



ЕВРАЗИЙСКАЯ ЭКОНОМИЧЕСКАЯ КОМИССИЯ КОЛЛЕГИЯ

РЕШЕНИЕ

«25» июня 2024 г.

№ 75

г. Москва

О внесении изменений в Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100

В соответствии со статьями 30 и 56 Договора о Евразийском экономическом союзе от 29 мая 2014 года, пунктом 14 Протокола о применении санитарных, ветеринарно-санитарных и карантинных фитосанитарных мер (приложение № 12 к Договору о Евразийском экономическом союзе от 29 мая 2014 года), пунктом 3 статьи 5 Соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза от 23 декабря 2014 года и Концепцией гармонизации фармакопей государств – членов Евразийского экономического союза, утвержденной Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 22 сентября 2015 г. № 119, Коллегия Евразийской экономической комиссии **решила:**

1. Внести в Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза» изменения согласно приложению.

2. Ввести в действие с 1 января 2025 г. общие фармакопейные статьи, предусмотренные подпунктом «г» пункта 2 изменений

(приложение к настоящему Решению), вступивших в силу в соответствии с настоящим Решением.

3. Настоящее Решение вступает в силу по истечении 180 календарных дней с даты его официального опубликования.

Врио Председателя Коллегии
Евразийской экономической комиссии



Б. Султанов

ПРИЛОЖЕНИЕ

к Решению Коллегии
Евразийской экономической комиссии
от 25 июня 2024 г. № 75

ИЗМЕНЕНИЯ, вносимые в Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11 августа 2020 г. № 100

1. Пункт 2 изложить в следующей редакции:

«2. Установить, что:

регистрационные досье лекарственных средств для медицинского применения должны быть приведены в соответствие с требованиями Фармакопеи Евразийского экономического союза, утвержденной настоящим Решением, до 1 января 2026 г.;

регистрационные досье ветеринарных лекарственных препаратов, зарегистрированных в соответствии с подпунктом «а» пункта 2 Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 21 января 2022 г. № 1 «О Правилах регулирования обращения ветеринарных лекарственных средств на таможенной территории Евразийского экономического союза» (далее – Решение Совета Комиссии № 1), и регистрационные досье ветеринарных лекарственных препаратов с регистрационными удостоверениями, предусмотренными подпунктом «в» пункта 2 Решения Совета Комиссии № 1, должны быть приведены в соответствие с требованиями Фармакопеи Евразийского экономического союза не позднее 31 декабря 2027 г.;

регистрационные досье ветеринарных лекарственных препаратов, зарегистрированных в соответствии с подпунктом «б» пункта 2 Решения Совета Комиссии № 1, должны быть приведены в соответствие с требованиями Фармакопеи Евразийского экономического союза

до даты истечения срока действия их регистрационных удостоверений согласно подпункту «г» пункта 2 Решения Совета Комиссии № 1.».

2. В Фармакопее Евразийского экономического союза, утвержденной указанным Решением:

а) наименование раздела 2.1.7 изложить в следующей редакции: «2.1.7. Отбор проб»;

б) в общей фармакопейной статье 2.2.1.1.:

код «202010001-2022» заменить кодом «202010001-2023»;

в позиции, касающейся ацетонитрила Р1, слова «*Оптическая плотность (2.1.2.24). Не более 0,01*» заменить словами «*Оптическая плотность (2.1.2.24). Не более 0,10*»;

в) в наименовании раздела 2.3.9.0 слова «2.3.9.0. Применение» заменить словами «2.3.9. Применение»;

г) дополнить общими фармакопейными статьями следующего содержания:

2. ОБЩИЕ ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАТЬИ

2.1. МЕТОДЫ АНАЛИЗА

2.1.4. ИСПЫТАНИЯ НА ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРИМЕСЕЙ

201040037-2023

2.1.4.37. МЕТАНОЛ И 2-ПРОПАНОЛ

Требования общей фармакопейной статьи распространяются на лекарственные средства – фармацевтические субстанции (настойки, настойки гомеопатические матричные, экстракты жидкие) и лекарственные препараты в жидких лекарственных формах (настойки, экстракты, растворы спиртовые и др.), содержащие в своем составе этанол.

Предельно допустимое содержание метанола в лекарственных средствах должно составлять не более 0,05 % и 2-пропанола – не более 0,05 %, при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.

Испытания на содержание метанола и 2-пропанола могут быть проведены методами паровозной газовой хроматографии (метод 1) и газовой хроматографии (метод 2).

МЕТОД 1. ПАРОВАЯ ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Раствор внутреннего стандарта. 1,0 мл пропанола P1 доводят водой P до объема 100,0 мл и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора доводят водой P до объема 20,0 мл и перемешивают.

Испытуемый раствор. К 1,0 мл раствора внутреннего стандарта прибавляют 4,0 мл испытуемого образца, доводят водой P до объема 20,0 мл и перемешивают, при необходимости фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор сравнения (а). К 1,0 мл метанола P2 прибавляют 1,0 мл 2-пропанола P2, доводят водой P до объема 100,0 мл и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора доводят водой P до объема 20,0 мл и перемешивают.

Раствор сравнения (б). 5,0 мл этанола безводного P доводят водой P до объема 100,0 мл и перемешивают. 25,0 мл полученного раствора доводят водой P до объема 100,0 мл и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора доводят водой P до объема 20,0 мл и перемешивают.

Раствор сравнения (в). 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, 2,0 мл раствора сравнения (а) и 2,0 мл раствора сравнения (б) доводят водой P до объема 20,0 мл и перемешивают.

Условия хроматографирования:

- колонка: из расплавленного кварца длиной 30,0 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытая слоем поли[(цианопропил)(фенил)][диметил]силоксана P толщиной 3 мкм;
- газ-носитель: гелий для хроматографии P;
- скорость газа-носителя: 3 мл/мин;
- деление потока: 1:50;
- условия паровозной хроматографии:
 - температура уравнивания: 85 °С;
 - время уравнивания: 20 мин;
 - режим изменения температуры:

	Время (мин)	Температура (°С)
колонка	0 – 1,6	40
	1,6 – 9,9	40 → 65
	9,9 – 13,6	65 → 175
	13,6 – 20,0	175
блок ввода проб		200
детектор		200

- детектор: пламенно-ионизационный;
- объем вводимой пробы: по 1 мл газовой фазы испытуемого раствора и раствора сравнения (в).

Порядок элюирования веществ (раствор сравнения (в)): метанол, этанол, 2-пропанол, пропанол.

Относительное удерживание (время удерживания этанола около 5,3 мин): метанол – около 0,8; 2-пропанол – около 1,2; пропанол – около 1,6.

Пригодность хроматографической системы (раствор сравнения (в)):

- разрешение: не менее 5 между пиками метанола и этанола.

