Обзорная статья / Review article

УДК 579.66

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2064

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка, характеризация, трансфер банков клеток на основе *Esherechia coli* для производства биофармацевтических препаратов (обзор)

Е. А. Буслаева[1]✉, С. А. Аликина[2], З. Р. Хасаншина[1, 2], Л. М. Кряжевских[1], А. Н. Кучеренко[1], Р. В. Драй[1]

[1] Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34, литера А

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (НИУ ИТМО). 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д 49, литера А

✉ **Контактное лицо:** Буслаева Евгения Александровна. **E-mail:** evgeniia.buslaeva@geropharm.com

ORCID: Е. А. Буслаева – https://orcid.org/0009-0000-4389-8605;
С. А. Аликина – https://orcid.org/0009-0006-9504-7961;
З. Р. Хасаншина – https://orcid.org/0000-0002-0065-1853;
Л. М. Кряжевских – https://orcid.org/0009-0005-9519-4489;
А. Н. Кучеренко – https://orcid.org/0009-0003-9134-9944;
Р. В. Драй – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Статья поступила: 26.03.2025 **Статья принята в печать:** 04.08.2025 **Статья опубликована:** 05.08.2025

Резюме

Введение. На международном фармацевтическом рынке важное место занимают биопрепараты, созданные с использованием методов рекомбинантной ДНК. Сегодня бактериальные штаммы и клеточные линии млекопитающих широко используются для производства рекомбинантных белков, моноклональных антител и вакцин. Для того чтобы поддерживать постоянное качество и однородность исходного посевного материала, создаются банки клеток.

Текст. Основные рекомендации по разработке банков клеток изложены в руководствах, касающихся качества лекарственных препаратов, ICH Q5. В России аналогичные требования представлены в решении Совета Евразийской экономической комиссии № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». В соответствии с вышеуказанными рекомендациями возможно формирование одно- или двухуровневой системы банка клеток. Первым шагом должно быть создание главного банка клеток (ГБК), который создается в соответствии с высокими стандартами качества. ГБК следует инициировать из одной хорошо охарактеризованной бактериальной колонии. Следующим шагом будет создание рабочего банка клеток (РБК) из одного или нескольких контейнеров ГБК. В связи с тем, что все РБК созданы на основе хорошо охарактеризованных ГБК, их характеризация может быть сокращена. При характеризации оценивается идентичность, чистота и стабильность банков клеток. Рекомендации для проведения тестов представлены в нормативных документах. Тесты на идентичность подтверждают, что клетки в банке точно идентифицированы и соответствуют предполагаемой клеточной линии. Это крайне важно для предотвращения перекрестной контаминации и обеспечения использования соответствующих клеточных линий в производственных процессах. Оценка чистоты проводится с целью подтверждения отсутствия контаминантов, таких как бактерии, грибы и микоплазмы, в составе клеточной линии. Контроль микробиологической чистоты является ключевым компонентом оценки и гарантирует, что в производственном процессе используются клетки, свободные от контаминантов. Характеризация клеточных банков позволяет оценить генетическую стабильность клеток с течением времени. Это включает в себя оценку того, сохраняют ли клетки свои предполагаемые генетические характеристики и не подвергаются ли нежелательным мутациям во время культивирования. При трансфере технологии производитель также должен предоставить полную информацию о характеризации банков клеток.

Заключение. В данной статье изложены основные принципы разработки, характеризации и трансфера банков клеток на основе бактериальной системы экспрессии.

Ключевые слова: главный банк клеток, рабочий банк клеток, ICH, система экспрессии, характеризация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

© Буслаева Е. А., Аликина С. А., Хасаншина З. Р., Кряжевских Л. М., Кучеренко А. Н., Драй Р. В., 2025
© Buslaeva E. A., Alikina S. A., Khasanshina Z. R., Kriazhevskikh L. M., Kucherenko A. N., Drai R. V., 2025

Вклад авторов. Е. А. Буслаева и С. А. Аликина – проведение обзора литературы, сбор информации, написание основного текста статьи. З. Р. Хасаншина – формулирование основной концепции статьи, редактирование текста статьи. Л. М. Кряжевских и А. Н. Кучеренко – проведение обзора литературы, согласование итогового варианта статьи. Р. В. Драй – определение основного направления исследования, утверждение окончательной версии статьи.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Спонсор не оказывал влияния на ход исследования и интерпретацию результатов.

Для цитирования: Буслаева Е. А., Аликина С. А., Хасаншина З. Р., Кряжевских Л. М., Кучеренко А. Н., Драй Р. В. Разработка, характеризация, трансфер банков клеток на основе *Esherechia coli* для производства биофармацевтических препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(3). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2064

Escherichia coli cell bank: development, characterization, and transfer for biopharmaceutical medicines production (review)

Eugenia A. Buslaeva[1]✉, Svetlana A. Alikina[2], Zukhra R. Khasanshina[1, 2], Larisa M. Kriazhevskikh[1], Anastasiya N. Kucherenko[1], Roman V. Drai[1]

[1] Closed Joint Stock Company "Pharm-Holding". 34A, Svyazi str., Strelna settlement, Saint-Petersburg, 198515, Russia
[2] Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics. 49A, Kronverksky prospect, Saint-Petersburg, 197101, Russia

✉ **Corresponding author:** Eugenia A. Buslaeva. **E-mail:** evgeniia.buslaeva@geropharm.com

ORCID: Eugenia A. Buslaeva – https://orcid.org/0009-0000-4389-8605;
Svetlana A. Alikina – https://orcid.org/0009-0006-9504-7961;
Zukhra R. Khasanshina – https://orcid.org/0000-0002-0065-1853;
Larisa M. Kriazhevskikh – https://orcid.org/0009-0005-9519-4489;
Anastasiya N. Kucherenko – https://orcid.org/0009-0003-9134-9944;
Roman V. Drai – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Received: 26.03.2025 **Accepted:** 04.08.2025 **Published:** 05.08.2025

Abstract

Introduction. Biological medicines produced using recombinant DNA technology play an important role in the international pharmaceutical market. Currently, bacterial and mammalian expression systems are widely used to produce recombinant proteins, monoclonal antibodies, and vaccines. To maintain the quality and stability of inoculation, cell banks are generated.

