

Правила надлежащей  
производственной практики  
применительно к  
биотехнологии

международные стандарты GMP

# Надлежащая производственная практика биологических препаратов (БП) (приложение к GMP ВОЗ)

Дополнение к документу «Надлежащая производственная практика для фармацевтических препаратов»

## 1. Сфера применения:

- - выращивание штаммов микроорганизмов и клеток эукариотов;
- - экстракция веществ из биологических тканей, (человека, животных и растений);
- - технология рекомбинантной ДНК (r-ДНК);
- - гибридная технология;
- посев микроорганизмов в эмбрионы или в организм животного.

## Биологические препараты:

- аллергены,
- антигены,
- вакцины,
- гормоны,
- цитокины,
- ферменты,
- цельная человеческая кровь
- препараты из человеческой крови и плазмы,
- иммунные сыворотки,
- иммуноглобулины (в т.ч. моноклональные антитела),
- продукты ферментации (в т.ч. получаемые с помощью r-ДНК)
- диагностические препараты для применения *in vitro*.

## 2. Принципы

- Производство БП должно осуществляться в соответствии с основными принципами GMP с учетом требований «Дополнений по производству и контролю БП»
- Способы производства и контроля, а также путь введения БП требуют **соблюдения особых мер предосторожности.**

### Химико-фармацевтические препараты

- Получают и контролируют воспроизводимыми химическими и физическими методами

### Биологические препараты

производятся на основе биопроцессов и материалов (культивирование клеток или экстракция веществ из живых организмов).

биопроцессы **вариабельны**



варьируют характер и количество побочных продуктов

биологические методы контроля **вариабельны**



- **важен контроль в процессе производства, т.к. некоторые недостатки нельзя обнаружить при испытаниях готовой продукции.**

### 3. Персонал

**Руководитель** должен знать способы, применяемые при производстве биологических препаратов, и обладать научными знаниями.

**Персонал** должен знать производственную и лабораторную практику в области бактериологии, вирусологии, биометрии, химии, медицины, иммунологии и ветеринарии.

*Фамилии и квалификация лиц, ответственных за утверждение протоколов производства серии, должны быть зарегистрированы национальными уполномоченными органами по контролю.*

*В чистой и асептической зонах в процессе работы должно находиться минимальное количество персонала. Инспекцию и контроль осуществляют извне этих зон.*

Запрещается перемещение персонала из зон, в которых обрабатываются живые биообъекты, в помещения, где обрабатывается другая продукция или организмы.

Персонал, занятый в производстве, не должен ухаживать за животными.

Персонал, занятый в производстве, обслуживании, испытаниях и ухаживающий за животными и инспектора, вакцинируют соответствующими вакцинами и регулярно обследуют на туберкулез.

Производство вакцины БЦЖ осуществляется персоналом, состояние здоровья которого тщательно и регулярно проверяется.

Персонал, работающий с препаратами, получаемыми из человеческой крови или плазмы, вакцинируют против гепатита В.

## 4. Помещения и оборудование

- 4.1. Лаборатории, рабочие и все другие комнаты и здания (в том числе для животных) для производства БП, строят из высококачественных материалов (чистота, отсутствие пыли, насекомых и паразитов).
- 4.2. *Внутренние поверхности (стены, полы и потолки) должны легко подвергаться очистке и дезинфекции. Следует избегать стоков; в асептических зонах стоки должны отсутствовать, если в этом нет абсолютной необходимости. При наличии стоков они должны быть снабжены эффективными, легко очищаемыми сифонами и заслонками, предотвращающими обратный ток. Сифоны снабжают устройствами с электрическим нагревом или другими средствами для дезинфекции. Любые углубления в полу должны быть открытыми, неглубокими и легко поддающимися очистке, при этом они должны соединяться с системой стоков вне зоны таким способом, который мог бы предотвратить проникновение в зону микробных контаминантов.*
- 4.3. *В асептических зонах должны отсутствовать раковины. Любая раковина, устанавливаемая в других чистых зонах, должна быть изготовлена из подходящего материала, такого как нержавеющая сталь, не допускать перелива, и к ней должна подаваться только питьевая вода. Предусматривают меры предотвращения контаминации дренажной системы опасными стоками. Должны быть исключены распространение по воздуху патогенных микроорганизмов и вирусов, а также возможность контаминации продукции во время технологического процесса другими видами вирусов или веществами, в том числе от персонала.*

4.4. Если помещения, предназначенные для производства БП, использовались для других целей, то их тщательно очищают прежде чем возобновить в них производство БП.

Зоны, используемые для обработки тканей животных и микроорганизмов, не требующиеся для текущего производственного процесса и проведения испытаний, должны быть отделены от помещений для производства стерильных БП, и иметь отдельную вентиляцию; обслуживать их должен разный персонал.

4.5. Если препарат производят в порядке производственной кампании, то помещения и оборудование должны эффективно деконтаминироваться после окончания производства БП.

4.6. Посевные культуры и банки клеток, используемые для производства БП, хранятся отдельно от других материалов. Доступ к ним должен быть разрешен только уполномоченному на это персоналу.