Содержание метанола в объемных процентах (об/об) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot S'_2}{S_2 \cdot S'_1 \cdot 40}$$

где: S_1 — площадь пика метанола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2 — площадь пика метанола на хроматограмме раствора сравнения (в);

S'_1 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

S'_2 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения (в).

Содержание 2-пропанола в объемных процентах (*об/об*) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_3 \cdot S'_2}{S_4 \cdot S'_1 \cdot 40}$$

где: S_3 — площадь пика 2-пропанола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_4 — площадь пика 2-пропанола на хроматограмме раствора сравнения (в);

S'_1 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

S'_2 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения (в).

МЕТОД 2. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Раствор внутреннего стандарта. 1,0 мл пропанола P доводят водой P до объема 100,0 мл и перемешивают.

Испытуемый раствор. 4,0 мл испытуемого образца и 1,0 мл раствора внутреннего стандарта доводят водой P до объема 20,0 мл и перемешивают, при необходимости фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор сравнения (а). 1,0 мл метанола P и 1,0 мл 2-пропанола P доводят водой P до объема 100,0 мл и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора доводят водой P до объема 20,0 мл и перемешивают.

Раствор сравнения (б). 1,0 мл этанола безводного P доводят водой P до объема 50,0 мл и перемешивают.

Раствор сравнения (в). 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, 2,0 мл раствора сравнения (а) и 1,0 мл раствора сравнения (б) доводят водой P до объема 20,0 мл и перемешивают.

Условия хроматографирования:

– колонка: из расплавленного кварца длиной 30,0 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытая слоем поли[(цианопротил)(фенил)][диметил]силоксана P толщиной 3 мкм;

– газ-носитель: гелий для хроматографии P ;

– скорость газа-носителя: 3 мл/мин;

– деление потока: 1:50;

– режим изменения температуры:

	Время (мин)	Температура (°C)
колонка	0 – 1,6	40
	1,6 – 9,9	40 → 65
	9,9 – 13,6	65 → 175
	13,6 – 20,0	175
блок ввода проб		200
детектор		200

– детектор: пламенно-ионизационный;

– объем вводимой пробы: по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения (в).

Порядок элюирования веществ (раствор сравнения (в)): метанол, этанол, 2-пропанол, пропанол.

Относительное удерживание (время удерживания этанола около 5,3 мин): метанол – около 0,8; 2-пропанол – около 1,2; пропанол – около 1,6.

Пригодность хроматографической системы (раствор сравнения (в)):

– разрешение: не менее 5 между пиками метанола и этанола.

Содержание метанола в объемных процентах (*об/об*) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot S'_2}{S_2 \cdot S'_1 \cdot 40}$$

где: S_1 — площадь пика метанола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2 — площадь пика метанола на хроматограмме раствора сравнения (в);

S'_1 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

S'_2 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения (в).

Содержание 2-пропанола в объемных процентах (*об/об*) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_3 \cdot S'_2}{S_4 \cdot S'_1 \cdot 40}$$

где: S_3 — площадь пика 2-пропанола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_4 — площадь пика 2-пропанола на хроматограмме раствора сравнения (в);

S'_1 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

S'_2 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения (в).

2.1.6. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

201060011-2023

2.1.6.11. ИСПЫТАНИЕ ЖИВЫХ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН НА НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТЬ

Общая фармакопейная статья описывает метод испытания на нейровирулентность живых вирусных вакцин.

В каждом испытании используют не менее десяти обезьян (нечеловекообразных приматов), клинически здоровых и серонегативных по отношению к испытываемому вирусу. Каждой из обезьян в таламический отдел каждого полушария головного мозга вводят не менее 0,5 мл испытываемого образца при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье. Доза вакцины, введенной обезьяне, не должна быть меньше, чем разовая доза вакцины, рекомендованная для человека.

Для обнаружения возможной контаминации дикими нейровирулентными вирусами контрольную группу, состоящую не менее чем из четырех обезьян, содержат совместно с группой иммунизированных обезьян или в непосредственной близости от них. Иммунизированных обезьян наблюдают 17 – 30 сут при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье, а обезьян из контрольной группы – в течение того же периода и дополнительно 10 сут. Во время наблюдения в группах отмечают возникновение неврологических и других клинически важных симптомов. Гибель животных в первые 48 ч после инъекции считают неспецифического характера, а сами животные могут быть заменены другими.

Результаты испытания являются достоверными, если:

- не более 20 % иммунизированных обезьян погибают по неспецифическим причинам;
- образцы сыворотки крови обезьян контрольной группы, отобранные во время иммунизации испытываемых животных и через 10 сут после эвтаназии последних, не имеют признаков инфекции, вызванной диким вирусом испытываемого типа или вирусом кори.

По окончании периода наблюдения выполняют аутопсию и гистологическое изучение соответствующих отделов мозга для выявления

признаков поражения центральной нервной системы. Испытуемый образец выдерживает испытание, если не обнаруживаются неожиданных клинических и гистологических признаков поражения центральной нервной системы, которые могут быть вызваны введенным вирусом.

201060012-2023

2.1.6.12. ИСПЫТАНИЕ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА С

Испытание на бактериальные эндотоксины с использованием рекомбинантного фактора С (*recombinant factor C, rFC*) применяют для количественного определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Испытания с использованием *rFC*, основанные на последовательности гена мечехвоста (*Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* или *Carcinoscorpius rotundicauda*), выполняют с использованием метода флуориметрии.

Испытание осуществляют таким образом, чтобы избежать контаминации бактериальными эндотоксинами.

Рекомендации по применению испытания на бактериальные эндотоксины представлены в общей фармакопейной статье 2.1.6.21. *Применение испытания на бактериальные эндотоксины.*

ОБОРУДОВАНИЕ

Стеклоянную посуду и другое термостойкое оборудование депирогенизируют методом сухожаровой стерилизации, используя валидированный процесс. Как правило, минимальное время и температура стерилизации составляют 30 мин при 250 °С. Если используют оборудование из полимерных материалов (например, микротитровальные планшеты и наконечники для автоматических пипеток), необходимо подтвердить отсутствие на них поддающихся обнаружению эндотоксинов и других мешающих факторов.

РЕАКТИВЫ

Реактивы

Рекомбинантный фактор С кодируется последовательностью гена мечехвоста (*Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* или *Carcinoscorpius rotundicauda*). Все реактивы, включая флуорогенный субстрат и буферный раствор для анализа, не должны содержать эндотоксины выше предела обнаружения.

Растворы реактивов

При необходимости реактивы готовят в соответствии с инструкцией производителя набора для испытания. Реактивы хранят охлажденными или замороженными в соответствии с инструкцией производителя.

