

О. В. Гунар, И. А. Буйлова

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Минздрава России, Россия, 123182, Москва, ул. Щукинская, 6, к.1.

Представлен новый подход к анализу микробиологической чистоты некоторых лекарственных средств (ЛС), в частности субстанций для производства стерильных лекарственных препаратов, которые в количестве 23 наименований явились объектами исследования. Среди изученных ЛС имеются 3 образца, произведенные биотехнологическим путем. Разработанная и апробированная авторами схема, представленная в работе, включает инокуляцию образцов ЛС тест-микроорганизмами и последующее качественное и количественное выделение бактерий и грибов. Выполненное валидационное исследование обосновало возможность уменьшения количества образца для микробиологического анализа до 3 г для получения достоверных результатов согласно представленной схеме. При этом в качестве растворителя (разбавителя) изучаемых ЛС и среды для накопления микроорганизмов был использован триптиказо-соевый бульон.

**Ключевые слова:** лекарственные средства; контроль качества; микробиологическая чистота.

Одним из основных достижений биотехнологии является создание новых высокоэффективных лекарственных препаратов с использованием методов генной инженерии. Это в полной мере касается лекарственных средств (ЛС), разработанных на основе моноклональных антител, препараты которых используются для лечения онкологических заболеваний, в трансплантологии для профилактики и подавления реакции отторжения, лечения аутоиммунных, аллергических, инфекционных и сердечно-сосудистых заболеваний [1 – 3].

Широкое применение в клинической практике новых отечественных и зарубежных лекарственных препаратов, полученных с использованием генно-инженерных технологий, требует гармонизации требований к процессу их производства, контролю качества активной субстанции и готового лекарственного продукта. Разработка этих нормативов должна соответствовать современным научным достижениям, а требования отечественных регламентирующих документов необходимо гармонизировать с зарубежными аналогами [2, 4, 5].

Испытание ЛС по показателю “Микробиологическая чистота” проводится в соответствии с действующим изданием Государственной фармакопеи и включает в себя как количественное определение содержания микроорганизмов в 1 г (мл) образца, так и выделение отдельных видов бактерий [6].

Для фармацевтических субстанций, в том числе биотехнологического производства, согласно ОФС “Микробиологическая чистота” требуется образец массой 20 г (мл). Очевидно, что для препаратов, получаемых в ограниченных объемах, использование такого количества образца для анализа является высокозатратным и в большинстве случаев неприемлемым. Исходя из вышесказанного, встает вопрос о возможности и обоснованности уменьшения массы образца для микробиологического анализа.

Настоящее исследование выполнено с целью совершенствования методики анализа качества ЛС по показателю “Микробиологическая чистота”. Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ нормативной документации (НД), регламентирующей требования к качеству и количеству используемых для испытания по показателю “Микробиологическая чистота” ЛС.
2. Разработать алгоритм определения микробиологической чистоты ЛС, оптимизируя количество анализируемого образца.
3. Оценить возможность использования разработанного алгоритма для оценки микробиологической чистоты биотехнологических ЛС на примерах ритуксимаба, нимотузумаба, рекомбинантного инсулина человеческого.

Для решения первой задачи были проанализированы материалы фармакопей различных стран, а также нормативная документация (НД) производителей ЛС.

Анализ показал, что зарубежные фармакопеи, такие как европейская, японская, индийская, международная, фармакопея США, предусматривают возможность уменьшения количества образца для анализа. В табл. 1 представлены причины, по которым возможно уменьшить количество образца для анализа согласно данным зарубежных фармакопей [7 – 11].

В ОФС “Микробиологическая чистота” ГФ XIII издания в разделе “Отбор образцов ЛС” указано: “...В некоторых случаях (при высокой стоимости препарата и/или малом объеме серии) образец может быть уменьшен в отдельных случаях до 2 – 3 г (мл). Уменьшение количества образца с указанием метода испытания должно быть обосновано и утверждено в нормативной документации в установленном порядке...”.