4.7. Живые организмы обрабатывают с помощью оборудования, позволяющего поддерживать чистоту культуры и сохранять ее во время обработки.

4.8. Вакцины и препараты, содержащие инактивированные микроорганизмы, в т.ч. рекомбинантные анатоксины и бактериальные экстракты, после инактивации можно фасовать в первичные упаковки в тех же помещениях, что другие БП при условии деконтаминации после фасовки, включая стерилизацию и мытье.

4.9. Спорообразующие организмы *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum* и *Clostridium tetani* обрабатывают с помощью отдельного для каждого вида специально предназначенных технических средств, до завершения процесса инактивации.

Во время производства препаратов из спорообразующих организмов, одновременно изготавливают только один препарат.

4.10. Для производства ЛП из человеческой крови или плазмы используют специально предназначенные технические средства и оборудование.

4.11. Все контейнеры с БП, независимо от стадии производства, идентифицируют с помощью этикеток.

для предотвращения перекрестной контаминации осуществляют:

- изготовление и наполнение в отдельных зонах;
- отказ от одновременного производства разных препаратов, если нет эффективного разделения;
- использование воздушных шлюзов для передачи материалов, вытяжной вентиляции, смены одежды, тщательного мытья и деконтаминации оборудования;
- предотвращение рециркуляции необработанного воздуха;
- использование «закрытых систем» производства;
- предупреждение образования аэрозолей (при центрифугировании и смешивании);
- исключение передачи образцов патологического материала для испытаний в зоны, используемые для производства БП;
- применение стерилизованных контейнеров.

- 4.12. Для изготовления стерильных препаратов используют зоны с повышенным давлением. Патогенные организмы в зонах с пониженным давлением.

4.13. Воздух при работе с патогенами не должен рециркулировать, и должен удаляться через стерилизующие фильтры, (регулярно проверяют).

4.14. в случае применения инфицирующих и потенциально инфицирующих материалов используют специальные системы деконтаминации стоков.

4.15. Трубопроводы, вентиляционные фильтры и вентили на ферментерах должны полностью стерилизоваться паром. Воздушные фильтры должны быть гидрофобными.

4.16. Небольшие запасы веществ, для использования в технологическом процессе (буферы, реагенты), хранят в производственной зоне не возвращая в общий запас.

Сухие материалы, используемые для приготовления буферов, питательных сред и т.д., взвешивают и растворяют в отдельной зоне вне чистых и асептических зон, чтобы свести к минимуму контаминацию препарата частицами.

# 5. Животные: содержание и уход

5.1. Для производства и контроля ряда БП используются животные.

- Животных размещают в отдельных зданиях с самостоятельной вентиляцией.
- Помещения содержат в чистоте (гигиена, отсутствие насекомых и паразитов.)
- Изолированно содержат в карантине вновь поступающих животных и хранят корма при отсутствии паразитов.
- Комнаты для инокуляции животных, отделяют от комнат, в которых содержатся трупы животных.
- Необходимо оборудование для дезинфекции клеток, и мусоросжигатель для уничтожения мусора и трупов животных.

5.2. Постоянно контролируют и регистрируют состояние здоровья животных, служащих для получения исходного сырья и используемых для контроля качества и испытаний безопасности.

Персонал, обслуживающий помещения для животных, обеспечивают спец. одеждой, средствами для переодевания и принятия душа.

Если для производства или контроля качества БП используют обезьян, то придерживаются специальных правил, (Требования, предъявляемые к оральной полиомиелитной вакцине).

## 6. Производство

- 6.1. *Для всех производственных операций, должны существовать отвечающие современным требованиям стандартные рабочие методики.*
- 6.2. **Спецификации на исходное сырье должны содержать подробное описание его источника, происхождения, способа производства и методов контроля, (микробиологического), с целью гарантии его пригодности для использования. Разрешение на реализацию готовой продукции зависит от результатов, полученных при испытаниях исходного сырья.**
- 6.3. *Среды и культуры вводят в ферментеры и другие емкости в тщательно контролируемых условиях для предотвращения контаминации.*
- 6.4. *Среды стерилизуют по месту использования (in situ), при обычном добавлении в ферментеры газов, сред, кислот, щелочей, пеногасителей с использованием стерилизующих фильтров на линии.*
- 6.5. *Особое внимание уделяют валидации способов стерилизации.*
- 6.6. *Если в процессе производства осуществляется инактивация, то исключают риск перекрестной контаминации между обработанной и необработанной продукцией.*
- 6.7. **Хроматографическое оборудование специально предназначено для очистки только одного препарата и его стерилизуют после производства каждой серии, устанавливается срок эксплуатации колонок и способ стерилизации.**