Вода для испытания на бактериальные эндотоксины

Вода для инъекций Р или иная подходящая вода, не реагирующая с реактивом rFC на его пределе чувствительности.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНОГО РАСТВОРА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ЭНДОТОКСИНА

Исходный раствор стандартного образца эндотоксина готовят из стандартного образца эндотоксина, например, СО ФЕАЭС эндотоксина, калиброванного относительно международного стандартного образца.

Содержание бактериальных эндотоксинов в международном стандартном образце устанавливается Всемирной организацией здравоохранения и выражается в международных единицах (МЕ). 1 МЕ эндотоксина эквивалентна 1 ЕЭ (единица эндотоксина).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ЭНДОТОКСИНА

Исходный раствор стандартного образца эндотоксина энергично перемешивают и готовят подходящую серию разведений, используя воду для испытания на бактериальные эндотоксины.

Во избежание потери активности вследствие адсорбции растворы используют по возможности быстрее.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ РАСТВОРОВ

Испытуемые растворы готовят путем растворения или разведения испытуемого образца субстанции для фармацевтического применения или лекарственного препарата с использованием воды для испытания на бактериальные эндотоксины. Для некоторых из них может быть более подходящим растворение или разведение в других водных растворах. При необходимости доводят рН испытуемого раствора так, чтобы после смешивания реактивов и испытуемого раствора значение рН полученной смеси находилось в диапазоне, указанном производителем набора реактивов (обычно от 6,0 до 8,0). Значение рН доводят кислотой, основанием или подходящим буферным раствором в соответствии с инструкцией производителя набора реактивов. Кислота или основание могут быть приготовлены из концентратов или твердых веществ с использованием воды для испытания на бактериальные эндотоксины в контейнерах, не контаминированных эндотоксинами. Буферные растворы не должны содержать эндотоксины выше предела обнаружения и другие мешающие факторы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМОГО РАЗВЕДЕНИЯ

Максимально допустимое разведение (МДР) представляет собой наибольшее разведение испытуемого образца, позволяющее определить предельное содержание эндотоксина. МДР рассчитывают по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{ПСЭ} \cdot \text{С}}{\lambda}$$

где: ПСЭ — предельное содержание эндотоксинов;

С — концентрация испытуемого раствора;

λ — чувствительность лизата амебоцитов в международных единицах в миллилитре.

Предельное содержание эндотоксинов для действующего вещества рассчитывают на основе дозы лекарственного препарата для парентерального применения по формуле:

$$\text{ПСЭ} = \frac{K}{M}$$

где: K — предельная пирогенная доза эндотоксина на килограмм массы тела;

M — максимальная разовая доза лекарственного препарата на килограмм массы тела.

Если лекарственный препарат вводится с частыми интервалами или инфузионно, величина M соответствует общей максимальной дозе, вводимой в течение 1 ч.

Предельное содержание эндотоксинов выражают в единицах: МЕ/мл, МЕ/мг, МЕ/ЕД и др.

Концентрацию испытуемого раствора выражают в единицах:

– мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов указано в массовых единицах (МЕ/мг);

– ЕД/мл, если предельное содержание эндотоксинов указано в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/ЕД);

– мл/мл, если предельное содержание эндотоксинов указано в объемных единицах (МЕ/мл).

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ФЛУОРИМЕТРИИ

Метод используют для измерения флуоресценции (относительные единицы флуоресценции, ОЕФ), излучаемой флуоресцентным субстратом (реактивом) после его расщепления rFC , активируемым эндотоксином.

Используют метод определения флуоресценции в конечной точке, основанный на количественной зависимости концентрации эндотоксина от флуоресценции смеси реактивов в конце инкубационного периода, выражаемой, например, как ΔOEF :

$$\Delta OEF = OEF_{t_i} - OEF_{t_0}$$

где: OEF_{t_i} — флуоресценция смеси реактивов в конце инкубационного периода;

OEF_{t_0} — флуоресценция смеси реактивов в начале инкубационного периода.

Испытание выполняют при температуре инкубации в соответствии с инструкцией производителя набора реактивов (обычно $(37 \pm 1)^\circ C$).

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

В ходе предварительных испытаний подтверждают правильность выполнения метода. При этом должны выдерживаться требования, предъявляемые к калибровочной кривой (см. раздел *Критерии приемлемости калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина* данной общей фармакопейной статьи), а испытуемый раствор не должен оказывать влияния на проведение испытания (см. раздел *Мешающие факторы* данной общей фармакопейной статьи).

При внесении в условия испытания изменений, способных повлиять на его результаты, необходимо провести валидацию методики испытания.

КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ЭНДОТОКСИНА

Испытание должно быть выполнено для каждой серии реактива rFC .

Чувствительность прибора должна быть настроена в соответствии с инструкцией производителя набора реактивов для испытания.

Для построения калибровочной кривой используют исходный раствор стандартного образца эндотоксина, из которого готовят не менее трех растворов с концентрациями эндотоксина в диапазоне, указанном производителем набора реактивов. Если требуемый для испытания диапазон превышает $2 \lg$ диапазона, указанного производителем, необходимо использовать дополнительные растворы эндотоксина с шагом \lg . Выполняют испытание, используя не менее трех повторностей растворов каждой концентрации эндотоксина в соответствии с инструкцией производителя (соотношение объемов, время инкубации, температура, pH и др.).

Абсолютное значение коэффициента корреляции $|r|$ для диапазона приготовленных концентраций эндотоксина должно быть не менее 0,980.

МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Поскольку при проведении испытания с реактивом rFC фактор G не используется, то получения ложноположительных результатов вследствие его активации β -глюканом не ожидается, что требует учета при сравнении

метода с другими методами количественной оценки бактериальных эндотоксинов.

Концентрацию эндотоксинов выбирают около центра калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина.

Готовят растворы А, В, С и D в соответствии с таблицей 2.1.6.12.-1. Выполняют испытание не менее чем на двух повторностях этих растворов в соответствии с инструкцией производителя набора реактивов для испытания (объемы испытуемого раствора и смеси реактивов, объемное соотношение испытуемого раствора и смеси реактивов, время инкубации и др.).

Результаты испытания считают достоверными, если выполняются следующие условия:

- абсолютное значение коэффициента корреляции калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина не менее 0,980;
- результат, полученный с раствором D, не превышает предельного значения, указанного в инструкции производителя набора реактивов, или меньше предела обнаружения эндотоксина для используемого реактива *rFC*.

Рассчитывают среднее значение открываемости добавленного эндотоксина, вычитая из среднего значения концентрации эндотокси-

на в растворе В (содержащего добавленный эндотоксин, таблица 2.1.6.12.-1) среднее значение концентрации эндотоксина в растворе А (если эндотоксин обнаружен, таблица 2.1.6.12.-1).