Отдельные производители ЛС пытаются решить проблему по уменьшению количества образца для

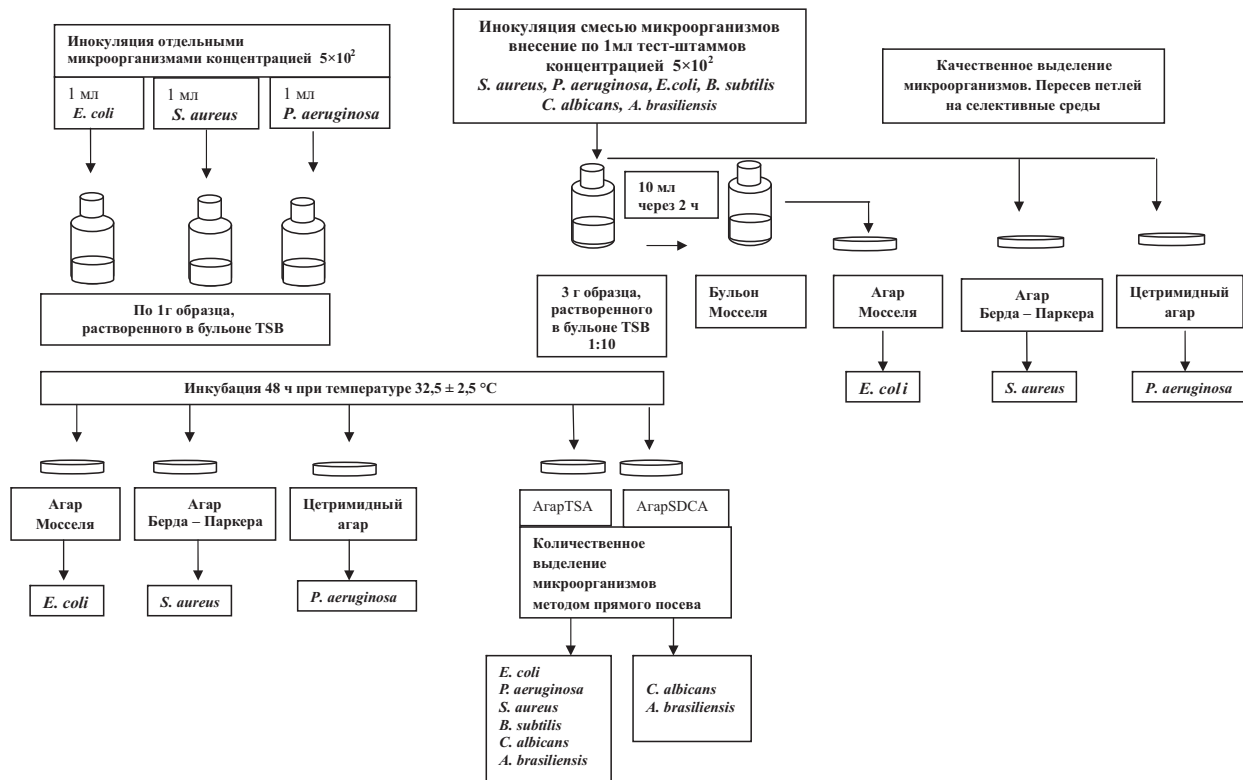


Схема инокуляции и последующего выделения микроорганизмов из контаминированных ЛС

микробиологического анализа, предоставляя валидационные материалы на стадии регистрации.

Для решения второй задачи нами разработан алгоритм, позволяющий снизить количество образцов ЛС для анализа, имеющих высокую стоимость и/или выпускаемых в ограниченном объеме.

### Экспериментальная часть

В работе использовали субстанции 23 наименований, относящиеся к различным химическим и фармакологическим группам, из них 3 – биотехнологического производства. Данные о производителях исследуемых образцов приведены в табл. 2.

Исследование проводили на тест-штаммах микроорганизмов *Candida albicans* ATCC 10231; *Escherichia coli* ATCC 8739; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

В работе использовали раствор натрия хлорида 0,9 %; триптиказо-соевую среду (TSA); среду Сабуро (SDCA); триптиказо-соевый бульон (TSB); агар Брейда – Паркера; цетримидный агар; агар Эндо-ГРМ для выявления энтеробактерий.