# 7. Маркировка

- 7.1. *Препараты идентифицируют с помощью этикеток. Этикетки постоянно прикреплены к первичным упаковкам при любых условиях хранения так, чтобы оставалось незакрытое место, для осмотра содержимого.*
- 7.2. *Информация на этикетках утверждается государственными органами.*
- 7.3. На этикетке первичной упаковки приводят:
- *наименование ЛП;*
  - *перечень и количества активных ингредиентов, количество доз, массу или объем;*
  - *номер серии или окончательной партии, присвоенный изготовителем;*
  - *дата окончания срока годности;*
  - *условия хранения и необходимые меры предосторожности при обращении;*
  - *указания по применению, предупреждения и меры предосторожности;*
  - **природу и количество любого вещества, использовавшегося при приготовлении данного БП, которое может вызвать побочное действие;**
  - *название и адрес производителя или предприятия разместившего ЛП на рынке.*
- 7.4. На этикетке вторичной упаковки в дополнительно указывают природу и количество консервантов или добавок к БП.
- 7.5. Каждую упаковку снабжают инструкцией по применению БП с указанием противопоказаний и побочных эффектов.

## 8. Протоколы производства серии и протоколы распределения

8.1. Протоколы производства систематически изготавливаемых серий обеспечивают подробную регистрацию процесса производства каждой серии БП и гарантируют, что серия произведена, испытана, расфасована в упаковки и распределена в соответствии с методиками, включенными в регистрационное досье.

8.2. Для каждой серии биологического препарата подготовлен отдельный протокол производства, включающий:

- наименование и дозировку препарата;
- дату производства;
- номер серии;
- **полный процесс приготовления препарата, включая указание посевной культуры или исходного сырья;**
- номер серии каждого компонента, используемого при приготовлении;
- выходы продукции на различных стадиях производства серии;

- подписанный протокол каждого этапа, принятые меры предосторожности и наблюдения при производстве серии;
- протоколы всех испытаний в процессе производства и полученные результаты;
- образец этикетки;
- указание использованных упаковочных материалов, первичных упаковок и укупорочных элементов;
- датированную подпись эксперта, утвердившего производственные операции;
- аналитический отчет, датированный и подписанный ответственным экспертом, в котором указано, соответствует ли серия спецификациям, описанным в стандартной рабочей методике, зарегистрированной государственным контролирующим органом;
- протокол решения отдела контроля качества о разрешении к реализации или акт об уничтожении при отбраковке серии.

8.3. Форма протокола утверждается государственным контролирующим органом.

- Протоколы хранятся не менее двух лет после окончания срока годности серии или партии биологического препарата в любое время быть доступны для проверки национальным уполномоченным органом по контролю.

8.4. Протоколы должны позволять проследить все этапы производства и испытаний серии и включать протоколы стерилизации всей аппаратуры и материалов, применявшихся при производстве.

Протоколы распределения должны храниться таким образом, чтобы можно было при необходимости быстро осуществить отзыв любой отдельной серии продукции.

## 9. Обеспечение качества и контроль качества

9.1. Отдел ОК и/или ОКК выполняют следующие функции:

1. Составление подробных инструкций по каждому испытанию и анализу;
2. Обеспечение адекватных идентификации и разделения проб для испытаний с целью предотвращения перекрестной контаминации;
3. Обеспечение контроля окружающей среды и валидацию оборудования таким образом, чтобы можно было оценить их соответствие;
4. Разрешение или отбраковка сырья и промежуточной продукции, упаковочных и маркировочных материалов, первичной упаковки;
5. Разрешение реализации или отбраковка готовой продукции;
6. Оценка соответствия условий хранения сырья, промежуточной продукции и готовых БП;
7. Оценка качества и стабильности готовых БП и, при необходимости, сырья и промежуточной продукции;
8. Установление даты окончания срока годности с учетом обоснованного периода хранения при установленных условиях;
9. Разработка и пересмотр методик контроля и спецификации;
0. Установление ответственности за экспертизу возвращенных препаратов, чтобы определить, следует ли эти препараты разрешить для реализации, переработать или уничтожить; должны сохраняться соответствующие протоколы о распределении таких препаратов.

- 9.2. Лаборатория КК производителя должна быть отделена от производственной зоны и, в идеале, находиться в отдельном здании (быть самостоятельной и иметь условия для хранения документов и образцов, подготовки протоколов и осуществления необходимых испытаний.)
- 9.3. Особенно важную роль в обеспечении качества играет **контроль в процессе производства БП**. Испытания, которые являются решающими для КК, но не проводятся у готовой продукции, осуществляют на соответствующей стадии технологического процесса.
- 9.4. Проведение всех качественных и количественных испытаний, перечисленных в спецификациях на исходное сырье, может быть заменено системой сертификатов, выдаваемых производителем исходного сырья, если:
- у производителя надежная репутация;
  - производитель подвергается регулярному аудиту;
  - по меньшей мере, одно специфичное испытание идентичности проводится производителем готовой продукции.
- 9.5. Образцы промежуточной и готовой продукции сохраняют в достаточном количестве и при соответствующих условиях хранения, для обеспечения возможности повторного или подтверждающего контроля серии.
- 9.6. При некоторых операциях требуется непрерывный контроль данных в процессе производства, например, контроль и регистрация физических параметров во время ферментации.
- 9.7. Необходимо уделить особое внимание требованиям контроля качества, возникающим при производстве БП методом непрерывного культивирования.