Считают, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания измеренная концентрация эндотоксина, добавленного в испытуемый раствор, находится в пределах 50 – 200 % от известной концентрации добавленного эндотоксина после вычитания любого эндотоксина, обнаруженного в растворе без добавления эндотоксина.

Если значение открываемости эндотоксина выходит за пределы указанного диапазона, считают, что испытуемый раствор содержит мешающие факторы. Повторяют испытание, используя большее разведение, не превышающее МДР. Кроме того, влияние испытуемого раствора (в разведении, не превышающем МДР) можно устранить обработкой с помощью валидированных методов, таких как фильтрация, нейтрализация, диализ, термическая обработка или этапы связывания, специфичные для эндотоксина (обогащение эндотоксина из испытуемого раствора до обнаружения при отсутствии мешающей матрицы). Для установления эффективно-

Таблица 2.1.6.12.-1. – *Приготовление растворов для испытания*

Раствор	Концентрация эндотоксинов	Раствор, к которому прибавляют эндотоксины	Количество повторностей
А	отсутствует	испытуемый раствор	≥ 2
В	средняя концентрация на калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина	испытуемый раствор	≥ 2
С	минимум 3 концентрации (наименьшую концентрацию обозначают λ)	вода для испытания на бактериальные эндотоксины	каждой концентрации ≥ 2
Д	отсутствует	вода для испытания на бактериальные эндотоксины	≥ 2

Примечание.

Раствор А – испытуемый раствор, разведение которого не превышает МДР.

Раствор В (положительный контроль) – испытуемый раствор в таком же разведении, как и раствор А, содержащий добавленный эндотоксин в концентрации, близкой к центру калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина.

Раствор С – раствор стандартного образца эндотоксина в концентрациях, используемых при валидации методики, как описано в разделе Критерии приемлемости калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина данной общей фармакопейной статьи.

Раствор D (отрицательный контроль) – вода для испытания на бактериальные эндотоксины.

сти устранения мешающего влияния выбранным методом обработки без потери эндотоксинов повторяют испытание на мешающие факторы, добавляя к испытываемому раствору стандартный раствор эндотоксина, с последующей его обработкой выбранным методом.

ИСПЫТАНИЕ

МЕТОДИКА

Проводят испытание по методике, описанной в разделе *Мешающие факторы* данной общей фармакопейной статьи.

РАСЧЕТЫ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитывают концентрацию эндотоксинов для каждой повторности раствора А, используя калибровочную кривую стандартного образца эндотоксина, полученную на основании раствора С стандартного образца эндотоксина.

Результаты испытания считаются достоверными, если выполняются следующие условия:

- результаты, полученные для раствора С, соответствуют требованиям к валидации, указанным в разделе *Критерии приемлемости калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина* данной общей фармакопейной статьи;

- открываемость эндотоксина, рассчитанная из концентрации эндотоксина, обнаруженной в растворе В, после вычитания концентрации эндотоксина, обнаруженного в растворе А, находится в диапазоне 50 – 200 %;

- результат, полученный с раствором D, не превышает предельного значения, указанного в инструкции производителя набора реактивов, или меньше предела обнаружения эндотоксина для используемого реактива *rFC*.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Испытуемый образец выдерживает испытание, если средняя концентрация эндотоксинов в повторностях раствора А с учетом разведений и концентраций ниже предельного содержания эндотоксинов.

201060013-2023

2.1.6.13. ИСПЫТАНИЕ НА АКТИВАЦИЮ МОНОЦИТОВ

Настоящая фармакопейная статья представляет методы для обнаружения или количествен-

ного определения бактериальных эндотоксинов и пирогенов неэндотоксиновой природы с использованием моноцитов или моноцитарных клеток человека в испытаниях *in vitro*.

Испытание на активацию моноцитов подходит для замены испытания *Пирогенность* после валидации методики для конкретного лекарственного средства.

Дополнительную информацию о практических аспектах испытаний можно найти в разделе *Рекомендации по применению* данной общей фармакопейной статьи.

1. ВВЕДЕНИЕ

В основу методов на активацию моноцитов положена способность моноцитов или моноцитарных клеток человека в присутствии пирогенных веществ продуцировать эндогенные медиаторы, в частности, провоспалительные цитокины (фактор некроза опухолей (ФНО- α), интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β) и интерлейкин-6 (ИЛ-6) и др.). Провоспалительные цитокины принимают участие в патогенезе лихорадки, поэтому испытание на активацию моноцитов может выявлять весь спектр пирогенов в испытываемом образце.

При испытании лекарственных средств, содержащих неэндотоксиновые пирогены (например, пептидогликаны, дрожжи, грибы, вирусы) или провоспалительные цитокины, часто получают очень крутые или нелинейные кривые зависимости «доза – ответ», в сравнении с кривыми зависимости «доза – ответ» эндотоксинов. Лекарственные средства, которые могут содержать пирогены, отличные от бактериальных эндотоксинов, необходимо испытывать в диапазоне концентраций, включающих минимальное разведение.

В данной общей фармакопейной статье представлены три метода.

Метод 1. Количественное испытание.

Метод 2. Полуколичественное испытание.

Метод 3. Сравнительное испытание с контрольной серией (серия, утвержденная в качестве контрольной).

Испытания проводят таким образом, чтобы избежать контаминации пирогенами.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Максимально допустимое разведение представляет собой наибольшее разведение

испытуемого образца, при котором может быть определено предельно допустимое содержание пирогена. Максимально допустимое разведение рассчитывают по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{ПСП} \cdot \text{С}}{\text{Предел обнаружения}}$$

где: ПСП — предельное содержание пирогенов;
С — концентрация испытуемого раствора.

Поскольку предел обнаружения не всегда известен заранее, для расчета максимально допустимого разведения могут быть использованы архивные данные.

Критерием приемлемости для принятия положительного или отрицательного решения является предельное содержание пирогенов, которое выражают в эквиваленте единиц эндотоксина на миллиграмм или миллилитр, или на единицу биологической активности лекарственного средства.

Предельное содержание пирогенов рассчитывают по формуле:

$$\text{ПСП} = \frac{K}{M}$$

где: K — предельная пирогенная доза бактериального эндотоксина из расчета на килограмм массы тела;

M — максимальная разовая доза испытуемого лекарственного препарата из расчета на килограмм массы тела.

В случае введения лекарственного препарата через частые интервалы или инфузионно, в качестве « M » используют общую максимальную дозу, введенную в течение одного часа.

В случае, когда для лекарственного средства установлено предельное содержание эндотоксина, предельное содержание пирогенов будет равно предельному содержанию эндотоксинов, при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье. В этом случае концентрация испытуемого раствора выражается:

– в мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов установлено в массовых единицах (МЕ/мг);

– в Ед/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/Ед);

– в мл/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в объемных единицах (МЕ/мл).