В ходе исследования использовали инкубаторы (фирма Binder, Германия); ламинарный шкаф (фирма Labconco, США); счетчик колоний Scan 100 (фирмы Interscience, Франция).

При анализе в соответствии с разработанным алгоритмом применяли чашечный метод глубинного посева.

На первом этапе разработки алгоритма были использованы 20 образцов ЛС различных наименований, например, такие как мемодерм, димексид, таурин, надропарин и другие. Процедура оценки пригодности методики полностью воспроизводила процесс реального теста с использованием аналогичной подготовки образцов и питательных сред, описанных в ОФС «Микробиологическая чистота» [12]. При подготовке выбранных субстанций к исследованию [6] определяли и устраняли (в случае необходимости) антимикробное

Таблица 1

### Уменьшение количества образца для микробиологического анализа, описанное в зарубежных фармакопеях

Причина уменьшения количества образца для анализа	Количество образца
Количество в дозированной форме (таблетке, капсуле, инъекциях) – не более 1 мг	количество образца для анализа может составлять величину, не меньше содержащего 10 единиц или 10 г (мл) продукта
Количество на г (мл) (для недозированных препаратов) – менее чем 1 мг	
Количество вещества ограничено или размер серии крайне мал – менее 1000 г (мл)	1 % от серии
Общий размер серии – менее 200 единиц	количество образца для анализа может быть уменьшено до 1 – 2 единиц

действие образцов для снижения риска получения ложноотрицательных результатов. В соответствии с разработанной схемой в качестве разбавителя использовали триптиказо-соевый бульон вместо раствора натрия хлорида 0,9 %, что позволило снизить количество ЛС для качественного и количественного определения микроорганизмов. При подтверждении пригодности разработанного алгоритма производили контаминацию взвесями фармакопейных тест-штаммов. Инокуляты тест-штаммов вносили в образцы, отобранные в количестве 6 г, из которых в 3 г вносили смесь микроорганизмов. В каждый из оставшихся 3 г отдельно вносили отдельный вид тест-штамма (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Тест-микроорганизмы готовили следующим образом: 24-часовые культуры *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* ATCC 8739 смывали стерильным раствором натрия хлорида 0,9 % изотоническим и доводили взвесь до теоретической концентрации  $10^7$  и  $10^9$  колониеобразующих единиц в мл (КОЕ/мл), соответственно. Культуры микроорганизмов стандартизовали с помощью международного оптического стандарта мутности 10 ЕД [13]. Из стандартизованных инокулятов и взвесей спор *B. subtilis* и *A. brasiliensis* делали ряд последовательных разведений до конечной концентрации клеток  $5 \cdot 10^2$  КОЕ/мл. Фактическое количество микроорганизмов в взвесах определяли с помощью посева поверхностным методом на соответствующие питательные среды. Учет результатов проводили через

Таблица 2  
Фирмы-производители исследованных лекарственных средств

Отечественные	Зарубежные
ООО "Фармамед"	"Pioneer Agro Industries (Pharmaceutical Division), Prop. Sanvin Laboratories Pvt. Ltd.", Индия
ЗАО "Московская фармацевтическая фабрика"	"Fresenius Kabi Austria GmbH", Австрия
ОАО "Марбиофарм"	"Dishman Pharmaceuticals and Chemicals Limited", Индия
ООО "Компания Деко"	"Sterling S. N. I. F. F. Italia S.p. A.", Италия
ООО "Полисинтез"	"Hebei Changshan Biochemical Pharmaceutical Co. Ltd.", Китай
ООО "Фарма Био"	"Esco-European salt company GmbH & Co. KG", Германия
ОАО "Ай Си Эн Лексредства"	"BASF PharmaChemikalien GmbH & Co. KG", Германия
ЗАО "Генериум"	"Jinan Mingxin Pharmaceutical Co. Ltd.", Китай
ЗАО "Биокад"	"Farmabios S.p. A.", Италия
ОАО "Синтез"	"Gan & Lee Pharmaceuticals", Китай
	Zhejiang Cheng Yi Pharmaceutical Co. Ltd., Китай