Text. The general recommendations for cell bank development are outlined in the ICH Q5 guidelines. In the Russian Federation, similar requirements are specified in Decision No. 89 of the Council of the Eurasian Economic Commission "On approval of the Rules for assessments of biological medicines in the EAEU". Based on these requirements, one- or two-level cell banks should be established. Initially, a Master cell bank (MCB) is generated from a well-characterized single-cell bacterial colony according to high-quality standards. Subsequently, a Working cell bank (WCB) is created from one or several well-characterized MCB cryovials. As a result, the number of parameters required for WCB characterization can be reduced. The identity, purity, and stability of the cell bank should be determined. Requirements for cell bank characterization are detailed in official guidelines. An identity test is used to confirm the cell line or strain identification, which is a critical step to prevent cross-contamination and ensure the correct cell line in manufacturing processes. The absence of bacterial, fungal, or other types of contamination is demonstrated through purity testing. The sterility test is a key component, ensuring that a pure cell is used. The stability test demonstrates the genetic stability of the cells, including the preservation of genetic characteristics and the monitoring of harmful mutations during cultivation processes. Comprehensive data on the cell bank history, development, and characterization should be provided during its transfer.

Conclusion. This research presents the general concept of microbial cell bank development, characterization, and transfer based on bacterial expression systems.

Keywords: master call bank, working cell bank, ICH, expression system, characterization

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Eugenia A. Buslaeva and Svetlana A. Alikina – literature review, data analysis, writing. Zukhra R. Khasanshina – conceptualization, writing, review and editing. Larisa M. Kriazhevskikh and Anastasiya N. Kucherenko – literature review, writing, review and editing. Roman V. Drai – supervision, approval of final text.

Acknowledgment. This work was carried out with financial support from GEROPHARM. The sponsor did not influence the research's course or the interpretation of its results.

For citation: Buslaeva E. A., Alikina S. A., Khasanshina Z. R., Kriazhevskikh L. M., Kucherenko A. N., Drai R. V. *Escherichia coli* cell bank: development, characterization, and transfer for biopharmaceutical medicines production. *Drug development & registration*. 2025;14(3). (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-3-2064

ВВЕДЕНИЕ

На международном фармацевтическом рынке выделяется группа высокоэффективных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК. В начале 1982 года был одобрен первый генно-инженерный лекарственный препарат – рекомбинантный инсулин, который производился с помощью экспрессионной системы *Esherechia coli* [1, 2]. Это позволило получить новый надежный и постоянный источник инсулина для больных сахарным диабетом. Бактериальные штаммы по-прежнему широко используются для получения рекомбинантных белков и вакцин [3]. В конце 1980-х годов клеточные линии млекопитающих стали использоваться для получения рекомбинантных моноклональных антител и некоторых белков [4]. В период с 2014 по 2018 год в США и Европейском союзе было одобрено 155 биофармацевтических препаратов [5]. В настоящее время по всему миру продается более 300 биологических препаратов для терапии таких заболеваний, как нарушение обмена веществ (например, диабет 1 и 2 типа, гипогликемия), гематологические расстройства (например, анемия и хроническая болезнь почек, гемофилия А, геморрагический диатез, связанный с нарушениями свертываемости крови), а также в онкологии (например, меланома, рак молочной железы) [6–8].

Создание терапевтических белков включает несколько ключевых этапов (выбор системы экспрессии, культивирование клеток, создание банков клеток, выделение и очистка белка, разработка готовой лекарственной формы, тестирование безопасности и эффективности, регистрация и выпуск на рынок, полномасштабное производство) и является сложным и длительным процессом [6]. Разработка биопрепаратов требует значительных финансовых вложений, так как их применение часто предполагает многократное введение доз в течение длительного времени. Это связано с необходимостью производства больших объемов лекарственного вещества, которое должно оставаться доступным по цене. Для этого важно снизить производственные затраты и с время производства. Такие меры необходимы, чтобы продукт соответствовал клиническим стандартам и был успешно выведен на рынок [9].

Выбор подходящей системы экспрессии и вектора экспрессии является ключевым этапом в производстве рекомбинантных препаратов. Линии клеток, штаммы-продуценты, называемые клеточными субстратами, используемыми для производства биологических препаратов, могут быть клетками млекопитающих, дрожжей, насекомых, бактерий, грибов [10–12]. Данные субстраты являются источниками банков клеток и основным исходным материалом, который используется для производства активной фармацевтической субстанции [13]. Чтобы обеспечить постоянный источник клеток для производственного процесса, банки клеток должны быть созданы и поддерживаться в соответствии со строгими требованиями стандартов качества, производства и регулирования. Таким образом, банк клеток является критически важным исходным сырьем для производства биологических активных фармацевтических субстанций[1, 2, 3, 4] [14]. В данном обзоре представлены ключевые подходы к созданию и поддержанию банков клеток *E. coli*.

Система банков клеток

В процессе производства биотехнологических препаратов бактериальная культура не ферментируется непрерывно, поскольку есть риск контаминации производственного штамма другими биологическими материалами, а также вероятность спонтанного мутагенеза, что может привести к потере стабильности штамма. Для предотвращения подобных ситуаций была разработана система банков клеток. Эта система позволяет получать один и тот же исходный материал на протяжении всего производственного процесса, сохраняя его в неизменном и неповрежденном виде [14].

Общие требования к производству биофармацевтических препаратов, начиная от создания банков клеток и заканчивая регистрацией лекарственных средств, содержатся в стандартах ICH (The International Council for Harmonisation). ICH предоставляет производителям рекомендации по производству безопасных и эффективных лекарственных средств[5]. В России аналогичные требования представлены в решении Совета Евразийской экономической комиссии № 89 «Об утверждении Правил проведения исследо-

[1] FDA Q11 Development and Manufacture of Drug Substances. Available at: https://www.fda.gov/media/80909/download Accessed: 17.07.2025.

[2] FDA Characterization and Qualification of Cell Substrate and other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications, Guidance for Industry. Available at: https://www.fda.gov/media/78428/download Accessed: 17.07.2025.

[3] ICH guideline Q5D Derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-d-derivation-and-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnologicalbiological-products-step-5_en.pdf Accessed: 17.07.2025.