Эквиваленты эндотоксина – значения концентрации пирогенного вещества, вычисленные по кривой «доза – ответ» стандартного образца эндотоксина (метод 1) или значения, рассчитываемые путем сравнения реакций с растворами стандартного образца эндотоксина (метод 2). Исходный раствор готовят из стандартного образца эндотоксина, калиброванного относительно Международного стандарта эндотоксина, например *СО ФЕАЭС эндотоксина*.

Предел обнаружения определяют с использованием калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина. Предел обнаружения представляет собой концентрацию эндотоксина, равную предельному значению, выраженному в единицах, соответствующих показаниям детектирующих приборов (например, для иммуноферментного анализа используют поглощение (оптическую плотность)). Для целей данного испытания предел обнаружения выражают как эквивалент эндотоксина на миллилитр.

Предельное значение рассчитывают по формуле:

$$\bar{X} + 3s$$

где: \bar{X} — среднее значение четырех повторностей реакций на отрицательный контроль (R_0);

s — стандартное отклонение четырех повторностей реакций на отрицательный контроль (R_0).

3. ОБЩАЯ ПРОЦЕДУРА

Испытуемый раствор инкубируют с источником моноцитов человека или с линией моноцитарных клеток человека. Источником моноцитов человека могут быть: гепаринизированная периферическая кровь человека, отобранная не более, чем за 4 ч до испытания; моноцитсодержащая фракция крови, например, моноклеарные клетки периферической крови человека, выделенные центрифугированием в градиенте плотности.

Гепаринизированную периферическую кровь человека обычно разводят культуральной средой или физиологическим раствором, например, до концентрации от 2 % до 50 % (*об/об*). Моноклеарные клетки периферической крови человека или линии моноцитарных клеток в культуральной среде с добавлением плазмы донора или сыво-

ротки АВ (IV группа крови) обычно используют при окончательной плотности клеток $0,1 - 1,0 \times 10^6$ клеток на лунку, пробирку или другую емкость. При использовании линий моноцитарных клеток сыворотку АВ можно заменить на фетальную бычью сыворотку, инактивированную нагреванием.

Культура клеток готовится при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в подходящей атмосфере для культуральной среды, например, увлажненном воздухе с 5 % CO_2 . Продолжительность культивирования должна быть достаточной для накопления маркеров пирогена. Реакцию выбранного маркера, например, провоспалительного цитокина, сравнивают с реакциями на стандартный образец эндотоксина или контрольную серию испытуемого препарата.

4. ОБОРУДОВАНИЕ

Всю стеклянную посуду и другой расходный материал, устойчивую к нагреванию, депируют в стерилизационном воздушном шкафу с использованием валидированной процедуры. Общепринятым минимальным режимом депирирования является нагревание при температуре $250 ^\circ\text{C}$ не менее 30 минут. Если используют пластиковый материал, в частности микропланшеты и наконечники для автоматических пипеток, необходимо убедиться, что данное оборудование не содержит пирогенов и не влияет на испытание.

5. ИСТОЧНИКИ КЛЕТОК И КВАЛИФИКАЦИЯ

5.1. ЦЕЛЬНАЯ КРОВЬ

Цельную кровь получают от доноров или от пулов цельной крови, которые квалифицируют в соответствии с требованиями, описанными в разделах 5.3, 5.4, 5.5 и, где это применимо, в разделе 6.3 данной общей фармакопейной статьи.

5.2. МОНОНУКЛЕАРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Мононуклеарные клетки периферической крови выделяют из крови, полученной от доноров или из пулов цельной крови, которые квалифицируют в соответствии с требованиями, описанными в разделах 5.3, 5.4, 5.5 и, где это применимо, в разделе 6.3 данной общей фармакопейной статьи.

5.3. КВАЛИФИКАЦИЯ ДОНОРОВ

Доноры крови должны соответствовать приведенным квалификационным критериям наряду с другими действующими требованиями в отношении согласия на процедуру, здоровья, безопасности и этических принципов. Доноры должны описывать себя как «здоровые», «не страдающие любыми бактериальными или вирусными инфекциями» и «не имеющие симптомов любой инфекции в течение периода не менее одной недели перед сдачей крови». Доноры не должны принимать нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты в течение 48 ч перед сдачей крови и стероидные противовоспалительные лекарственные препараты – в течение 7 дней перед сдачей крови. Лица, которым были назначены иммунодепрессанты или другие лекарственные препараты, которые влияют на выработку выбранных показателей, не могут быть донорами крови. Донорская кровь должна быть обследована на инфекционные маркеры в соответствии с национальными требованиями по трансфузиологии.

5.4. КВАЛИФИКАЦИЯ КЛЕТОК, ОБЪЕДИНЕННЫХ ОТ РЯДА ДОНОРОВ

Пулы (цельной крови или компонентов крови, например мононуклеарные клетки периферической крови) должны состоять из порций крови минимум от четырех индивидуальных доноров, но предпочтительно от восьми или более доноров; пулы формируются путем отбора от каждого пакета донорской крови приблизительно одинаковых объемов крови или клеток от приблизительно одинакового объема крови. Для квалификации объединенных в пул клеток действуют следующим образом: в течение 4 ч с момента сбора крови строят кривые «доза – ответ» для пула с использованием растворов стандартного образца эндотоксина в не менее чем четырех разведениях, например, в диапазоне от 0,01 МЕ/мл до 4 МЕ/мл.

Кривые «доза – ответ» должны отвечать двум критериям для калибровочной кривой, описанным в разделе 6.1 данной общей фармакопейной статьи. Если пул должен использоваться для обнаружения неэндотоксиновых пирогенов, то пулы должны быть квалифицированы, как описано в разделе 6.3 данной общей фармакопейной статьи. При объединении клеток, эффект усреднения должен учитываться при утверждении ста-

туса соответствия («соответствует» или «не соответствует») спецификации данного продукта.

5.5. КВАЛИФИКАЦИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК

В качестве источника клеток в испытании на активацию моноцитов могут быть использованы криоконсервированные клетки, например, кровь доноров, мононуклеарные клетки периферической крови или моноцитарные клеточные линии. Пулы криоконсервированных клеток получают объединением перед замораживанием, или объединением единичных криоконсервированных донорских порций сразу же после оттаивания. Квалификацию криоконсервированной крови или клеток выполняют сразу же после оттаивания (и объединения, в случае необходимости). Кривые «доза – ответ» для криоконсервированных крови или клеток должны отвечать двум критериям для калибровочной кривой, описанным в разделе 6.1 данной общей фармакопейной статьи. Если клетки предназначены для обнаружения неэндотоксиновых пирогенов, их квалификация должна проводиться в соответствии с разделом 6.3 данной общей фармакопейной статьи.