# **Руководство по обеспечению качества фармацевтических и биологических препаратов, полученных с помощью технологии рекомбинантной ДНК**

## **1. Введение**

руководство касается обеспечения качества ФП и БП, полученных с помощью технологии рекомбинантной ДНК и предназначенных для человека.

(не распространяется на контроль ГМ живых микроорганизмов, вакцин, предназначенных для непосредственного введения людям.)

# 2. Общие положения

Успехи в области молекулярной генетики и химии нуклеиновых кислот позволяют:

- Идентифицировать и детально анализировать гены, кодирующие биологически активные белки,
- Переносить гены из одного организма в другой и экспрессировать в контролируемых условиях в целях интенсивного синтеза полипептидов, которые они кодируют.

*Любой ген характеризуется специфической нуклеотидной последовательностью каждой цепи молекулы двухцепочечной ДНК.*

*Когда эти цепи расплетаются, каждая из них становится матрицей для синтеза комплементарной копии, что обеспечивает точное воспроизводство генов при сохранении линейной последовательности четырех мононуклеотидов.*

*Процесс расшифровки генетической информации синтеза продукта гена протекает в две стадии:*

- (I) транскрипция кодирующей цепи ДНК в информационную РНК (иРНК),*
- (II) трансляция информации, которую несет молекула иРНК в полипептид.*

В настоящее время возможно конструировать гены, кодирующие модифицированные продукты, обладающие повышенной биологической активностью и/или менее выраженными нежелательными характеристиками, а также вещества, обладающие совершенно новыми свойствами.

- Природный ген или искусственно полученную нуклеотидную последовательность, кодирующие определенный продукт, можно размножить путем внедрения ДНК в подходящий вектор.

Для этого используют:

- высокоспецифичные рестрикционные эндонуклеазы (т.е. ферменты, которые разрезают векторную ДНК в строго определенных участках)
- лигазы (которые сшивают ген-вставку с вектором), после чего этот рекомбинантный вектор вводят в подходящий организм-хозяин. Затем можно отобрать отдельные клоны, несущие желаемый ген, и размножить их путем крупномасштабного культивирования, чтобы обеспечить эффективный синтез желаемого продукта гена.
- Главной задачей проводимых исследований является эффективная, контролируемая и точная экспрессия стабильных клонированных последовательностей ДНК.
- многие из используемых векторов - бактериальные плазмиды, и клонирование генов проводится на клетках прокариотов.
- разработаны и используются для производства другие клеточные системы вектор/хозяин-эукариот, включая дрожжи или непрерывно размножающиеся (трансформированные) линии клеток млекопитающих или насекомых.

### Клетка-хозяин животного происхождения

- «+» -модификация продукта гена углеводными группами, что может происходить в естественных условиях в отношении белков млекопитающих.
  - более правильный процесс и секреция продукта гена в культуральную среду, что исключает разрушение клеток и тем самым снижает вероятность контаминации продукта гена белками клетки-хозяина.
- «-» специфические проблемы безопасности

- Продукты, кодируемые природными генами, экспрессированными в чужеродных клетках, могут **структурно, биологически и иммунологически отличаться** от своих естественных аналогов.
- БП, полученные с помощью технологии r-ДНК, могут содержать потенциально **опасные контаминанты**, которые в норме отсутствуют в продуктах-эквивалентах, полученных с помощью традиционных способов.  
специфические контаминанты:
  - эндотоксины в продуктах, синтезированных в бактериальных клетках,
  - клеточная ДНК( в т.ч. потенциально онкогенная) и вирусы в БП из клеток животного происхождения
- **Масштабирование** лабораторных технологий до процессов, крупносерийного производства, значительно влияет на качество продукции.
- Случайная **вариабельность культуры** во время производства может привести к экспрессии других генов в системе вектор-хозяин при которой нарушается полипептидный состав продукта.
  - снижение выхода продукта
  - количественные и качественные отличия имеющихся примесей

необходимо обеспечить постоянство производственных условий, и качество готового препарата

# 3. Сфера действия руководства

1. Контроль исходного сырья, включая данные о клетках-хозяевах, источнике, природе и нуклеотидной последовательности гена, использованного для производства.
2. Контроль производственного процесса.
3. Контроль готового препарата,

*В этом отношении продукты r-ДНК аналогичны БП, полученным традиционными методами (бактериальные и вирусные вакцины) необходим достаточный контроль исходного сырья и процедуры производства и оценка готового препарата.*

Основные особенности:

- контроль в процессе производства, осуществляемый для обеспечения безопасности и эффективности препарата,
- всесторонняя характеристика самого готового препарата
- валидация очистки и удаления специфических примесей (ДНК).

## К препаратам производным r-ДНК применимы общие требования к производству и контролю качества БП:

- качество всех реагентов, используемых в процессе производства, в .т.ч. среды ферментации.
- в добавках животного происхождения (телячья сыворотка) не должно быть посторонних агентов.
- нежелательно использовать в производстве вещества вызывающие аллергические реакции (пенициллин и другие  $\beta$ -лактамы).
- определение активности, испытания на повышенную токсичность, пирогенность, стабильность и стерильность.