[4] ICH guideline Q5B Quality of Biotechnological Products: Analysis of Expression Construct in Cell Lines Used for Production of r-DNA Derived Protein Products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-b-analysis-expression-construct-cell-lines-used-production-r-dna-derived-protein-products-step-5_en.pdf Accessed: 17.07.2025.

[5] European Medicines Agency. Presentation – Manufacturing Process of Biologics. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-manufacturing-process-biologics-kowid-ho-afssaps_en.pdf Accessed: 17.07.2025.

ваний биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»[1].

Этапу создания банков клеток предшествует этап разработки штамма, который состоит из получения рекомбинантного вектора с геном интереса, трансформации штамма-хозяина и отбора клона с соответствующими характеристиками методом засева на селективную среду. После того как была выбрана подходящая система экспрессии, которая гарантирует высокую и постоянную экспрессию рекомбинантного белка, необходимо создать полностью описанные и охарактеризованные банки клеток, чтобы гарантировать наличие достаточного запаса эквивалентных клеток для использования в течение всего срока жизни продукта (рисунок 1)[2, 3, 4, 5, 6, 7, 8] [15]. В соответствии с рекомендациями, содержащимися в ICH Q5D и решении Совета ЕЭК № 89, возможно создание одно- или двухуровневой системы банка клеток. Двухуровневая система банков клеток является наилучшим подходом для непрерывного производства продукта[9, 10, 11].

Наиболее важные рекомендации по созданию банков клеток собраны в ICH Q5B и ICH Q5D, а также в решении Совета ЕЭК № 89. Система банков клеток обеспечивает идентичность популяции клеток, что критически важно для создания однородных биотехнологических продуктов. Правильно подготовленный, документировано описанный, надлежащим образом хранимый и охарактеризованный банк клеток обеспечивает однородность исходного материала на всех этапах производства. Банки клеток создаются в соответствии с GMP (надлежащая производственная практика) или приобретаются из внешних источников [например, организации ATCC (American Type Culture Collection) и ВКМ (Всероссийская коллекция микроорганизмов)]. После получения банк клеток подлежит обязательной характеризации, за качество которой несет ответственность производитель независимо от источника происхождения.

На этапе разработки лекарственных средств формируется предварительный банк клеток (Preliminary cell bank, ПБК). Он создается из одной хорошо изолированной бактериальной колонии, полученной в результате трансформации бактериального штамма-хозяина с выбранным вектором экспрессии на среде с добавлением селективного маркера, например антибиотика. ПБК формируется до создания главного банка клеток (ГБК)[12]. Несмотря на то, что ПБК может быть получен вне стандартов GMP, для него проводится полная характеризация в объеме, сопоставимом с характеризацией ГБК.

---

[1] Решение Совета Евразийской экономической комиссии №89 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0089/. Ссылка активна на 17.07.2025.

[2] ICH guideline Q5A(R2) on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r2-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-or-animal-origin-step-2b_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[3] ICH guideline Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-e-comparability-biotechnologicalbiological-products-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[4] ICH guideline Q5C Stability testing of biotechnological/biological products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-topic-q-5-c-quality-biotechnological-products-stability-testing-biotechnologicalbiological-products_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[5] ICH guideline Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-and-acceptance-criteria-biotechnologicalbiological-products-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[6] ICH guideline Q11 Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q11-development-and-manufacture-drug-substances-chemical-entities-and-biotechnologicalbiological-entities_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[7] ICH guideline Q8 (R2) Pharmaceutical development. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-considerations-ich-guideline-q8-r2-pharmaceutical-development-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[8] ICH guideline Q7 Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-7-good-manufacturing-practice-active-pharmaceutical-ingredients-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[9] ICH guideline M4Q(R1) Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Quality. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m4q-common-technical-document-registration-pharmaceuticals-human-use-quality-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[10] ICH guideline Q9 on quality risk management. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich-guideline-q9-quality-risk-management-step-5-first-version_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[11] ICH guideline Q10 Pharmaceutical quality system. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-guideline-q10-pharmaceutical-quality-system-step-5_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

[12] European Pharmacopoeia 5.0. 5.2.3. Cell Substrates for the Production of Vaccines for Human Use. Available at: http://www.uspbpep.com/ep50/5.2.3.%20Cell%20substrates%20for%20the%20production%20of%20vaccines%20for%20human%20use.pdf. Accessed: 17.07.2025.

