

УДК 604+615.07+577.113.5
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-75-80>

ШИФР СПЕЦИАЛЬНОСТЬ
03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)
14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология



Молекулярно-биологические методы контроля качества субстанций биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК

Е. Д. Мыца, Н. В. Чертова, Е. В. Эльберт, А. С. Сухно, Р. А. Волкова*, В. А. Меркулов

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

Биотехнологические препараты, полученные с применением технологии рекомбинантных ДНК, широко используются в настоящее время. В соответствии с международными и отечественными требованиями содержание остаточной ДНК штамма-продуцента в подобных препаратах не должно превышать 10 нг на 1 дозу, для препаратов, предназначенных для частого или длительного введения, эта величина не должна превышать 100 пг на 1 дозу. В статье представлено описание наиболее часто используемых методов определения содержания остаточной ДНК штамма-продуцента в субстанциях биотехнологических препаратов: молекулярная гибридизация с биотиновой или дигоксигениновой меткой ДНК-зонда (полуколичественный метод), система Threshold, ПЦР в режиме реального времени, метод с флуоресцентным реагентом (количественные методы). В случае использования методов с флуоресцентным реагентом или ПЦР в режиме реального времени для замены ранее использовавшегося метода требуется подтверждение их правильности, например с помощью сравнительной оценки содержания остаточной ДНК двумя методами — вновь вводимым и ранее использовавшимся методом. Отмечены преимущества и недостатки методов, источники неопределенности результатов при проведении испытаний, указана необходимость использования стандартных и контрольных образцов, аттестованных в установленном порядке. В субстанциях, внесенных в Государственный реестр лекарственных средств, содержание остаточной ДНК штамма-продуцента соответствует международным рекомендациям.

Ключевые слова: биотехнологические препараты; остаточная ДНК штамма-продуцента; рекомбинантные белки; молекулярно-биологические методы контроля; стандартные и контрольные образцы; полимеразная цепная реакция (ПЦР); метод молекулярной гибридизации; система Threshold; метод с флуоресцентным реагентом

Для цитирования: Мыца ЕД, Чертова НВ, Эльберт ЕВ, Сухно АС, Волкова РА, Меркулов ВА. Молекулярно-биологические методы контроля качества субстанций биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2018;18(2):75–80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-75-80>

* **Контактное лицо:** Волкова Рауза Асхатовна; Volkova@expmed.ru

Molecular-Biological Methods of Quality Control of Biological Active Substances Produced by Recombinant DNA Technology

E. D. Mytsa, N. V. Chertova, E. V. Elbert, A. S. Sukhno, R. A. Volkova*, V. A. Merkulov

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

Biotechnological products manufactured by recombinant DNA technology are widely used nowadays. According to the national and international requirements the amount of residual host cell DNA in such products should not exceed 10 ng per dose. However, for products intended for frequent or long-term use, this amount must not exceed 100 pg per dose. This article describes methods most frequently used for quantification of residual host cell DNA in biological active substances contained in biotechnological products: molecular hybridization with biotin- or digoxigenin-labelled DNA-probes (semiquantitative method), Threshold system, real-time PCR, method based on the use of a fluorescent reagent (assays). If a method based on the use of a fluorescent reagent or real-time PCR are used to replace the current procedure, it is necessary to demonstrate their validity, e.g. by comparing the results of residual DNA quantification obtained by the two methods — the new one and the current one. The article dwells upon the advantages and disadvantages of the methods and potential sources of uncertainty. It highlights the importance of using appropriately certified reference standards and retention samples. The biological active substances included into the State Register of Medicinal Products conform to the international requirements in terms of the amount of residual host cell DNA.

Key words: biotechnological products; residual host cell DNA; recombinant proteins; molecular-biological methods of quality control; polymerase chain reaction (PCR); molecular hybridization method; Threshold system; method based on the use of a fluorescent reagent

For citation: Mytsa ED, Chertova NV, Elbert EV, Sukhno AS, Volkova RA, Merkulov VA. *Molecular-Biological Methods of Quality Control of Biological Active Substances Produced by Recombinant DNA Technology. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2018;18(2):75–80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-75-80>

* **Contact person:** Rauza A. Volkova; Volkova@expmed.ru

Использование в фармацевтической промышленности технологии рекомбинантной ДНК позволяет получать целевые рекомбинантные белки в необходимом количестве и обеспечивать практическое здравоохранение современными вакцинами и биотерапевтическими препаратами (моноклональные антитела, эритропоэтин, интерфероны, интерлейкины, рецепторы клеток, факторы плазмы крови, инсулин, другие препараты).