5.6. НЕПРЕРЫВНАЯ ЛИНИЯ МОНОЦИТАРНЫХ КЛЕТОК

Моноцитарные клеточные линии подходят для обнаружения бактериальных эндотоксинов, но имеют ограниченное применение для обнаружения неэндотоксиновых пирогенов. Линию моноцитарных клеток необходимо постоянно культивировать для обеспечения достаточного количества клеток при использовании в испытании на активацию моноцитов. Для оптимизации метода можно использовать клоны, полученные из клеточной линии.

Клеточные линии должны поддерживаться в асептических условиях и регулярно контролироваться на контаминацию микоплазмами. Кроме того, клетки должны регулярно проверяться на идентичность (например, время удвоения, морфология и функции) и стабильность.

Функциональная стабильность клеточной линии оценивается путем наблюдения за ее состоянием с учетом количества пассажей в процессе рутинных испытаний. Должны быть установлены критерии функциональной стабильности, которые могут включать критерии роста, максимальную реакцию, полученную в испытании, фоновый шум и экспрессию

рецептора. Экспрессию рецептора можно проверить с помощью специфических лигандов, например, липополисахарида для *толл*-подобного рецептора 4 (TLR₄), липотейхоевой кислоты для *толл*-подобного рецептора 2 (TLR₂), синтетического бактериального липопротеина для TLR₂-TLR₁ или синтетического бактериального липопротеина для TLR₂-TLR₆ или флагеллина.

Кривые зависимости «доза – ответ» должны соответствовать двум критериям калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина, описанным в разделе 6.1 данной фармакопейной статьи. Если клетки предназначены для обнаружения неэндотоксиновых пирогенов, их квалификация должна проводиться в соответствии с разделом 6.3 данной общей фармакопейной статьи.

6. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Для обеспечения прецизионности и точности испытания на активацию моноцитов проводят предварительные испытания, в которых проверяют выполнение критериев для кривой стандартного образца эндотоксина, отсутствие взаимодействия растворов в ходе испытания, способность методики обнаруживать эндотоксины и неэндотоксиновые пирогены, отсутствие влияния растворов на детектирующую систему. Проведение испытаний на мешающие факторы требуется, если в условия эксперимента вносятся какие-либо изменения, которые могут повлиять на его результат.

6.1. КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ ДЛЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ЭНДОТОКСИНА

Из раствора стандартного образца эндотоксина готовят не менее 4 растворов с различными концентрациями эндотоксина для построения калибровочной кривой. Проводят испытание, используя не менее 4 повторностей каждой концентрации раствора стандартного образца эндотоксина. Базовое высвобождение выбранного маркера в отсутствие добавленного раствора стандартного образца эндотоксина должно быть оптимизировано до наиболее низкого возможного уровня (например, при использовании иммуноферментного анализа оптическая плотность ниже 0,1).

Для калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина должны выполняться два критерия приемлемости:

– регрессионная зависимость ответов (соответственно преобразованных при необходимости) от \lg дозы должна быть статистически значима ($p < 0,01$);

– регрессионная зависимость ответов на \lg дозы не должна существенно отличаться от линейности ($p > 0,05$) (2.3.12.0).

6.2. ИСПЫТАНИЕ НА МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Для обеспечения точности испытания проводят предварительные испытания, подтверждающие отсутствие влияния испытуемого образца на результаты испытания. Используя подходящий растворитель, готовят разведения испытуемого образца в геометрической прогрессии (1:2, 1:4 и т.д.) не превышающие максимально допустимого разведения. Аналогично готовят разведения испытуемого образца и прибавляют эндотоксин в соответствующей концентрации. В качестве альтернативы можно использовать разбавитель, содержащий добавленный эндотоксин в соответствующей концентрации. В обоих случаях соответствующая концентрация эндотоксина равна или близка к середине калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина (метод 1) или вдвое превышает расчетное значение предела обнаружения (метод 2).

Проводят испытания полученных рядов разведений параллельно в одном эксперименте. Для вычисления концентрации эквивалентов эндотоксина в каждом растворе используют калибровочную кривую.

Вычисляют среднее значение открываемости добавленного эндотоксина в растворе с добавлением стандартным образцом эндотоксина. Для этого из концентрации эквивалента эндотоксина в растворе с добавленным стандартным образцом эндотоксина вычитают среднюю концентрацию эквивалента эндотоксина в растворе (при его наличии).

Считают, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания вычисленная концентрация эквивалентов эндотоксина в испытуемом растворе с добавлением стандартного образца эндотоксина находится в пределах от 50 % до 200 % от известной концентрации добавленного стандартного образца эндотоксина, после вычитания

концентрации эквивалентов эндотоксина, обнаруженных в растворе без добавления стандартного образца эндотоксина. Если испытание не отвечает этому критерию, следует провести испытание методом 3.

В методе 3 разведения исследуемых и контрольных серий зависят от типа анализа, используемого для сравнения между ними. Тип анализа должен быть обоснован и валидирован для каждого лекарственного средства и должен включать критерии приемлемости. Например, испытания проводят на 3 разведениях испытуемого образца: наибольшая концентрация (наименьшее разведение), при котором наблюдают наибольшее высвобождение выбранного маркера, и двукратные разведения непосредственно выше и ниже выбранного разведения. В связи с тем, что концентрация испытуемого образца с наибольшим высвобождением выбранного маркера может зависеть как от особенностей клеток или крови донора, так и серии лекарственного средства, должна быть проведена валидация методики в отношении конкретного лекарственного средства в трех независимых испытаниях с использованием в каждом из них клеток от различных доноров. Наибольшая концентрация (наименьшее разведение), при которой регистрируется наибольшее высвобождение выбранного маркера у большинства доноров и двукратные разведения непосредственно ниже и выше выбранного разведения, считаются пригодными для дальнейшего выполнения испытания.

Если наибольшее высвобождение выбранного маркера происходит при испытании исходного испытуемого раствора, то последующее испытание должны выполнять с использованием неразведенного (исходного) испытуемого раствора, а также испытуемого раствора, разведенного в соотношениях 1:2 и 1:4 перед его добавлением к моноцитарным клеткам. Степень разведения для этих трех растворов обозначают как f_1 , f_2 и f_3 .

Если содержание пирогена в образце исходно высокое, то целесообразнее использовать модель параллельных линий для анализа кривых «доза – ответ» для испытуемой и контрольной серий. В таком случае, растворы испытуемых образцов испытывают в 3 или более геометрических разведениях, которые охватывают диапазон кривой «доза – ответ», используемый для выбранного анализа (2.3.12.0).