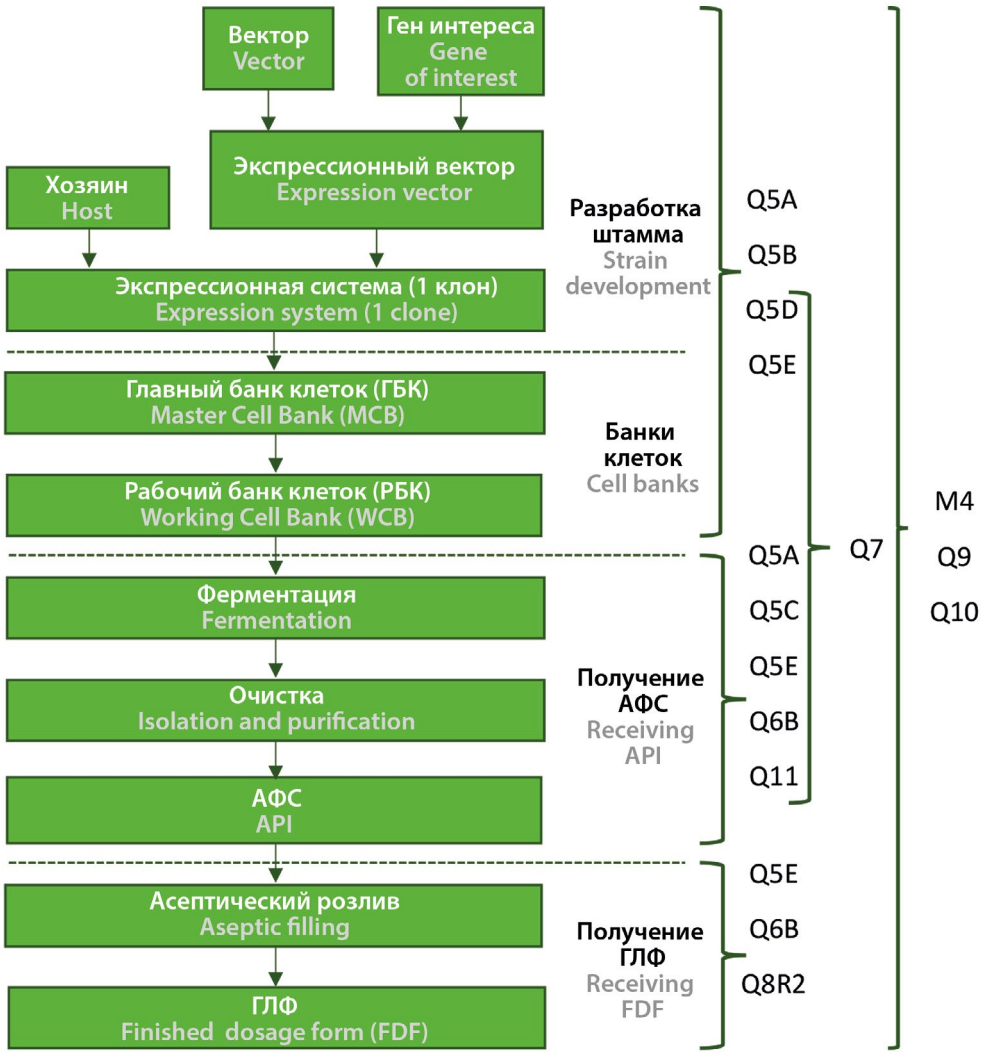

Рисунок 1. Этапы разработки биофармацевтических препаратов

Figure 1. Biopharmaceutical medicines development stages

На следующем этапе создается главный банк клеток (Master cell bank, ГБК). ГБК должен быть сформирован до начала производства серии, предназначенной для проведения 1 фазы клинических исследований, поэтому рекомендуется начать его создание сразу после выбора клона[1]. Данный этап может продолжаться параллельно с подготовкой и характеризацией ГБК. Для непосредственного клинического применения биомолекулы она должна быть произведена на предприятии, соответствующем требованиям GMP, начиная с ГБК, изготовленного в условиях GMP [15]. ГБК, как правило, создается непосредственно из исходного клона или из предварительного банка клеток. Во время формирования ГБК следует принимать все меры предосторожности, чтобы избежать контаминации. Количество контейнеров с культурой должно быть таким, чтобы обеспечить достаточное количество однородного исходного материала для всего производственного процесса. До начала использования главный банк клеток подлежит обязательной полной характеризации [16].

Далее на основе одного или нескольких контейнеров из ГБК создается рабочий банк клеток (Working cell bank, РБК). Рабочий банк клеток представляет собой клеточный материал, который используется непосредственно на производственном процессе. РБК используется для получения серий продукта для проведения 2 и 3 фаз клинических исследований и для последующего коммерческого производства. По мере исчерпания объема РБК в процессе производст-

[1] Cell Banking in the Spotlight: Advising Biologics Developers About Cell Bank Preparation and Characterization. Available at: https://www.bioprocessintl.com/cell-line-development/cell-banking-in-the-spotlight-advising-biologics-developers-about-cell-bank-preparation-and-characterization. Accessed: 17.07.2025.

ва для создания нового банка используется другой замороженный контейнер из ГБК [17]. В рекомендациях ICH Q5D указано, что банки клеток ГБК и РБК могут отличаться друг от друга по определенным параметрам, например составу культуральной среды и условиям культивирования. Однако такие отличия не должны оказывать неблагоприятное воздействие на качество лекарственного препарата. В процессе производства обычно формируется около 100 контейнеров ГБК и 100–500 контейнеров РБК [6].

На завершающем этапе производства на основе рабочего банка клеток создается послепроизводственный банк (End of Production, EoPC). Послепроизводственный банк клеток включает клетки, которые были культивированы до числа пассажей, сопоставимого или превышающего максимальное количество пассажей, используемое в производственном процессе[1] [18, 19]. На каждой производственной площадке создается собственный банк EoPC (клеток конца производства) и выполняется его однократное тестирование для подтверждения сохранения правильной кодирующей последовательности продукта на всех этапах производства [18]. Генетическая последовательность рекомбинантных белков может подвергаться мутациям, что потенциально влияет на структуру, функциональные свойства белка и, как следствие, на его эффективность и безопасность для пациентов. В EoPC важно подтвердить генетическую стабильность и соответствие характеристик исходной клеточной линии. Таким образом, данный банк клеток предназначен для подтверждения стабильности клеточной линии в течение всего жизненного цикла продукта. Кроме того, полученный охарактеризованный банк клеток служит резервным или справочным материалом для будущих производственных процессов.

Если потребуется создать новые банки клеток, на них будут проведены все необходимые тесты, что и для соответствующих банков, включая оценку однородности банка, роста, производительности и вирусной/микробной безопасности. Затем новый банк должен пройти сравнительное исследование для подтверждения того, что его характеристики соответствуют характеристикам предшественника. Процесс создания банков клеток представлен на рисунке 2.

Таким образом, основная задача ГБК – обеспечение достаточного запаса хорошо охарактеризованного источника клеток для производства. Количество наработанного банка клеток зависит от коэффициента использования, на который влияет спрос на продукт. Одноуровневый банк клеток может быть использован в том случае, когда для производства препарата требуется небольшое количество контейнеров.

[1] United States Pharmacopeia. Cell Banking Practices for Recombinant Biologics. Available at: https://www.usp.org. Accessed: 17.07.2025.

Требования к получению клеточных банков, подходы

Каждый производитель, после того как наладит систему банков клеток, должен разработать полную документацию, которая будет подтверждать каждый этап разработки. В соответствии с нормативными документами эта документация должна включать:

- историю культуры штамма-хозяина, включая способ его выделения;
- описание всех генетических манипуляций, включая метод трансформации вектора и способ отбора выбранного клона;
- перечень реагентов, использованных для культивирования клеток и создания банка клеток;
- описание метода криоконсервации, включая использованный криопротектор, параметры замораживания, количество проведенных пассажей; размер банка клеток, включая количество подготовленных контейнеров, способ укупорки, условия хранения контейнеров.

Производитель должен обеспечить защиту банка клеток от микробной и перекрестной контаминации, а также вести систему регистрации для каждого контейнера. Документация должна включать описание маркировки, устойчивой к условиям хранения. На каждом контейнере указываются название штамма, дата производства, уникальный код и номер [6]. Для бесперебойного функционирования системы банков клеток необходимо наличие точной информации о текущем уровне запасов, их местонахождении и истории использования [21].