## Следует учитывать клиническое назначение препарата:

- ✓ препарат, применяющийся многократно в течение длительного времени или в больших дозах, не должен содержать даже следовых количеств контаминантов с антигенными свойствами.
- ✓ для препаратов однократного введения, по жизненным показаниям - иные критерии.

# 4. Контроль исходного сырья

## *4.1. Вектор экспрессии и клетки-хозяева*

Описание клеток-хозяев, их источника, истории, и вектора экспрессии:

- происхождение и идентичность клонированного гена, конструкция,
- генетика и структура вектора экспрессии, источник и функции составных частей (репликаторы, промоторы, маркеры резистентности к антибиотикам, данные рестрикционного картирования с указанием сайтов использованных для конструирования вектора.)
- способ введения вектора в клетки-хозяева и состояния вектора внутри клеток, т.е. интегрирован он или вне хромосом, количество копий.
- генетическая стабильность комбинации хозяин-вектор.

## *4.2. Последовательность клонированного гена*

нуклеотидная последовательность гена-вставки и фланкирующих регуляторных областей вектора экспрессии.

## *4.3. Экспрессия*

меры, принятые для стимуляции и контроля экспрессии клонированного гена в клетках-хозяевах в процессе производства.

# 5. Производственный контроль

## 5.1. Рабочий банк клеток

Производство БП с помощью технологии r-ДНК основано на системе посевных культур, включающей рабочий банк клеток, полученный из главной посевной культуры.

Главную посевную культуру получают клонированием клетки-хозяина, содержащую вектор экспрессии.

Во время получения посевной культуры в одних лабораторных помещениях или теми же сотрудниками никакие манипуляции с другими клеточными линиями не проводят.

Представляют полные сведения о происхождении, разновидности, хранении и вероятной длительности жизни **посевого материала** при ожидаемой скорости его использования.

Представляют данные о стабильности **системы экспрессии хозяин-вектор** посевных клеток в установленных условиях хранения и восстановления жизнедеятельности.

Для установления подлинности:

- у высших эукариотов - клеточные маркеры (специфические изоэнзимы или иммунологические особенности), дополнительно сведения об онкогенности перевиваемых клеточных линий.
- у прокариот - специфические фенотипические признаки.

Нуклеотидную последовательность ДНК клонированного гена подтверждают на стадии главной посевной культуры.

в посевной культуре не должно быть: инфицирующих бактерий, микоплазм, грибов, вирусов и потенциально онкогенных посторонних агентов (особенно вирусы, контаминирующие те виды животных, от которых получены клеточные линии).

в некоторых клеточных линиях содержатся эндогенные вирусы (ретровирусы) - испытания, с помощью которых можно выявлять такие микроорганизмы, необходимо проводить при различных условиях вызывающих их индукцию.

Используемые методы очистки, должны обеспечить инактивацию и/или удаление специфических контаминант (эндогенных агентов главной посевной культуры или частью вектора).

### ***5.2. Производство на уровне определенного пассажа***

Методики и материалы для выращивания клеток и для индукции выработки продукта.

Собирают данные о степени и природе любой микробной контаминации культуральных флаконов непосредственно перед сбором. Устанавливают допустимые пределы и чувствительность методов ее выявления.

Приводят данные о стабильности условий ферментации и роста культур, о сохранении уровня выхода продукта.

Устанавливают критерии отбраковки серий культуры.

Определяют максимальное число удвоений клеточной популяции или уровни пассажей, разрешенные во время производства.

### *5.3. Производство с использованием перевиваемых культур*

- В дополнение к рекомендациям раздела 5.2,
- Контроль следует проводить на всем протяжении жизненного цикла культуры, (частота и тип контроля зависят от природы системы-продуцента и самого продукта).
- **Следует установить молекулярную целостность экспрессируемого гена и фенотипическую и генотипическую характеристики клетки-хозяина после длительного культивирования.**
- Необходимо установить максимальный период культивирования перевиваемых клеток, основанный на сведениях о стабильности системы и постоянстве качества продукта во время и после окончания этого периода.
- При длительном культивировании перевиваемых клеток проводят полную повторную оценку клеточной линии и продукта с интервалами, установленными на основании сведений о стабильности системы вектор/клетка-хозяин и характеристиках продукта.

## 5.4. Очистка

- методы, используемые для сбора, экстракции и очистки продукта. **(элиминация вирусов, нуклеиновых кислот и нежелательных антигенных веществ).**
- При использовании аффинной хроматографии на моноклональных антителах (МАТ), или другие контаминанты, появляющиеся вследствие их использования, (посторонние вирусы) не должны неблагоприятно воздействовать на безопасность готового препарата.

Необходимо тщательно изучить:

- способность процедуры очистки удалять ненужные, имеющие отношение к продукту или клеткам-хозяевам белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, вирусы или другие примеси, включая компоненты среды и нежелательные химические вещества, вводимые во время самого процесса очистки;
- воспроизводимость процесса очистки.