6.3. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ НЕЭНДОТОКСИНОВЫХ ПИРОГЕНОВ

В предварительных испытаниях также подтверждают способность выбранной тест-системы обнаруживать не только бактериальные эндотоксины, но и неэндотоксиновые пирогены. Пригодность метода для конкретного лекарственного средства должна быть проверена. Для этого можно использовать архивные серии, наличие в которых неэндотоксиновых пирогенов было определено по положительным реакциям в испытании *Пирогенность* или при развитии лихорадочных реакций у человека. При отсутствии таких серий лекарственных средств, предварительные испытания должны включать валидацию используемой методики с использованием не менее двух неэндотоксиновых лигандов *толл*-подобных рецепторов, например, пептидогликанов, липотейхоевой кислоты, синтетических бактериальных липопротеинов, флагеллина и неочищенного бактериального экстракта цельных клеток. Выбор неэндотоксинового пирогена должен отражать наиболее вероятное загрязнение исследуемого лекарственного средства.

6.4. ВЛИЯНИЕ НА СИСТЕМУ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

Определяют оптимальное разведение раствора испытуемого образца и проверяют его влияние на систему детектирования (например, иммуноферментного анализа) для выбранного маркера. Различие в определяемых концентрациях разведений стандарта выбранного маркера в присутствии и отсутствии испытуемого образца должно находиться в диапазоне $\pm 20\%$ поглощения (оптической плотности).

7. МЕТОДЫ

7.1. МЕТОД 1: КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

Метод 1 основан на сравнении реакции испытуемого лекарственного средства с калибровочной кривой раствора стандартного образца эндотоксина. Концентрация пирогенных веществ в испытуемом лекарственном средстве не должна превышать значение предельного содержания пирогенов.

7.1.1. Процедура испытания

Используя валидированную методику испытания, готовят растворы, представленные в таблице 2.1.6.13.-1. Квалифицированные клетки

культивируют в четырех повторностях с каждым из растворов.

7.1.2. Вычисления и обработка результатов

Для обработки результатов используют данные, относящиеся к клеткам, соответствующие двум критериям калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина. Для каждого источника клеток (индивидуальное донорство, донорский пул или клеточная линия) при расчете концентрации эквивалентов эндотоксина в каждой из повторностей растворов А, В, С, AS, BS и CS используют калибровочную кривую R₁-R₄.

Открываемость эквивалентов эндотоксина, рассчитанная путем вычитания концентрации эквивалентов эндотоксина в растворе А, В, С из концентраций эквивалентов эндотоксина в растворе AS, BS и CS, соответственно, должна находиться в диапазоне от 50 % до 200 %. Разведения, не соответствующие данным условиям, исключают из дальнейшей обработки.

Испытуемое лекарственное средство отвечает требованиям испытаний для конкретного источника клеток, если средние концентрации эквивалентов эндотоксина, полученные в повторностях раствора А, В и С, с учетом поправок на разведение, меньше предельного содержания пирогенов, установленного для испытуемого лекарственного средства. Одно отвечающее требованиям разведение является минимальным требованием для признания пригодности испытания.

7.1.3. Критерии соответствия или несоответствия лекарственного средства

При использовании клеток от индивидуальных доноров, испытуемое лекарственное средство должно выдерживать испытание, проведенное с клетками от каждого из четырех различных доноров. Если испытуемое лекарственное средство выдерживает испытание с клетками от трех из четырех доноров, то испытание продолжают с клетками от других четырех доноров, клетки от которых не использовались в первом испытании. Испытуемое лекарственное средство должно выдерживать испытание с клетками от семи из восьми различных доноров (то есть, допускается только одна положительная реакция при использовании клеток от восьми доноров). Если источник моноцитов представляет собой клетки, объединенные от ряда индивидуальных доноров, испытуемое лекарственное средство должно выдерживать испытание с одним пулом клеток.

При использовании линии моноцитар-

ных клеток человека, испытуемое лекарственное средство должно выдерживать испытание с одним соответствующим пассажем клеток.

7.2. МЕТОД 2:

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

При испытании методом 2 проводят сравнение испытуемого лекарственного средства со стандартным образцом эндотоксина. Концентрация пирогена в испытуемом лекарственном средстве должна быть меньше предельного содержания пирогенов. Для принятия решения о соответствии испытания используют раствор А, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа.

7.2.1. Процедура испытания

Используя валидированную методику испытания, готовят растворы, представленные в таблице 2.1.6.13.-2. Квалифицированные клетки культивируют с каждым из растворов в четырех повторностях.

7.2.2. Вычисления и обработка результатов

Все результаты, включаемые в анализ данных, должны быть связаны с клетками, для которых среднее значение откликов на растворы R_0 - R_4 увеличиваются в прогрессии. Среднее значение откликов на R_0 может быть равным среднему значению откликов на R_1 . Для каждого конкретного источника клеток, среднее значение откликов на раствор R_2 должно быть

Таблица 2.1.6.13.-1. – *Приготовление растворов для испытания*

Раствор	Раствор	Добавленный эндотоксин (МЕ/мл)	Число повторностей
A	испытуемый раствор / f	нет	4
B	испытуемый раствор / $2 \times f$	нет	4
C	испытуемый раствор / $4 \times f$	нет	4
AS	испытуемый раствор / f	середина калибровочной кривой (R_3)	4
BS	испытуемый раствор / $2 \times f$	середина калибровочной кривой (R_3)	4
CS	испытуемый раствор / $4 \times f$	середина калибровочной кривой (R_3)	4
R_0	апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	нет (отрицательный контроль)	4
R_1 - R_4	апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	4 концентрации раствора стандартного образца эндотоксина	4 каждой концентрации

Примечание.

f – разведение раствора.

Раствор А – раствор испытуемого лекарственного средства в наименьшем разведении f , при котором было проведено испытание на мешающие факторы, то есть наибольшая концентрация (наименьшее разведение), для которой открываемость эндотоксина находится в пределах от 50 % до 200 %.

Раствор В – двукратное разведение раствора А, не превышающее максимально допустимого разведения.

Раствор С – двукратное разведение раствора В, не превышающее максимально допустимого разведения.

Раствор AS – раствор А, содержащий стандартный образец эндотоксина в концентрации равной середине калибровочной кривой (R_3).

Раствор BS – раствор В, содержащий стандартный образец эндотоксина в концентрации равной середине калибровочной кривой (R_3).

Раствор CS – раствор С, содержащий стандартный образец эндотоксина в концентрации равной середине калибровочной кривой (R_3).

Раствор R_0 – отрицательный контроль.

Растворы R_1 - R_4 – растворы стандартного образца эндотоксина в концентрациях, использованных в испытании на мешающие факторы.