Создание банков клеток включает в себя процесс криоконсервации клеток. Во время криоконсервации клетки могут быть повреждены из-за образования внутриклеточных кристаллов льда или осмотического давления, возникающих при снижении содержания воды [22]. Чтобы свести к минимуму повреждение клеток, необходимо строго контролировать скорость замораживания и использовать эффективные криопротекторы. В качестве криопротектора для бактериальных клеток часто используется глицерин в концентрации 10–25 % (об./об.) [17, 23].

Для обеспечения непрерывного производства биофармацевтических препаратов необходимо предусмотреть защиту от незапланированных событий (пожары, отключения электроэнергии, ошибки персонала). Банки клеток должны храниться в строгих условиях, обеспечивающих долгосрочную стабильность штамма (например, при –70 °C или в жидком азоте) [24, 25]. Также рекомендуется, чтобы банки клеток, используемые в производстве, хранились в двух или более местах в пределах одного объекта или в центрах, удаленных друг от друга. Со всеми контейнерами должны обращаться одинаково, при однократном извлечении контейнер не должен возвращаться на хранение. Согласно рекомендациям ICH Q5D и решению № 89, доступ к банкам клеток

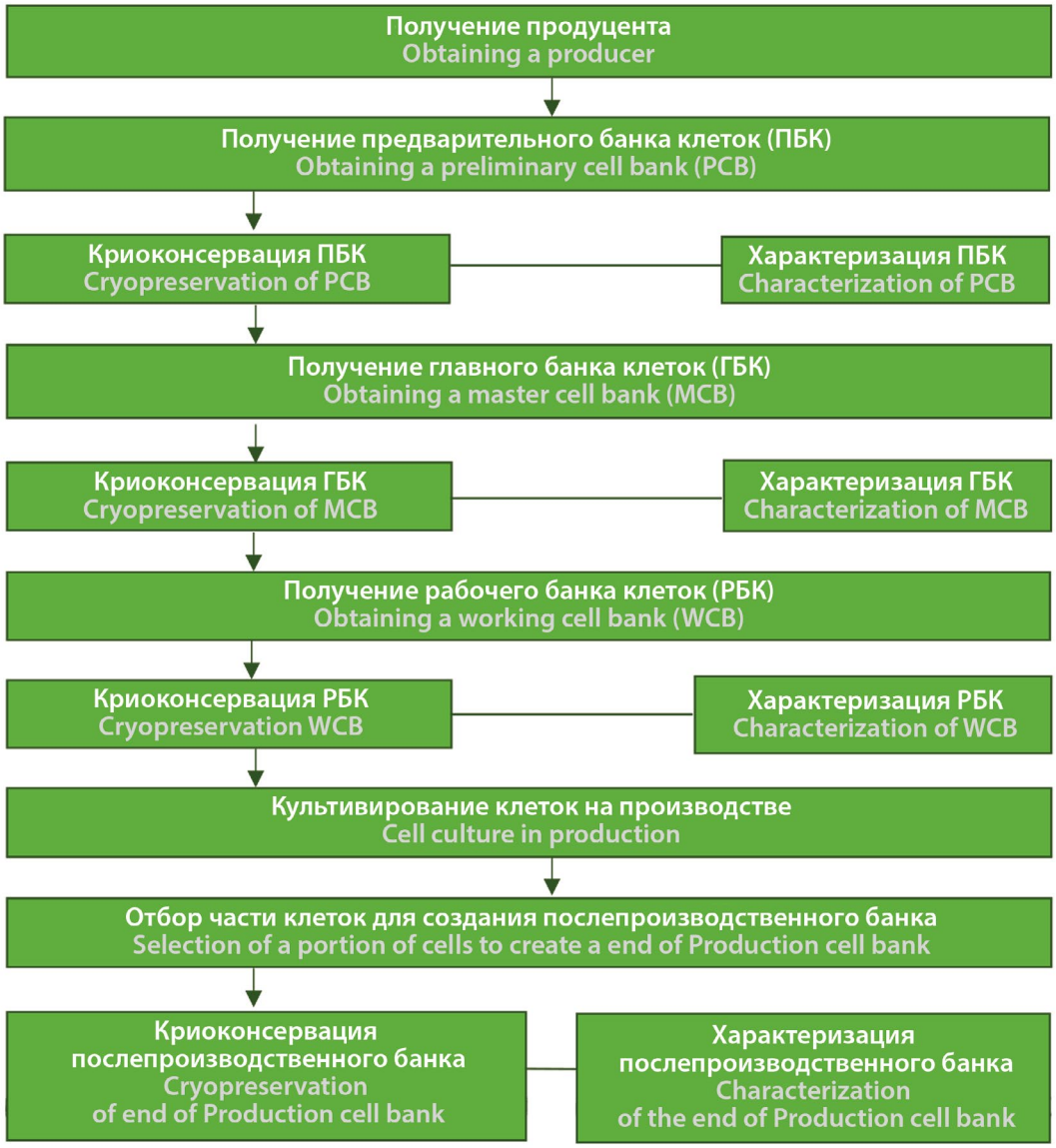

Рисунок 2. Пример блок-схемы процесса создания банков клеток [39]

Figure 2. Cell bank generation process scheme [39]

должен быть ограничен и контролироваться с ведением реестра местонахождения, идентичности и инвентаризации. Условия хранения ГБК и РБК должны быть идентичными.

Хранилище клеточных банков должно обеспечивать техническую поддержку, включая рекомендации по культивированию, решению проблем с ростом и жизнеспособностью клеток, а также по их практическому применению [26]. Технический персонал должен быть доступен для консультирования по вопросам криоконсервации, размораживания и применения передовых методов работы с клетками. Такая поддержка повышает удобство для пользователей, способствует успешному проведению экспериментов и повышает надежность результатов исследований.

Характеризация банков клеток

В соответствии с рекомендациями ICH Q5D каждая новая партия ГБК и РБК должна быть сначала полностью охарактеризована перед допуском к дальнейшим стадиям производства рекомбинантных белков [15]. Определение свойств и тестирование клеточных материалов из банков клеток – это ключевой этап контроля биологических и биотехнологических продуктов.