Данные, полученные при валидационном изучении процедур очистки, необходимы для подтверждения удаления ДНК или вирусов, на каждой стадии очистки, и в целом.

**Следует доказать, что используемые процессы инактивации вирусов эффективны и не снижают качества данного препарата.**

# 6. Характеристика нерасфасованной продукции

## 6.1. Характеристика очищенной активной субстанции

точная характеристика активной субстанции хим., физ. и био. методами:

- физ.-хим. свойства конкретной молекулы (размер, заряд, ИЭТ, аминокислотный состав и гидрофобность).
- структура и агрегатное состояние БП - электрофорез в ПААГ, изоэлектрофокусировка, гель-хроматография, хроматография с обращенной фазой, ИОХ, гидрофобная хроматография и аффинная хроматография, пептидное картирование, аминокислотный анализ, нефелометрия, УФ-СФМ др. спектроскопические методики.
- аминокислотную последовательность БП устанавливают:
  - ✓ частичное определение последовательности
  - ✓ пептидное картирование,
  - ✓ полное определение последовательности.
  - ✓ определение N-концевого метионина, сигнальной или лидерной последовательности и других возможных N- и C-концевых модификаций (ацетилирование, амидирование или частичное расщепление экзопептидазами).
- свойства БП сравнивают с со свойствами природных молекул - БП должен обладать ожидаемой биологической активностью ( ЕД) (удельная активность - число ЕД в единице массы) высокоочищенного вещества.

## 6.2. Чистота

- Данные о контаминантах присутствующих в БП, и оценка их макс. уровней.
- *Методы для выявления контаминации вирусами, нуклеиновыми кислотами и др. примесями, источником которых служат клетки-хозяева или сам продукт, а также веществами, занесенными в производстве или очистке.*
- Вещества, для многократного введения или введения в больших дозах, проверяют на отсутствие следовых количеств антигенных компонентов и связанных с препаратом примесей, таких как агрегаты или продукты распада, которые могут контаминировать готовый препарат, а также установить точные верхние пределы этих контаминантов.

Для выявления контаминирующих антигенов используют методы:

- иммуноблоттинг, РИА, ИФА с использованием высокоаффинных антител, полученных против данного продукта, лизатов клеток-хозяев, и составных частей культуральной среды.

*результаты выявления антигенов ограничены специфичностью и чувствительностью используемых антисывороток, эти иммунологические испытания дополнять, а не заменяют другие методы (электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия)*

*Сыворотки пациентов, получивших большие или повторные дозы препарата во время клинических испытаний, необходимо проверять на наличие АТ к контаминирующим антигенам, и к самому препарату.*

# 7. Рутинный контроль ГЛФ

1. испытания для установления обоснованности или приемлемости процедуры
2. Для установления стабильности процесса производства от серии к серии.

## *7.1. Постоянство качества продукции*

- Пять, последовательно выпущенных серий готовой лекарственной формы полностью контролируют с целью определения постоянства состава препарата. Отмечают любые отличия одной серии от другой, учитывают в спецификации на данный препарат.

## *7.2. Подлинность*

- Каждую серию готовой лекарственной формы испытывают с помощью методов, использованных для характеристики очищенной активной субстанции, чтобы подтвердить подлинность препарата. Дополнительно проверяют ряд N- и C-концевых аминокислот или используют пептидное картирование.

### • 7.3. Чистота

- Необходимо определить чистоту каждой серии ГЛФ; чистота должна быть в установленных пределах.

ДНК клеток-хозяев (гибридизационный анализ иммобилизированной ДНК-контаминанты с использованием соответствующих зондов) в отношении каждой серии БП, приготовленной на перевиваемых линиях клеток млекопитающих (трансформированные линии клеток);

- БП предназначенные для длительного применения или в больших дозах, проверяют на остаточное содержание клеточных белков и их количество.

### • 7.4. Активность

- Активность каждой серии ГЛФ устанавливают с использованием соответствующего ГСО или МСО, откалиброванного в единицах биологической активности. При отсутствии таких препаратов для стандартизации применяют утвержденный РСО.
- Если установлена корреляция между результатами физ.-хим. или биологических испытаний *in vitro* и данными биологических испытаний *in vivo*, биологические испытания *in vivo* можно сделать менее строгими.

## 8. Стандартные образцы

- Результаты исследований, в разделах 6 и 7, используют для составления окончательных спецификаций на препарат.
- У серии препарата, (прошедшего клиническое испытание), полностью определяют химический состав, чистоту и биологическую активность, полную аминокислотную последовательность и хранят для использования в качестве химического и биологического стандартного образца.
- При необходимости, свойства этой серии сравнивают со свойствами высокоочищенного препарата, состоящего из природных молекул.

# 9. Доклиническая оценка безопасности

- выявление непредвиденных нежелательных эффектов.
- Классические испытания безопасности и токсикологические исследования, только частично пригодны для определения безопасности БП, полученных с помощью r-ДНК.

некоторые белки, например интерфероны, обладают высокой видовой специфичностью, белок человека фармакологически более активен при введении людям, чем при введении животным.