48 – 72 ч. При этом количество колоний, обнаруженных на триптиказо-соевом агаре, подсчитывали суммарно и сравнивали с суммой колоний на контрольной среде. Питательная среда Сабуро – агар (SDCA) – яв-

Таблица 3  
Процент восстановления микроорганизмов, выделенных из контаминированных фармацевтических субстанций синтетического производства

№ п/п	Наименование субстанции	Название среды			
		триптиказо-соевый агар (TSA)		агар Сабуро (SDCA)	
		Тест-штаммы			
		<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
1	Аминокапроновая кислота	86	76	75	80
2	Артикаин	87	73	91	80
3	Бетаксолон	83	70	76	80
4	Гидроксиэтилкрахмал	100	81	107	95
5	Глицерин	76	77	84	81
6	Димексид	84	74	73	82
7	Йогексол	100	75	82	80
8	Ко-карбоксилаза	108	70	105	73
9	Лидокаин	83	70	72	80
10	Мемодерм	92	71	73	86
11	Метионин	92	78	82	104
12	Надропарин	84	80	84	95
13	Натрия хлорид	92	77	92	91
14	Оксиметазолин	79	71	72	80
15	Рибавирин	123	71	96	80
16	Стемокин	71	71	78	92
17	Таурин	76	75	76	86
18	Тимодепрессин	70	70	75	78
19	Триамцитолон ацетонид	84	83	92	95
20	Хондроитина сульфат	92	80	92	104

Таблица 4  
**Процент восстановления микроорганизмов из контаминированных ЛС биотехнологического производства**

Наименование ЛС	Название среды			
	триптиказо-соевый агар (TSA)		агар Сабуро (SDCA)	
	Тест-штаммы			
	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
Ритуксимаб	92	71	73	86
Нимотузумаб	92	78	82	104
Инсулин модифицированный человеческий	76	77	84	81

ляется селективной для выращивания дрожжевых и плесневых грибов, колонии которых визуальны различимы между собой, что позволяет произвести учет каждого из родов микроскопических грибов отдельно.

По результатам эксперимента вычисляли коэффициент восстановления ( $R$ ) – отношение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в исследуемой группе (в присутствии ЛС) к количеству КОЕ в контрольной группе (без ЛС):

$$R = \frac{N}{N_0} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где  $N$  – количество колоний, выделенных в ходе анализа;  $N_0$  – количество внесенных клеток микроорганизмов.

### Результаты и их обсуждение

Используя предложенную выше схему для инокуляции и последующего выделения микроорганизмов, сначала апробировали 20 наименований субстанций химического производства. Табл. 3 демонстрирует процент восстановления микроорганизмов, рассчитанный по формуле (1).

Как видно из табл. 3, процент восстановления микроорганизмов, выделенных из инокулированных фармацевтических субстанций, находился в диапазоне от

70 до 123 %, что соответствует требованиям международных фармакопей (согласно Европейской фармакопее текущего издания – от 50 до 200 %) [8].

Следует отметить, что исследуемые субстанции имели различную физико-химическую природу и относились к различным фармакологическим группам, однако это не оказало влияния на восстановление микроорганизмов.

После проверки пригодности разработанного алгоритма для субстанций синтетического производства данную схему применили для биотехнологических ЛС. Результаты представлены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, процент восстановления микроорганизмов из инокулированных биотехнологических ЛС находился в пределах от 71 до 104 %. Это означает, что микроорганизмы, внесенные в образец, аналогично восстанавливаются из уменьшенного до 1 г количества образца.

Данные были статистически обработаны. Значения коэффициента Фишера, рассчитанного на основе полученных результатов, приведены в табл. 5.

Сравнение рассчитанных коэффициентов Фишера с табличными значениями критерия ( $F_{\text{таб}} = 19$ ) свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий между полученными результатами.

Представленная схема демонстрирует алгоритм выявления отдельных микроорганизмов из контаминированного смесью микроорганизмов образца ЛС массой до 3 г.