Чтобы обеспечить микробиологическую чистоту и безопасность клеточного банка, необходимо разработать и внедрить комплексную программу тестирования, основанную на тщательной и точной оценке рисков. При оценке важно учитывать тип клеточного банка, поскольку обоснование необходимости тес-

тирования различается в зависимости от типа создаваемого клеточного банка [18].

Анализ характеристик ГБК позволяет производителю оценить этот источник клеточного субстрата с точки зрения наличия других клеточных линий, посторонних веществ, эндогенных агентов и молекулярных контаминантов (например, токсинов или антибиотиков из организма донора). Задача такого тестирования – подтвердить подлинность, микробиологическую чистоту и пригодность клеточного материала для использования в производстве.

В связи с тем, что все РБК сформированы на основе тщательно охарактеризованных ГБК, объем их характеризации может быть сокращен. Вновь сформированный ГБК тестируется однократно. До завершения всех анализов каждый из банков клеток имеет статус «в карантине». Только после получения удовлетворительных результатов он допускается к дальнейшим этапам производственного процесса.

Выбор стратегии тестирования зависит от типа банка, используемого штамма и внутренней политики производителя. Перечень основных показателей, которые должны быть определены для бактериальных банков клеток ГБК и РБК, представлен в таблице 1.

Производитель должен подтвердить идентичность бактериального штамма путем выполнения ряда тестов. Они также должны продемонстрировать, что бактериальный штамм из банка клеток обладает свойствами, идентичными используемому штамму-хозяину.

Для проверки идентичности могут использоваться как фенотипические, так и генотипические характеристики тестирования. Не считается необходимым проводить все возможные тесты. Тесты на идентичность, как правило, проводятся на ГБК. Для РБК проводится ограниченное тестирование на идентичность.

По рекомендациям ICH Q5D для большинства клеток микроорганизмов анализ роста на селективных средах достаточен для подтверждения подлинности клетки-хозяина на уровне вида для банка клеток хозяина и банка трансформированных клеток. Для *E. coli* при использовании различных штаммов в качестве дополнительных методов испытания на подлинность следует рассматривать фаготипирование – метод идентификации на основе специфических биологических характеристик взаимодействия с бактериофагами [27, 28]. Идентичность штамма, используемого в банке клеток, может быть подтверждена с помощью генетического анализа, например ПЦР или секвенирования, чтобы убедиться в принадлежности к нужному штамму и отсутствии нежелательных мутаций или контаминации[1]. Дополнительно подтверждение подлинности экспрессирующей конструкции может осуществляться путем оценки экспрессии целевого продукта, например, с использованием капиллярного электрофореза [29, 30].

[1] Avance Biosciences. Quality Assurance of *E. coli* Cell Banks Used in Biopharmaceutical Production. Available at: https://www.avancebio.com/quality-assurance-of-e-coli-cell-banks-used-in-biopharmaceutical-production/. Accessed: 17.07.2025.

Таблица 1. Показатели, оцениваемые в процессе характеризации бактериальных банков

Table 1. Parameters tested during bacterial cell bank characterization

Показатель Parameter	Уровень клеточного банка Cell bank level			
	ПБК PCB	ГБК MCB	РБК WCB	Послепроизводственный банк клеток End of Production cell bank
Генетическая конструкция: • секвенирование Genetic construction: • sequencing	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• рестрикционное картирование • restriction mapping	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• копийность плазмиды • plasmid copy number	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• сегрегационная стабильность • segregational stability	Нет No	Да Yes	Нет No	Да Yes
• структурная стабильность • structural stability	Нет No	Да Yes	Нет No	Да Yes
Контаминация: • наличие посторонней микрофлоры Contamination: • microbial contamination	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• отсутствие литических бактериофагов • absence of lytic bacteriophages	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Да Yes
• отсутствие лизогенных бактериофагов • absence of lysogenic bacteriophages	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Да Yes
Идентичность Identity	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
• генотипирование • genotyping	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
• фенотипирование • phenotyping	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
Продуктивность Productivity	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
Жизнеспособность Viability	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No
Количество колониеобразующих единиц Colony forming units (CFU)	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No

Проверка стабильности банка клеток при хранении подтверждает, что клетки сохраняют жизнеспособность и генетическую целостность со временем, что критически важно для производства. Тестирова-

ние показывает, что клетки пережили криоконсервацию и пригодны для получения продукта [29]. Данные о жизнеспособности документируются, включая план мониторинга стабильности, который может проводиться при размораживании контейнеров для производства или подготовки новых банков.

Для оценки стабильности во время производственного культивирования необходимо провести исследование не менее чем в двух временных точках, в одной из которых используют клетки, подвергшиеся минимальному количеству пассажей, а в другой используют клетки на уровне или за пределами клеточного возраста *in vitro*. Оценка стабильности клеточного субстрата, как правило, выполняется однократно для каждого регистрируемого лекарственного препарата.

Важно подтверждение структуры и стабильности вектора экспрессии. Экспрессионный вектор, содержащий ген интереса и регуляторные элементы, должен сохранять свою нуклеотидную последовательность и свойства регуляторных элементов в течение всего процесса промышленного производства. Нестабильность вектора может привести к снижению уровня экспрессии, изменению структуры целевого продукта, следовательно, повлиять на качество и безопасность лекарственного препарата [31, 32]. Трансформация штамма-хозяина вектором экспрессии создает физиологическую нагрузку, что может привести к нестабильности плазмиды из-за изменений в ДНК (мутации, делеции, вставки) или сегрегационной нестабильности [6, 33]. Таким образом, для стабильной экспрессии важен подбор подходящего вектора. Структурная стабильность плазмиды проверяется секвенированием и рестрикционным анализом [6, 10, 34]. Для подтверждения стабильности используются методы: капиллярный электрофорез (однородность ДНК), ПЦР (остаточная ДНК) и рестрикционный анализ с эндонуклеазами[1] [35]. Сегрегационная стабильность вектора определяется процентом клеток, несущих плазмиду, при культивировании в течение четырех дней на среде с селективным маркером, например антибиотиками и без них [6, 36, 37].