Аминокислотные последовательности белков человека отличаются от последовательности естественных аналогов других биологических видов.

Белки человека вызывают иммунный ответ у животных, видоизменяющий биологическое действие белков и вызывать токсические эффекты вследствие образования иммунных комплексов.

- для оценки действия БП r-ДНК применяют широкий спектр биохимических, иммунологических, токсикологических и гистологических методов, принимая во внимание видовую специфичность и выработку антител..

# Термины

**Производство с использованием перевиваемых культур -continuous culture production:** Система, в которой не ограничено число пассажей или удвоений популяции клеток после начала производства препарата. Изготовитель должен установить строгие критерии прекращения производства.

**Рабочий банк клеток - manufacturer's working cell bank:** Гомогенная суспензия посевного материала, полученная из банка (банков) главной посевной культуры на определенном уровне пассажа, расфасованная порциями в отдельные емкости с целью хранения. Все эти емкости во время хранения находятся в идентичных условиях; после взятия из хранилища их более не возвращают.

**Главная посевная культура - master seed lot:** Гомогенная суспензия исходных клеток, уже трансформированных вектором экспрессии, содержащим желаемый ген, которая расфасована порциями в отдельные емкости с целью хранения. Все емкости во время хранения находятся в идентичных условиях; после взятия из хранилища их более не возвращают.

**Плазмида - plasmid:** Автономно реплицирующаяся, циркулярная, экстрахромосомная ДНК. Она обычно несет несколько генов, некоторые из которых кодируют резистентность к различным антибиотикам; такую резистентность часто используют для того, чтобы отличить организмы, содержащие эту плазмиду, от тех, которые не содержат ее.

**Производство на уровне определенного пассажа -production at finite passage:** Метод культивирования, охватывающий ограниченное число пассажей или удвоений популяции клеток, которое нельзя превышать во время производства.

**Вектор - vector:** Участок ДНК, который может управлять своей собственной репликацией внутри клетки-хозяина, к которому можно прикреплять другие молекулы ДНК и, таким образом, амплифицировать их. Многие векторы являются бактериальными плазмидами, но в некоторых случаях вектор может быть интегрирован в хромосому клетки-хозяина после его введения в эту клетку и сохраняться в этой форме во время роста и размножения организма-хозяина.

# Производство препаратов, получаемых из человеческой крови или плазмы

## Принцип

- Лекарственные средства получаемые из человеческой крови или плазмы, имеют специфические свойства, являющиеся результатом биологической природы источника сырья, (инфицирующие агенты, в т.ч. вирусы.)
- Предотвращение передачи вирусов этими препаратами зависит от контроля исходного сырья и его происхождения, а также от последующих производственных процедур, включая удаление вируса и инактивацию.
- Этапы сбора крови или плазмы являются частью производственного процесса и осуществляются в соответствии с системой обеспечения качества и надлежащей производственной практики.
- Общие главы руководства по GMP применимы к препаратам человеческой крови и плазмы, также используют некоторые из приложений (производство стерильных лекарственных средств, использование ионизирующего излучения в производстве лекарственных средств, производство биологических ЛС).

# Управление качеством

1. Обеспечение качества охватывает все аспекты производства, начиная от емкостей для донорской крови, растворов антикоагулянтов, включая сбор, хранение, транспортировку, обработку, контроль качества и доставку готовой продукции.
2. Обработке подвергается только централизованно собранная кровь или плазма.
3. Полное испытание по качественным и количественным показателям, установленным в спецификациях на исходное сырье, не выполняется для промежуточных фракций препаратов крови.
4. Результаты контроля, выполненного на донорах, составляют часть документации о качестве в центре по забору крови и доступны для производителя.

# Помещения и оборудование

5. Забор крови может осуществляться в виде кампании, т.е. в комнате используемой в данное время исключительно для этой цели и с помощью специально предназначенных технических средств. Для обработки крови или плазмы следует использовать специально предназначенные технические средства.
6. Для предотвращения перекрестной контаминации помещения и оборудование, используемые для производственных операций, на которых используются препараты, прошедшие процесс удаления вируса или инактивации, не должны использоваться при работе с необработанными препаратами.

# Сбор крови

7. Устанавливают и доказывают эффективность методов дезинфекции кожи донора и обеспечивают их строгое соблюдение.
8. Личность каждого донора регистрируется во время отбора (доноров) и подтверждается перед венепункцией. Третья идентификация личности, проверкой подписи, необходима во время ручного аферезиса, когда компоненты крови возвращаются (донору) после разделения.
9. Особое внимание уделяют правильной маркировке и идентификации донорских образцов.
10. Должна существовать система, позволяющая проследить путь каждой порции, начиная от донора [и емкости для крови] и заканчивая готовой продукцией, включая идентификацию потребителя (больница или медицинский персонал). Идентификация личности реципиента является обязанностью потребителя.