Качество данных препаратов обеспечивается соблюдением технологии производства и требований надлежущей производственной практики, подтверждается системой контроля на этапах производства и контроля готовой продукции. Для контроля качества продукции используется широкий круг методов: биологические, физико-химические, биохимические, иммунохимические, молекулярно-биологические.

Молекулярно-биологические методы используются для оценки подлинности, специфической активности препаратов, вирусной безопасности сырья и промежуточных продуктов, а также для определения содержания остаточной ДНК клеток-продуцентов в очищенном продукте или фармацевтической субстанции, внесенной в Государственный реестр лекарственных средств. Для оценки подлинности, специфической активности и вирусной безопасности наиболее распространенным молекулярно-биологическим методом контроля является метод на основе амплификации нуклеиновых кислот. Для определения содержания остаточной ДНК используются различные количественные и полуколичественные методы [1, 2].

Цель работы — провести теоретический анализ современных молекулярно-биологических методов контроля качества субстанций препаратов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК по показателю «Остаточная ДНК штамма-продуцента».

В задачи исследования входило:

- представить анализ методов определения остаточной ДНК штамма-продуцента, включенных в нормативную документацию на фармацевтические субстанции биотехнологических препаратов отечественного и зарубежного производства;
- привести сравнительную характеристику методов оценки остаточной ДНК штамма-продуцента;
- охарактеризовать источники неопределенности методик количественной оценки остаточной ДНК штамма-продуцента;
- изучить рекомендации международных организаций и данные нормативной документации по количественному содержанию остаточной ДНК штамма-продуцента в фармацевтических субстанциях.

Вакцины и биотехнологические препараты, полученные с использованием технологии рекомбинантной ДНК, производятся путем культивирования продуцентов, представляющих собой прокариотические или эукариотические клетки со встроенными экспрессирующими системами [3–5]. Фармацевтическая субстанция может содержать различные примеси биологической природы: связанные с продуцентом (остаточная ДНК штамма-продуцента, белки клетки-хозяина, вирусные частицы — при использовании вирусов в качестве вектора) или связанные с технологическим процессом (компоненты питательных сред, иммуносорбенты для аффинной хроматографии, другие вещества, используемые в процессе очистки). Содержание данных примесей может оказывать влияние на безопасность препарата, поэтому должно быть оценено в субстанции или очищенном продукте и указано в досье на препарат. При валидации технологического процесса (процесса очистки целевого белка) устанавливают степень удаления примесей на отдельных этапах очистки. Требования к содержанию остаточной ДНК штамма-продуцента и белков клетки-хозяина в очи-

щенном продукте или фармацевтической субстанции должны быть регламентированы, и, по сути, являются одними из показателей эффективности очистки продукта [1]. Изучение биологической активности остаточной ДНК продолжается [6–9].

В соответствии с международными рекомендациями содержание остаточной ДНК не должно превышать 10 нг на 1 дозу препарата [10–12], при этом для препаратов, предназначенных для частого или длительного введения (например, моноклональные антитела, инсулины), рекомендуется снижение допустимой величины до 100 пг на 1 дозу [13].

Методы определения остаточной ДНК штамма-продуцента

Для определения остаточной ДНК штамма-продуцента в биотехнологических продуктах используются в основном следующие методы [1, 2]: молекулярная гибридизация с биотиновой или дигоксигениновой меткой ДНК-зонда, полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени, система Threshold, метод с флуоресцентным реагентом.