Микробиологическая чистота банка клеток имеет решающее значение для гарантии отсутствия в нем посторонних микроорганизмов или примесей. Рекомендуется проводить тестирование на микробиологическую чистоту с целью выявления потенциальных контаминантов в банке клеток. Эти исследования включают в себя скрининг на различных средах с добавлением селективных агентов при разных условиях культивирования для обнаружения широкого спектра возможных контаминантов [29]. В ICH Q5D указано, что при разработке методов оценки микробиологической чистоты штамма производитель может опираться на опубликованные литературные данные. При разработке тестов на случайные микробные агенты важно учитывать свойства клеток-продуцентов, возможных контаминантов, методов культивирования и возможные источники перекрестной контаминации в лаборатории. Критические точки, где возможно возникновение контаминации (бактериями, грибами, дрожжами или бактериофагами), должны быть идентифицированы при подготовке банков. При этом производитель может не проводить подробную характеризацию случайных микробных агентов, достаточно подтвердить их отсутствие.

Трансфер банков клеток

Стратегия трансфера включает три этапа: анализ соответствия объекта, подготовку и выполнение плана снижения рисков. Такой подход упрощает передачу технологий и минимизирует риски, связанные с изменениями в эксплуатации или конфигурациях. Обеспечение качества продукции является критически важным, и данные из предыдущих производственных циклов используются для оценки качества и чистоты, особенно при нетипичных результатах. Их анализ помогает оценить влияние на продукт, выявить причины и принять корректирующие меры.

Трансфер банка клеток относится к процессам переноса клеток между различными банками, например из главного банка клеток в рабочие банки, а также к пополнению рабочих банков. Согласно рекомендациям Коллегии Евразийской экономической комиссии от 8 июня 2021 г. № 11 «О Руководстве по трансферу технологий и (или) аналитических методик при производстве лекарственных средств», передающая сторона обязана предоставить информацию об аттестации банка клеток[2]. Клеточный субстрат, как сырье, должен соответствовать требованиям GMP, и поставщик обязан предоставить полную информацию для отслеживания его жизненного цикла. При передаче субстрата между площадками его транспортируют в заданном температурном режиме с фиксацией данных холодовой цепи, после чего помещают в карантин и проводят входной контроль в соответствии со стандартными операционными процедурами и спецификацией. На основе результатов контроля принимают решение о пригодности субстрата для создания ГБК, его утилизации или инициировании расследования.

Для определения характеристик сырья, важных для однородности и качества продукта, проводятся различные тесты, которые должны соответствовать требованиям к качеству, идентичности, чисто-

[1] Guest Column. Release specifications for plasmid MCBs, plasmid DNA. Cell & Gene. Available at: https://www.cellandgene.com/doc/release-specifications-for-plasmid-master-cell-banks-plasmid-dna-0001. Accessed: 17.07.2025.

[2] Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии №11 от 8 июня 2021 года «О Руководстве по трансферу технологий и (или) аналитических методик при производстве лекарственных средств». Доступно по: https://www.alta.ru/tamdoc/21rk0011/ Ссылка активна на 17.07.2025.

те и биологической активности. Поскольку ни один тест не охватывает все характеристики, режим тестирования определяется исходя из целевых характеристик [38]. Методы тестирования должны быть валидированы в соответствии с ICH Q2 и обеспечивать стабильные результаты[1]. Помимо разработки собственных методов, доступны коммерческие наборы для обнаружения цитокинов, клеточных белков и других биомолекул, которые можно адаптировать под требования GMP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для того чтобы обеспечить единый исходный материал для всего технологического процесса производства терапевтических белков, необходимо создание банков клеток с соответствующими стандартами качества. Главный банк клеток создается сначала в четко определенных условиях на основе подробно описанных процедур из одной отобранной и хорошо охарактеризованной бактериальной колонии. Рабочий банк клеток создается на втором этапе из одного или нескольких контейнеров ГБК. Эти банки должны быть тщательно протестированы в соответствии с нормативными рекомендациями. Хорошо отработанная система создания и характеризации ГБК/РБК имеет решающее значение для последующих этапов разработки биотехнологического продукта, а затем для его утверждения соответствующими органами, ответственными за регистрацию лекарственного продукта.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*. 2018;36:1136–1145. DOI: 10.1038/nbt.4305.
2. McElwain L., Phair K., Kealey C., Brady D. Current trends in biopharmaceuticals production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 2022;44(8):917–931. DOI: 10.1007/s10529-022-03276-5.
3. İncir İ., Kaplan Ö. *Escherichia coli* in the production of biopharmaceuticals. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2025;72(2):528–541. DOI: 10.1002/bab.2664.
4. Al-Rubeai M., editor. Cell Line Development. Cell Engineering. Dordrecht: Springer; 2009. 253 p.
5. Johnson I. S. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*. 1983;219(4585):632–637. DOI: 10.1126/science.6337396.
6. Sobolewska-Ruta A., Zaleski P. Cell Banks Preparation In Biopharmaceuticals Production. *Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology*. 2019;58(1):87–100. DOI: 10.21307/pm-2019.58.1.087.
7. Walsh G., Walsh E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature Biotechnology*. 2022;40(12):1722–1760. DOI: 10.1038/s41587-022-01582-x.
8. Lagassé H. A. D., Alexaki A., Simhadri V. L., Katagiri N. H., Jankowski W., Sauna Z. E., Kimchi-Sarfaty C. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research*. 2017;6:113. DOI: 10.12688/f1000research.9970.1.
9. Li F., Vijayasankaran N., Shen A. (Y.), Kiss R., Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010;2(5):466–479. DOI: 10.4161/mabs.2.5.12720.
10. Rosano G. L., Ceccarelli E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
11. Tripathi N. K., Shrivastava A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Fronters in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7:420. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00420.
12. Niazi S., Magoola M. Advances in Escherichia coli-based therapeutic protein expression: Mammalian conversion, continuous manufacturing, and cell-free production. *Biologics*. 2023;3(4):380–401. DOI: 10.3390/biologics3040021.
13. Geigert J., editor. The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals. Switzerland: Springer Cham; 2019. 426 p.
14. Cabrera C. M., Cobo F., Nieto A., Cortés J. L., Montes R. M., Catalina P., Concha A. Identity tests: determination of cell line cross-contamination. *Cytotechnology*. 2006;51:45–50. DOI: 10.1007/s10616-006-9013-8.
15. Schmeer M., Buchholz T., Schleef M. Plasmid DNA manufacturing for indirect and direct clinical applications. *Human Gene Therapy*. 2017;28(10):856–861. DOI: 10.1089/hum.2017.159.
16. Dashnau J. L., Xue Q., Nelson M., Law E., Cao L., Hei D. A risk-based approach for cell line development, manufacturing and characterization of genetically engineered, induced pluripotent stem cell-derived allogeneic cell therapies. *Cytotherapy*. 2023;25(1):1–13. DOI: 10.1016/j.jcyt.2022.08.001.
17. Zhu M. M., Mollet M., Hubert R. S., Kyung Y. S., Zhang G. G. Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. 2017;3:1639–1669. DOI: 10.1007/978-3-319-52287-6_29.
18. Byer H., Wang W., Mogilyanskiy L. Mastering Cell Bank Production. Biopharm International 2015;8:20–24.
19. Matanguihan C., Wu P. Upstream continuous processing: recent advances in production of biopharmaceuticals and challenges in manufacturing. *Current Opinion in Biotechnology*. 2022;78:102828. DOI: 10.1016/j.copbio.2022.102828.
20. Menendez A. T., Ritter N., Zmuda J., Jani D., Goyal J. Recommendations for Cell Banks Used in GXP Assays. *BioProcess International*. 2012;10(1):27–40.
21. Wrigley J. D., McCall E. J., Bannaghan C. L., Liggins L., Kendrick C., Griffen A., Hicks R., Fröderberg-Roth L. Cell Banking for Pharmaceutical Research. *Drug Discovery Today*. 2014;19(10):1518–1529. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.05.006.
22. Simonin H., Bergaoui I. M., Perrier-Cornet J. M., Gervais P. Cryopreservation of Escherichia coli K12TG1: protection from the damaging effects of supercooling by freezing. *Cryobiology*. 2015;70(2):115–121. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.12.006.
23. Whaley D., Damyar K., Witek R. P., Mendoza A., Alexander M., Lakey J. R. T. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation*. 2021;30:0963689721999617. DOI: 10.1177/0963689721999617.
24. Bolhuis H., Grego M. Cryopreservation and recovery of a complex hypersaline microbial mat community. *Cryobiology*. 2024;114:104859. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2024.104859.