11. После забора крови: должна быть стандартная рабочая методика, описывающая систему обмена информацией между центром по забору крови и центром по производству или фракционированию, устанавливающая, каким образом они могут проинформировать друг друга, если:

- после забора крови установлено, что донор не отвечает установленным требованиям, предъявляемым к здоровью донора;
- обнаружилось, что проведение испытания на наличие вирусов было выполнено не в соответствии с утвержденными методиками;
- у донора сероконверсия или инфекционное заболевание, обусловленное передающимся агентом (HBV, HCV и другие не-A, не-B, не-C вирусы гепатита, HIV 1 и 2 и другие вирусы в свете современных знаний);
- у реципиента после трансфузии развилось инфекционное заболевание, которое может быть связано с донором.

В таких случаях всегда повторно оценивают документацию серии и контроль готовой продукции. Изъятие серии проводят с учетом болезни, типа сероконверсии, объема пула, периода времени между забором крови и сероконверсией, природы препарата и способа его производства.

# Производство и контроль качества

12. Контролируют и валидируют установленные температуры крови, плазмы и промежуточной продукции во время транспортирования из центров по забору к производителям или между различными производственными площадками. То же самое применимо к доставке такой продукции.

13. Перед тем как любые порции крови или плазмы или любой препарат, полученный из них, будут разрешены для выпуска и/или фракционирования, с использованием валидированных чувствительных ELISA или RIA теста устанавливают отсутствие:

- HBsAg;
- антител к HIV 1 и HIV 2;
- антител к HCV;
- антител к сифилису.

Проводят испытания на другие вирусы на основании появляющихся знаний об инфицирующих агентах и соответствующих методов испытаний.

14. Некоторые производственные операции могут подвергать продукцию риску:
  - бактерии из контаминированной окружающей среды - накопление пирогенов;
  - вирусы - с реагентами во время производства (ферменты из экстрактов тканей пепсин и тромбин, а также МАТ, используемые для аффинной хроматографии);
  - производство - химических контаминантов(ферменты, растворители, детергенты, АТ или другие лиганды при хроматографии.
15. Регулярно контролируют и валидируют эффективность методик очистки и стерилизации.
16. Этикетки на каждой индивидуальной упаковке плазмы, хранящейся перед объединением и фракционированием, содержат идентификационный номер порции, наименование и адрес центра по забору плазмы, номер серии контейнера, температуру хранения, общий объем или массу плазмы, количество и тип использованного антикоагулянта, а также дату забора и/или разделения.
17. Объединение и оттаивание плазмы проводят в чистой зоне, с обязательным ношением масок и перчаток. Регулярно контролируют методы открывания емкостей, объединения и оттаивания.
18. Препараты; прошедшие процесс удаления вируса или инактивации, должны быть тщательно отделены от не прошедших (этот процесс).
19. Валидация методов удаления вируса или инактивации проводится с использованием отдельных производственных средств, чтобы для обычного производства не создавать никакого риска контаминации вирусами, используемыми для валидации.

# Методики фракционирования/очистки

## (а) Методы осаждения

20. Физические методы: *криоосаждение* (как начальный этап производства фактора VIII и фибриногена), для последующей очистки - *осаждение веществами, (кроме этанола), хроматографическое разделение*. Плазма, истощенная криоосаждением, используется для разделения с целью получения других факторов свертывания или белковых растворов плазмы.
21. Физико-химические методы: методики фракционирования этанолом, (для альбумина и иммуноглобулинов).
22. Должны также иметься инструкции для методов, основанных на других химических реактивах - этилакридинлактат, метанол, аммония сульфат, ПЭГ, катионные ПАВ, которые используются в комбинации с другими методиками очистки. Некоторые из этих веществ могут повышать безопасность препаратов в отношении контаминации вирусами.

## Б) выделение твердой фазы и методы фильтрации

23. Основные методики (комбинации с методиками осаждения и между собой):
1. гель-фильтрация - обессоливание или разделение компонентов, значительно различающихся по размерам;
  2. ионообменная и гидрофобная хроматография;
  3. аффинная хроматография, (специфические взаимодействия с иммунологическими или другими рецепторами, иммобилизованными на матрице).

Избирательность методик и выходы зависят:

- от качества вещества,
- от емкости колонки,
- природы и концентрации белков в препарате,
- ионной силы и рН буферов,
- скорости потока и температуры.

24. Уголь, бентонит, силикагель используют для удаления пигментов и липопротеинов.

25. В методиках указывают как хранить и регенерировать колонки, консервировать и элюировать консерванты. Должны иметься методики по осветлению и стерилизации, диа- или ультрафильтрации.

# Хранение образцов

- 26. Образцы каждого пула плазмы должны храниться в подходящих условиях, не менее одного года после истечения срока годности готовой продукции с самым большим сроком годности.

## Клеточные препараты и цельная кровь

27. Контроль качества должен осуществляться таким образом, чтобы могли быть обнаружены основные отклонения от спецификаций качества.
28. Перед выпуском препаратов красных кровяных клеток или цельной крови визуально контролируют отсутствие гемолиза и агрегации.
29. Клетки, тромбоциты и цельная кровь, который возвращены неиспользованными, обычно не выдаются вновь.