Метод с флуоресцентным реагентом. Количественное определение остаточной ДНК с флуоресцентным реагентом PicoGreen позволяет определять достаточно низкие количества двухцепочечной ДНК — порядка 100 пг в анализируемом образце [14–16]. Свободный краситель не флуоресцирует, но при связывании с двухцепочечной ДНК его флуоресценция многократно возрастает (более чем в 100 раз). Существует линейная зависимость между флуоресценцией, детектируемой прибором, и концентрацией двухцепочечной ДНК в образце. Данный метод позволяет определять всю имеющуюся в образце двухцепочечную ДНК.

Особенностью красителя PicoGreen является его способность прочно связываться не только с полимерной цепью ДНК, но и с короткими (<20 пар нуклеотидов) дуплексами [16].

Молекулярная гибридизация. Количественное определение остаточной ДНК методом молекулярной гибридизации основано на комплементарности меченого ДНК-зонда и ДНК штамма-продуцента. Изначально в молекулярной гибридизации использовали радиоактивно меченные нуклеотиды, как правило, изотопом фосфора ³²P. После гибридизации образцы-мишени выявляли с помощью радиографии. Определение проводили в соответствии с МУК 4.1/4.2.588–96 [17].

В настоящее время чаще всего применяются биотиновая или дигоксигениновая метки. Оба варианта характеризуются достаточно высокой аналитической чувствительностью — менее 100 пг в образце.

При использовании биотиновой метки зонд (ДНК, меченная биотином) получают методом случайных праймеров с использованием биотинилированного нуклеотида. Биотин обладает большим сродством к авидину или стрептавидину и образует с ними нерастворимый комплекс. Эффективность мечения увеличивается с увеличением продолжительности мечения и при использовании предварительной обработки ДНК рестриктазами.

Для определения количества искомой ДНК ее выделяют из субстанции, денатурируют (при температуре 100 °С или в щелочной среде), наносят на нейлоновую мембрану (нейтральную или положительно заряженную) и иммобилизуют. В процессе гибридизации зонды, добавленные в раствор, связываются с комплементарной ДНК на мембране. После инкубации в блокирующем растворе добавляют раствор стрептавидина, конъюгированного, как правило, с щелочной фосфатазой.

Образовавшийся биотин-стрептавидиновый комплекс взаимодействует с субстратом (BCIP/NBT), по интенсивности окра-

шивания образовавшегося продукта в сравнении с образцами стандартного ряда оценивают количество ДНК в испытуемом образце [18].

При использовании дигоксигениновой метки получение зонда, меченного дигоксигенином, и последующий процесс гибридизации проводят по аналогичной схеме. Отличие заключается в том, что для обнаружения ДНК, связанной с меченым зондом, используются антитела против дигоксигенина, конъюгированные с щелочной фосфатазой [19].

Методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время ПЦР в реальном времени все чаще используется для определения количества остаточной ДНК. Необходимыми компонентами являются праймеры, ДНК-полимераза, зонды, нуклеотиды, ионы Mg^{2+} , буферный раствор [20–22].

Для определения остаточной ДНК используются различные реагенты и молекулярные зонды, среди них наиболее часто используются краситель SYBR Green I и ДНК-зонды с флуоресцентной меткой.

Использование SYBR Green I основано на способности красителя увеличивать интенсивность флуоресценции при связывании с двухцепочечной ДНК. Пик поглощения флуоресценции находится при длине волны 494 нм, пик испускания — при 520 нм. При добавлении красителя в реакционную смесь он неспецифически связывается с двухцепочечной ДНК, и по мере наработки копий амплифицируемого участка пропорционально увеличивается и интенсивность флуоресценции.

Метод с использованием ДНК-зондов, меченных на 5'-конце флуоресцентным красителем и имеющих на 3'-конце гаситель флуоресценции и фосфатную группу, основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы [23]. Структура свободного зонда препятствует флуоресценции за счет близкого расположения гасителя. При отжиге праймеров зонды связываются с комплементарными участками ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибридизованного с зондом, расщепляет зонд за счет 5'-экзонуклеазной активности. В результате флуоресцентная метка отделяется от зонда и гасителя, и ее свечение может быть детектировано. Увеличение флуоресценции будет прямо пропорционально количеству наработанного ПЦР-продукта [24, 25].