[1] ICH guideline Q2(R2) Validation of analytical procedures. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf. Accessed: 17.07.2025.

25. Bhattacharjee K., Chrungoo N., Joshi S. R. Cryopreservation design for bacterial cell: A non-conventional gizmatic approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2021;91:811–820. DOI: 10.1007/s40011-021-01266-7.
26. Weiskirchen S., Monteiro A. M., Borojevic R., Weiskirchen R. Unlocking potential: A comprehensive overview of cell culture banks and their impact on biomedical research. *Cells*. 2024;13(22):1861. DOI: 10.3390/cells13221861.
27. Maffei E., Shaidullina A., Burkolter M., Heyer Y., Estermann F., Druelle V., Suaer P., Willi L., Michaelis S., Hilbi H., Thaler D. S., Harms A. Systematic exploration of Escherichia coli phage-host interactions with the BASEL phage collection. *PLoS Biology*. 2021;19(11):e3001424. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001424.
28. Tóth I., Bagyinszky E., Sváb D. Multiplex polymerase chain reaction typing scheme based on Escherichia coli O157: H7 Sakai prophage (Sp)-associated genes. *International Journal of Infectious Diseases*. 2022;120:68–76. DOI: 10.1016/j.ijid.2022.04.015.
29. Sofer G., Zabriskie D., editors. Process Validation in Manufacturing of Biopharmaceuticals. Boca Raton: CRC Press; 2000. 402 p.
30. Van der Burg D., Josefsson L., Emmer Å., Sänger – van de Griend C. E. Recent capillary electrophoresis applications for upstream and downstream biopharmaceutical process monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023;160:116975. DOI: 10.1016/j.trac.2023.116975.
31. Lozano Terol G., Gallego-Jara J., Sola Martínez R. A., Martínez Vivancos A., Cánovas Diaz M., de Diego Puente T. Impact of the expression system on recombinant protein production in Escherichia coli BL21. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:682001. DOI: 10.3389/fmicb.2021.682001.
32. Allen J. R., Torres-Acosta M. A., Mohan N., Lye G. J., Ward J. M. Segregationally stabilised plasmids improve production of commodity chemicals in glucose-limited continuous fermentation. *Microbial Cell Factories*. 2022;21(1):229. DOI: 10.1186/s12934-022-01958-3.
33. De Marco A. Recent advances in recombinant production of soluble proteins in E. coli. *Microbial Cell Factories*. 2025;24(1):21. DOI: 10.1186/s12934-025-02646-8.
34. Jiang R., Yuan S., Zhou Y., Wei Y., Li F., Wang M., Chen B., Yu H. Strategies to overcome the challenges of low or no expression of heterologous proteins in Escherichia coli. *Biotechnology Advances*. 2024;75:108417. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2024.108417.
35. Schmeer M., Schleef M., Shankear R., Kobelt D., Walther W. Capillary Gel Electrophoresis (CGE) for quality control of plasmid DNA in gene therapy: quality control of 20 years stored GMP-grade plasmid DNA. *Methods in Molecular Biology*. 2022;2521:317–328. DOI: 10.1007/978-1-0716-2441-8_17.
36. Arredondo-Alonso S., Pöntinen A. K., Gama J. A., Gladstone R. A., Harms K., Tonkin-Hill G., Thorpe H. A., Simonsen G. S., Samuelsen Ø., Johnsen P. J., Corander J. Plasmid-driven strategies for clone success in *Escherichia coli*. *Nature Communications*. 2025;16(1):2921. DOI: 10.1038/s41467-025-57940-1.
37. Liao Y.-C., Saengsawang B., Chen J.-W., Zhuo X.-Z., Li S.-Y. Construction of an antibiotic-free Vector and its application in the Metabolic Engineering of Escherichia Coli for Polyhydroxybutyrate Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:837944. DOI: 10.3389/fbioe.2022.837944.
38. Michel A., Neville D. Developing an understanding of the analytical landscape for testing complex biological raw materials in advanced therapy medicinal products: A CRO perspective. *Cell Gene Therapy Insights*. 2021;7(2):317–326. DOI: 10.18609/cgti.2021.056.