциях выделения синглетного кислорода. Наибольшее распространение в этой сфере получило использование фенотиазиновых красителей (метиленовый синий) и твердофазных фуллеренов. Радиолит водных сред также ведет к образованию активных форм кислорода [10, 11].

Твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллеренов за счет образования 1O_2 , эффективно инактивируют оболочечные вирусы в водной среде, не содержащей электронодонорные соединения. Такие сенсибилизаторы проявляют высокую способность к инактивации вирусов (например, вирусов гриппа) в биологических жидкостях, обладающих высокой вязкостью [12, 13].

Недавно в лаборатории вирусологии Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока совместно с сотрудниками НПО «Микроген» была испытана технология инактивации вируса в среде с повышенной

кислотностью. Принцип этой методики заключается в снижении инфекционных свойств возбудителя при понижении показателей pH до значений 4,0 и 4,5. Исследователи надеются, что дальнейшее изучение эффективности метода инаktivации вирусов при низких значениях pH позволит решить одну из актуальных задач производства медицинских и ветеринарных препаратов, связанных с биобезопасностью продукции [14].

Выбор способа инаktivации основывается на механизме действия инаktivата и свойствах инаktivируемого вируса [15].

Скорость инаktivации, и, таким образом потенциал запаса прочности в процессе производства биологического препарата, может быть оценена с помощью кинетических экспериментов инаktivации в нескольких точках непосредственно в технологическом процессе [16].

В настоящее время существуют конкретные рекомендации для тестирования вируса, отраженные в ICH Q5A (вирусная оценка безопасности биотехнологических продуктов из клеточных линий человека или животного происхождения) – это возможность для рационализации и сокращения затрат времени в процессе разработки лекарств [17].

Специалисты и регуляторные органы, действительно признают, что нет универсального метода обнаружения вирусов. Выявление признаков вирусного загрязнения и методы их молекулярного обнаружения имеют ряд ограничений. Эндогенные и случайные вирусы могут избежать обнаружения из-за множества причин: недостаточная чувствительность многих методов анализа, отсутствие доступных методов обнаружения некоторых вирусов, необходимость в вирус-специфических анализах [18-20].

В настоящее время промышленность заявляет о редких фактах загрязнений продуктов производства вирусами, и если это происходит, то результат может быть катастрофичным. Представители промышленных предприятий инициирует создание консорциума по вопросам загрязнения в биотехнологии, тем самым призывая к сотрудничеству Институт Технологического центра биомедицинских инноваций штата Массачусетс с производителями биопродукции. Данное сотрудничество продиктовано стремлением использовать знание отрасли, опыт, обмениваться отраслевыми рисками и вырабатывать стратегии для профилактики в отношении управления загрязнениями случайными патогенными агентами [21].

Таким образом, краткий анализ специализированных источников информации констатирует, что проблема вирусной контаминации лекарственных средств по-прежнему актуальна и широко обсуждается среди специалистов. Не смотря на то, что на сегодняшний день разработаны различные методы инаktivации вирусов и способы удаления патогенных агентов, многие специалисты считают, что в силу эволюционных процессов в вирусных популяциях, которые приводят и к появлению новых типов и видов вирусов, гарантировать полную безопасность продуктов биотехнологического производства не всегда возможно.

Список используемых источников:

1. Almeida H., *Maria Helena Amaral M.H., Lobão P. Drugs obtained by biotechnology processing//Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.2011. V.47.P.200.
2. Basic Requirements for Viral Safety of Biotechnological/Biological Products listed in Japanese Pharmacopoeia. Supplement I, The Japanese Pharmacopoeia Fourteen Edition (JP XIV), Ministerial Notification of MHLW, 2002. N 395. 27 Dec.
3. Nakhla S. Barakat. Biological Products: Manufacturing, Handling, Packaging and Storage// Promising Pharmaceuticals. 2011. P.64-81.
4. Руководство: Правила надлежащего производства лекарственных средств для медицинского применения и для ветеринарного применения Таможенного Союза (Правила надлежащей производственной практики Good Manufacturing Practice – GMP). Проект (по состоянию на 01 февраля 20413)- М.: Ремедиум, 2012. С.146.
5. Tourte Y. Engenharia genética e biotecnologias, conceitos e métodos, aplicações à agronomia e às bioindustrias. // Lisboa: Instituto Piaget Divisão Editorial. 1998. P.170-178.
6. Walsh G. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union// Eur. J. Pharm. Biopharm. 2003. V.55, N.1. P.3-10.
7. Potts, B.J., TSE Case Studies Associated with Japanese and Other Regulatory Authorities-Talk Transcript. PDA J Pharm Sci Technol, 2010. 64(5): P. 4-442.
8. ICH.Q8 (R2), Pharmaceutical Development. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Current Step 4 version, August 2009.
9. Способ инактиваации вируса иммунодефицита человека и других вирусов в плазме крови человека с сохранением функциональной активности белков плазмы крови// Тимофеев И.В., Вераксин Н.А., Перминова Н.Г., Нечаева Е.В., Дядин Ю.А., Журко Ф.В//Патент на изобретение №2152994, С12№7104 (20.07.2000).
10. Мазепа В.Н. и др. Оценка эффективности применения явлений фоторадиолиза для инактиваации вирусов в донорской крови на модели фагов Ps. Aequinoza// Нижний Новгород, 2002. 8 с.
11. Крисько Т.К. Твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллеренов для генерации синглетного кислорода в водных средах. Автореф. Кан. Ф- математических наук.:01.04.05, 02.00.04. Санк- Петербург, 2008. 22 с.
12. Belousova I.M., Danilov O.B., Kiselev V.M., Kislyakov I.M. at. al. Solid- phase Fullerene-line Nanostructures as Singlet Oxygen Photosensitizers in Liquid Media//SPIE.Proceedings.2007. Vol.6613. P.66130C-1 – 66130C-12.
13. Zarubaev V.V., Belousova I.M., Kiselev V.M., Piotrovsky L.B. at. al. Photodynamic Inactivation of Influenza Virus with Fullerene C60 Suspension in Allantoic Fluid// Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2007. Vol.4. P.31-35.
14. Семенова О.В. Чистые от вирусов// Мой НГУ. т. 57/58. №3/4.
15. Юрско П.С. Полимеразная цепная реакция как эффективный метод контроля инактиваации парвовируса при изготовлении вакцины против вирусного энтерита гусей// Ветеринарія. 2013. №6 (127). С.25.
16. Aranha H., Forbes S. Viral Clearance Strategies for Biopharmaceutical Safety. Part II: A Multifaceted Approach to Process Validation // Pharmaceutical Technology. 2001. JUNE. P.26- 31.
17. Platform Manufacturing of Biopharmaceuticals: Putting Accumulated Data and Experience to Work// European Biopharmaceutical Enterprises (EBE), a specialised group of EFPIA. 2013. 21p.
18. Onions, D. and J. Kolman, Massively parallel sequencing, a new method for detecting adventitious agents. Biologicals, 2010. 38(3). P.80-377.
19. Victoria, J.G., et al., Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. J Virol, 2010. 84(12). P.40- 6033.
20. Dodet, B., et al., Viral safety and extraneous agents testing for veterinary vaccines. Biologicals, 2010. 38(3). P.31-326.
21. Aranha H., Viral Clearance and Safety, at Catalent Pharma Solutions in Morrisville//Contract pharma, 2011. November/December. P.83-87.