Система Threshold. Иммуноферментный метод с использованием системы Threshold позволяет определять тотальную ДНК и измерять количество одноцепочечной ДНК вплоть до пикограмм, метод может быть назван золотым стандартом определения остаточной ДНК. Данный метод основан на переводе двухцепочечной ДНК в одноцепочечную форму и выявлении одноцепочечной ДНК, предварительно связанной с двумя белками в присутствии стрептавидина [26]. Один из этих белков выделен из *Escherichia coli* — белок класса RecQ DNA helicases: SSB (single-stranded DNA-binding protein), способен связываться с одноцепочечной ДНК, конъюгирован с биотином, обладающим сродством к стрептавидину. Второй белок представляет собой анти-ДНК моноклональное антитело, конъюгированное с уреазой. Оба белка обладают высокой способностью к связыванию с одноцепочечной ДНК независимо от ее нуклеотидного состава. Благодаря этому в присутствии стрептавидина образуется устойчивый комплекс стрептавидин-биотин-SSB-ДНК-анти-ДНК-моноклональные антитела-уреаза [27].

Этот комплекс переносят на биотинилированную нитроцеллюлозную мембрану путем фильтрации под вакуумом. Молекулы стрептавидина специфично связываются с биотином ДНК-комплекса и биотином нитроцеллюлозной мембраны,

обеспечивая прочное прикрепление комплекса к биотинилированной мембране. Избыток не связанного стрептавидина и белков удаляют промыванием [28].

Количество связанной уреазы, пропорциональное количеству ДНК в образце, оценивают по уреазной активности (в качестве субстрата используют мочевины). Скорость ферментативной реакции оценивают по изменению pH с применением специального детектора. Расчет содержания ДНК в образце проводится по компьютерной программе [29]. Предел количественного определения составляет 2 пг ДНК.

Количество ДНК в образце оценивают по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных образцов ДНК.

Характеристика методов оценки остаточной ДНК штамма-продуцента

В работе S. Mehta и J.T. Keer [30] было рассмотрено девять факторов, которые влияют на выбор аналитической методики: стоимость оборудования, стоимость одного анализа, пропускная способность, чувствительность, простота использования, надежность, соответствие требованиям регуляторных органов, применимость для производства, ее аналитическая гибкость. По мнению авторов, надежность является самым важным фактором.

Молекулярная гибридизация и флуоресцентный метод являются сравнительно недорогими методами (с точки зрения прямых затрат и издержек на проведение одного эксперимента). Однако гибридизация представляет собой количественный трудоемкий метод. Флуоресцентный метод с PicoGreen — недорогой и удобный для пользователей количественный метод, позволяет обнаруживать любые двухцепочечные ДНК [15]. При применении данного метода должен быть использован калибровочный ряд, обеспечивающий необходимую чувствительность методики.

ПЦР в реальном времени и Threshold-анализы позволяют проводить количественную оценку остаточной ДНК штамма-продуцента с необходимой чувствительностью и точностью. Метод Threshold является высокоточным и хорошо воспроизводимым, но требует дорогостоящего оборудования и реагентов. ПЦР-анализ интенсивно развивается в последние годы, обеспечивает точность, чувствительность и воспроизводимость испытаний, имеет большую пропускную способность, но правильность методики требует обоснования. Информативность ПЦР-анализа в отношении выявления остаточной ДНК в основном зависит от правильного выбора праймеров.

Для характеристики правильности методик на основе ПЦР и с флуоресцентным реагентом рекомендуется проведение оценки содержания ДНК в сравнении с ранее использовавшимися методами гибридизации или Threshold.

Чувствительность (предел обнаружения) рассмотренных методов определения остаточной ДНК по данным литературы приведена в таблице 1.