Результаты, полученные при выделении отдельных видов бактерий, с помощью методик, подразумевающих использование в качестве растворителя накопительной питательной среды, свидетельствуют о том, что *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* сохраняют типичные для данных тест-штаммов морфологические и культуральные свойства, несмотря на контакт с ЛС. Таким образом, показано, что выделение и дифференциация микроорганизмов возможна из образца ЛС массой 3 г.

Выполненный сравнительный анализ НД, регламентирующей требования к качеству и количеству ЛС для микробиологического анализа, показал необходимость введения в НД метода проведения испытания и количества образца в случае различий с указаниями Государственной фармакопеи.

Таблица 5  
**Коэффициент Фишера, рассчитанный для результатов восстановления тест-штаммов из инокулированных биотехнологических ЛС**

Наименование субстанции	Коэффициент Фишера ( $F$ ) при $F_{\text{таб}} = 19$ ( $f = 2, p = 0,95$ )			
	среда TSA		среда SDCA	
	Тест-штаммы			
	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
Ритуксимаб	4,0	4,0	3,8	6,2
Нимотузумаб	3,0	1,75	9,0	5,6
Инсулин модифицированный человеческий	10,5	1,5	1,5	1,4

Модифицированная схема определения микробиологической чистоты ЛС позволяет уменьшить количество образца для анализа с 20 до 3 г за счет одновременного использования триптиказо-соевого бульона в качестве растворителя (разбавителя) и среды для накопления микроорганизмов.

Результаты апробации модифицированной методики на 23 наименованиях ЛС, 3 из которых биотехнологического производства, подтверждают возможность ее использования для микробиологического анализа уменьшенного количества образца.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ж. И. Авдеева, Н. А. Алпатова, Р. А. Волкова и др., *Биопрепараты*, № 1, 28 – 32 (2013).
2. F. Lotfipour, S. Hallaj-Nezhadi, *Latest Research into Quality Control*, INTECH Open Access Publisher, Tabriz (2012), pp. 195 – 214.
3. Д. А. Борисов, М. В. Проценко, А. В. Печенкин, *Фармакоэкономика*, № 3, 34 – 39 (2011).
4. М. В. Проценко, Р. И. Ягудина, *Фармакоэкономика*, № 4, 13 – 20 (2010).
5. R. A. Rader, *BioProcess International*, No. 3, 18 – 27 (2013).
6. *Государственная фармакопея РФ*, XII изд., Москва (2008), ч. 1, сс. 160 – 194.
7. *European Pharmacopoeia*, 8th edition (2014); [Электронный ресурс] (EDQM).URL:<http://online.edqm.eu/entry.htm> (дата обращения 16.01.2015)
8. *The United State Pharmacopoeia*, National Formulary (2013), USP 36, NF 31.
9. *The International Pharmacopoeia*, Fourth Edition, URL: <http://apps.who.int/phint/en/d/Jb/7.3.3.1.html> (дата обращения 29.12.2014).
10. *The Japanese Pharmacopoeia*, Sixteenth Edition (2011), p. 108.
11. *Indian Pharmacopoeia Commission* (2010); URL: <http://www.ipc.gov.in/> (дата обращения 15.01.2015).
12. О. В. Гунар, Р. П. Карасев, *Фармация*, № 6, 3 – 6 (2012).
13. О. В. Гунар, Н. Г. Сахно, К. А. Каграманова и др., *Фармация*, № 2, 47 – 49 (2011).

Поступила 01.06.15

## MICROBIOLOGICAL QUALITY CONTROL OF BIOTECHNOLOGICAL PHARMACEUTICALS

O. V. Gunar and I. A. Builova

Scientific Center for Expertise of Medical Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 123182 Russia

A new approach to microbiological examination of some pharmaceuticals is described, which can be used in particular in manufacturing sterile medicinal products. The proposed approach has been verified in a series of 23 samples of various products, three of which were obtained by biotechnological methods. The scheme includes inoculation of samples with test strains, followed by isolation and analysis of contaminants. The results of validation showed the possibility of reducing the amount of products for microbiological analysis to 3 g which is sufficient for obtaining reliable results. The role of a solvent (diluent) and enrichment broth for microbe growth was played by trypticase soy broth.

Keywords: drugs; microbiological purity; quality control.