Таблица 1. Предел обнаружения молекулярно-биологических методов определения содержания остаточной ДНК (по [30])

Предел обнаружения остаточной ДНК методом:			
с флуоресцентным реагентом	молекулярной гибридизации	ПЦР	система Threshold
0,2 нг	10 нг	10 фг — 5 пг	2 пг

Источники неопределенности методик количественной оценки остаточной ДНК штамма-продуцента

Неопределенность результатов испытания — это диапазон значений, в пределах которого находится «истинное» значение измеряемой величины. Диапазон значений позволяет судить о надежности результатов. Экспериментальные результаты могут быть представлены как $x \pm u$, где x — значение измеряемой величины, а u — это неопределенность результата измерения [31]. Источником неопределенности при использовании молекулярно-биологических методов является прежде всего этап пробоподготовки, включая отбор проб, а также такие факторы, как стабильность и концентрация образца, условия амплификации и детекции, аналитическая чувствительность методики, адекватность способа аттестации используемых стандартных и контрольных образцов. Неопределенность методики может быть оценена с помощью стандартного отклонения, установленного в условиях воспроизводимости [32].

Стандартные образцы

Стандартизация условий испытаний необходима для обеспечения точности определения остаточной ДНК штамма-продуцента. Одним из основных условий стандартизации методики является использование стандартных и контрольных образцов. В методике определения остаточной ДНК штамма-продуцента используются различные ДНК-стандарты: внутрипроизводственные стандартные образцы ДНК, выделенные из клеток-продуцентов, стандарты, поставляемые в комплектах производителей наборов [29, 33]. Обычно значение концентрации ДНК в таких стандартных образцах дается по результатам определения спектрофотометрическим методом и без указания неопределенности, что не позволяет оценить прослеживаемость указанной величины. Отсутствие стандартных образцов необходимой категории затрудняет стандартизацию методики [34, 35].

Остаточная ДНК штамма-продуцента в фармацевтических субстанциях

В настоящее время в Государственный реестр лекарственных средств (<http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>) внесено более 40 фармацевтических субстанций отечественных и зарубежных производителей для препаратов, производимых по технологии рекомбинантной ДНК, в том числе 11 субстанций инсулина, 13 субстанций интерферона альфа-2b, 5 субстанций эритропоэтина, 4 субстанции моноклональных антител, 6 субстанций филграстима; более 10 биотехнологических субстанций проходят процедуру внесения в Государственный реестр лекарственных средств.

В соответствии с требованиями производитель имеет возможность использовать любой доступный метод для определения остаточной ДНК штамма-продуцента в фармацевтической субстанции. Используемая методика должна быть валидирована в соответствии с ГФ XIII ОФС 1.1.0012.15 [36].

Во всех субстанциях содержание остаточной ДНК не превышает 10 нг на дозу, что соответствует международным рекомендациям [11–13], в препаратах, предназначенных для долгого или длительного применения, содержание остаточной ДНК, как правило, не превышает 100 пг в дозе [14].

Ключевую роль в определении остаточной ДНК играет пробоподготовка, т.е. выделение ДНК из субстанции. Эффективность выделения ДНК должна быть оценена, подтверждена материалами валидации методики и учтена при расчете окончательного результата. Как правило, выделение ДНК из штамма-продуцента проводят согласно Руководству по проведению

доклинических исследований лекарственных средств [2] с некоторыми отступлениями.

Для обеспечения достоверности и надежности результатов определения остаточной ДНК необходимо использование стандартных образцов, а также положительных и отрицательных контрольных образцов как для этапа пробоподготовки, так и для этапа определения ДНК. Использование образца с добавлением известного, желательного минимального количества ДНК позволяет оценить эффективность процесса выделения.

Должны быть предусмотрены критерии пригодности системы и критерии оценки приемлемости результатов, установленные на основе результатов валидации методики.

Заключение

Для определения остаточной ДНК штамма-продуцента в биотехнологических продуктах используются в основном следующие методы: молекулярная гибридизация с биотиновой или дигоксигениновой меткой, ПЦР в режиме реального времени, Threshold, метод с флуоресцентным реагентом.

Метод молекулярной гибридизации — классический метод для определения остаточной ДНК, он является полуквантитативным и достаточно трудоемким. Метод Threshold — первый количественный метод, но его применение зависит от наличия дорогостоящего оборудования и реагентов. Методы с флуоресцентным реагентом и ПЦР в режиме реального времени являются количественными методами, но в случае их использования для замены ранее использовавшегося метода требуется подтверждение их правильности, например с помощью сравнительной оценки содержания остаточной ДНК двумя методами — вновь вводимым и ранее использовавшимся методом.

Для обеспечения достоверности и надежности результатов определения остаточной ДНК необходимо использование стандартных образцов, аттестованных в установленном порядке.

В субстанциях, внесенных в Государственный реестр лекарственных средств, содержание остаточной ДНК штамма-продуцента соответствует международным требованиям.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

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

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

Литература / References

1. *Общая фармакопейная статья 1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантной ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.: 2015. [General Monograph 1.7.1.0007.15 Drugs Produced by Recombinant DNA Methods. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (In Russ.)]*
2. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2013. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines (Immunobiological Drugs). Part 2. Moscow: Grif and K; 2013 (In Russ.)]*
3. *Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. Т. 3. М.: Ремедиум; 2017. [Normative Legal Acts in the Sphere of Medicinal Products Circulation within the Framework of the Eurasian Economic Union. Development and Carrying out of Research of Biological Medicinal Products. V. 3. Moscow: Remedium; 2017 (In Russ.)]*

- Andersen DC, Krummen L. Recombinant Protein Expression for Therapeutic Applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(2):117–23.
- Chu L, Robinson DK. Industrial Choices for Protein Production by Large-Scale Cell Culture. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12(2):180–7.
- Sheng L, Cai F, Zhu Y, Pal A, Athanasiou M, Orrison B, et al. Oncogenicity of DNA in vivo: Tumor Induction with Expression Plasmids for Activated H-ras and C-myc. *Biologicals.* 2008;36(3):184–97. DOI: 10.1016/j.biologicals.2007.11.003
- Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. Residual DNA Analysis in Biologics Development: Review of Measurement and Quantitation Technologies and Future Directions. *Biotechnol Bioeng.* 2012;109(2):307–17. DOI: 10.1002/bit.23343
- Peden K, Sheng L, Pal A, Lewis A. Biological Activity of Residual Cell-Substrate DNA. *Dev Biol (Basel)* 2006;123:45–53.
- Wolter T, Richter A. Assays for Controlling Host-Cell Impurities in Biopharmaceuticals. *BioProcess Int.* 2005;3(2):40–6.
- Requirements for the Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh report. WHO; 1998 (WHO Technical Report Series, No. 878), Annex 1.
- Meeting Report. WHO Study Group on Cell Substrates for Production of Biologicals; 2007. Available from: http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/cells/Cells.FINAL.MtgRep.IK.26_Sep_07.pdf
- WHO. 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, No. 814. 2013. Available from: http://www.who.int/biologicals/biotherapeutics/rDNA_DB_final_19_Nov_2013.pdf
- Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research; 1997. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/.../UCM153182.pdf>
- Ikeda Y, Iwakiri S, Yoshimori T. Development and Characterization of a Novel Host Cell DNA Assay Using Ultra-Sensitive Fluorescent Nucleic Acid Stain «PicoGreen». *J Pharm Biomed Anal.* 2009;49(4):997–1002. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.01.022
- Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *Anal Biochem.* 1997;249(2):228–38. DOI: 10.1006/abio.1997.2177
- Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophys J.* 2010;99(9):3010–9. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.09.012
- МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. Минздрав России, М.; 1998. [Methodical Instructions МУК 4.1 / 4.2.588-96 «Methods of Control Medical Immunobiological Drugs Administered to People». Ministry of Health of Russia, Moscow; 1998 (In Russ.)]
- Gebeyehu G, Rao PY, SooChan P, Simms DA, Klevan L. Novel Biotinylated Nucleotide — Analogs for Labeling and Colorimetric Detection of DNA. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(11):4513–34.
- DIG Application Manual for Filter Hybridization. Roche Diagnostics GmbH; 2008. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General_Information/1/dig-application-manual-for-filter-hybridisation-iris.pdf
- Gijbbers L, Koel B, Weggeman M, Goudsmit J, Havenga M, Marzio G. Quantification of Residual Host Cell DNA in Adenoviral Vectors Produced on PER. C6 Cells. *Hum Gene Ther.* 2005;16(3):393–8. DOI: 10.1089/hum.2005.16.393
- Gregory CA, Rigg GP, Illidge CM, Matthews RC. Quantification of Escherichia coli Genomic DNA Contamination in Recombinant Protein Preparations by Polymerase Chain Reaction and Affinity-Based Collection. *Anal Biochem.* 2001;296(1):114–21. DOI: 10.1006/abio.2001.5237
- Wang KY, Guo YJ, Sun SH, Shi K, Zhang S, Wang KH, et al. 16S rRNA Gene Probe Quantitates Residual Host Cell DNA in Pharmaceutical-Grade Plasmid DNA. *Vaccine.* 2006;24(14):2656–61. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.11.066
- Ребриков ДВ, Саматов ГА, Трофимов ДЮ, Семенов ПА, Савилова АМ, Кофиади ИА, Абрамов ДД. ПЦР «в реальном времени». М.: Бином. Лаборатория знаний; 2009. [Rebrikov DV, Samatov GA, Trofimov DYU, Semenov PA, Savilova AM, Kofiadi IA, Abramov DD. PCR «Real Time». Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy; 2009 (In Russ.)]
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209–19.
- Кузнецов ВВ, Кузнецова ВВ, Романова ГА, ред. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: Бином. Лаборатория знаний; 2012. [Kuznetsov VV, Kuznetsova VV, Romanova GA, eds. Molecular-Genetic and Biochemical Methods in Modern Plant Biology. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy; 2012 (In Russ.)]
- Wilchek M, Bayer EA. The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Application. *Anal Biochem.* 1988;171(1):1–32.
- Blakeley RL, Zerner B. Jack Bean Urease: the First Nickel Enzym. *J Mol Catalysis.* 1984;23(2–3):263–92.
- Ishikawa E, Imagawa M, Hashida S, Yoshitake S, Hamaguchi Y, Ueno T. Enzyme-Labeling of Antibodies and Their Fragments for Enzyme Immunoassay and Immunohistochemical Staining. *J Immunoassay.* 1983;4(3):209–327.
- Molecular Devices. The Threshold DNA Assay Kit. Available from: <https://www.moleculardevices.com/reagents-supplies/assay-kits/contaminant-detection-assays>
- Mehta S, Keer JT. Performance Characteristics of Host-Cell DNA Quantification Methods. *BioProcess Int.* 2007;4(9):44–58.
- EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2nd ed.; 2000. Available from: <https://eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2000-1.pdf>
- Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017;17(1):27–31. [Volkova RA, Fadeikina OV. The Problem of Estimating the Uncertainty of Test Methods and Standard Samples of Immunobiological Medicines BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2017;17(1):27–31 (In Russ.)] DOI: 10.30895/2221-996X-2017-17-1-27-31
- Cygnus Technologies. CHO DNA Amplification Kit in Tubes. Available from: https://cygnustechnologies.com/product_info.php/products_id/442/cplD/53
- Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016;16(4):229–36. [Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA, et al. Topical Issues Related to Reference Standards in the Sphere of Circulation of Biological Products. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2016;16(4):229–36 (In Russ.)] DOI: 10.30895/2221-996X-2016-16-4-229-236
- Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологиче-

ских лекарственных препаратов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013;(2):28–32. [Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeykina OV. Industry Reference Standards Certification for the Control of Medical Immunobiological Preparations. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2013;(2):28–32 (In Russ.)]

Об авторах

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

Мыца Елена Дмитриевна. Эксперт 2 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Чертова Наталья Вячеславовна. Эксперт 2 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП

Эльберт Елизавета Викторовна. Главный эксперт лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Сухно Анатолий Сергеевич. Эксперт 1 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук

Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, доктор мед. наук, профессор

Поступила 11.10.2017

Принята к публикации 26.04.2018

36. Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General Monograph 1.1.0012.15 Validation of Analytical Techniques. The State Pharmacopoeia of Russian Federation. 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]

Authors

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

Elena D. Mytsa. 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Natalia V. Chertova. 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality

Yelizaveta V. Elbert. Chief Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Anatoliy S. Sukhno. 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Rauza A. Volkova. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences

Vadim A. Merkulov. Deputy Director-General for Medicinal Products' Evaluation. Doctor of Medical Sciences, Professor

Received 11 October 2017

Accepted 26 April 2018