Таблица 2.1.6.13.-2. – *Приготовление растворов для испытания*

Раствор	Раствор	Добавленный эндотоксин (МЕ/мл)	Число повторностей
A	испытуемый раствор / f	нет	4
B	испытуемый раствор / f_1	нет	4
C	испытуемый раствор / f_2	нет	4
AS	испытуемый раствор / f	стандартный образец эндотоксина 2 × предел обнаружения для используемой системы	4
BS	испытуемый раствор / f_1	стандартный образец эндотоксина 2 × предел обнаружения для используемой системы	4
CS	испытуемый раствор / f_2	стандартный образец эндотоксина 2 × предел обнаружения для используемой системы	4
R ₀	апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	нет (отрицательный контроль)	4
R ₁	апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	стандартный образец эндотоксина 0,5 × предел обнаружения для используемой системы	4
R ₂	апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	стандартный образец эндотоксина 1 × предел обнаружения для используемой системы	4
R ₃	апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	стандартный образец эндотоксина 2 × предел обнаружения для используемой системы	4
R ₄	апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	стандартный образец эндотоксина 4 × предел обнаружения для используемой системы	4

Примечание.

f, f_1, f_2 – степень разведения раствора.

Раствор А – раствор испытуемого лекарственного средства в разведении f , при котором было проведено испытание на мешающие факторы.

Раствор В – раствор испытуемого лекарственного средства в разведении f_1 не превышающем максимально допустимого разведения, выбранном после рассмотрения данных, полученных при валидации методики в отношении конкретного лекарственного средства, например 1:2 × максимально допустимое разведение (то есть, разведение в два раза меньше, чем максимально допустимое разведение).

Раствор С – раствор испытуемого лекарственного средства в разведении f_2 не превышающем максимально допустимого разведения, выбранном после рассмотрения данных, полученных при валидации методики в отношении конкретного лекарственного средства, например максимально допустимого разведения.

Раствор AS – раствор А с добавлением стандартного образца эндотоксина в концентрации 2 × расчетный предел обнаружения для используемой системы (как определено в предварительном испытании).

Раствор BS – раствор В с добавлением стандартного образца эндотоксина в концентрации 2 × расчетный предел обнаружения для используемой системы.

Раствор CS – раствор С с добавлением стандартного образца эндотоксина в концентрации 2 × расчетный предел обнаружения для используемой системы.

Раствор R₀ – отрицательный контроль.

Раствор R₁ – стандартный образец эндотоксина в концентрации 0,5 × расчетный предел обнаружения для используемой системы.

Раствор R₂ – стандартный образец эндотоксина в концентрации 1 × расчетный предел обнаружения для используемой системы.

Раствор R₃ – стандартный образец эндотоксина в концентрации 2 × расчетный предел обнаружения для используемой системы.

Раствор R₄ – стандартный образец эндотоксина в концентрации 4 × расчетный предел обнаружения для используемой системы.

больше положительного предельного значения. Результаты ниже этого положительного предельного значения рассматриваются как отрицательный отклик. Если среднее значение ответных реакций на R_1 или R_2 превышает предельное значение, то отклик на раствор, выбранный для оценки соответствия или несоответствия лекарственного средства требованиям, должен быть отрицательным (лекарственное средство выдерживает испытание).

Для определения открываемости (%) добавки для каждого отрицательного раствора испытуемого лекарственного средства (А, В и С) сравнивают среднее значение отклика соответствующих растворов с добавленным стандартным образцом эндотоксина (AS, BS или CS, соответственно) со средним значением отклика раствора R_3 .

Если раствор испытуемого лекарственного средства, выбранный для оценки соответствия или несоответствия, и все разведения ниже его дают отрицательные результаты и определяемая концентрация добавленного стандартного образца эндотоксина находится в диапазоне от 50 % до 200 %, то концентрация пирогенного вещества в испытуемом лекарственном средстве меньше предельного содержания пирогенов для данного источника клеток.

7.2.3. Критерии соответствия или несоответствия лекарственного средства

Критерии те же, что и для Метода 1 (см. раздел 7.1.3 данной общей фармакопейной статьи).

7.3. МЕТОД 3: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ С КОНТРОЛЬНОЙ СЕРИЕЙ

При испытании методом 3 проводится сравнение испытуемого лекарственного средства с валидированной серией этого лекарственного средства, выбранной в качестве контрольной. Тип анализа, выбранный для их сравнения, должен быть обоснован и подтвержден для каждого лекарственного средства и должен включать критерии приемлемости. Контрольная серия также выбирается в соответствии с обоснованными и утвержденными критериями. Данное испытание предназначено для случаев, когда испытуемое лекарственное средство оказывает заметное мешающее действие, но не может быть разведено в диапазоне максимально допустимого разведения для его устранения, или предпо-

лагается, что лекарственное средство содержит неэндотоксиновые пирогены.

Реакции на неэндотоксиновые пирогены могут быть более быстрыми и выраженными, чем реакции на эндотоксины, что делает необходимым выполнение испытания в диапазоне разведений, включающем минимальное разведение. Процедура испытания описана в разделе 7.3.1 данной общей фармакопейной статьи и включает пример анализа, используемого для сравнения испытуемой серии с контрольной серией.

7.3.1. Процедура испытания

Используя валидированную методику испытания, готовят растворы, представленные в таблице 2.1.6.13.-3. Квалифицированные клетки культивируют с каждым из растворов в четырех повторностях.

7.3.2. Вычисления и обработка результатов

Все результаты, включаемые в обработку данных, должны быть получены на клетках, у которых раствор G и хотя бы один из растворов А, В и С вызывал ответную реакцию, превышающую минимальный уровень высвобождения выбранного маркера (раствор R_0). Для каждого конкретного источника клеток, например, индивидуального донора, пула доноров или клеточной линии, используют кривую «доза – ответ» для маркера (калибровочная кривая в двух повторностях с отрицательным контролем и не менее 4 разведений стандарта маркера в геометрической прогрессии) и вычисляют среднюю величину реакций на растворы А–F.

Суммируют средние ответные реакции на растворы А, В и С и средние ответные реакции на растворы D, E и F. Делят сумму средних ответов на растворы D, E и F на сумму средних ответов на растворы А, В и С. Испытуемое лекарственное средство отвечает требованиям испытания для данного источника клеток, если полученное значение не превышает установленное значение критерия приемлемости, например 2,5.

7.3.3. Критерии соответствия или несоответствия лекарственного средства

Критерии те же, что и для метода 1 (см. раздел 7.1.3 данной общей фармакопейной статьи).

Для более точного количественного определения уровня контаминации методы 1, 2 и 3 могут выполняться с использованием других разведений раствора испытуемого лекарственного средства, не превышающих максимально допустимого разведения.

Следующий раздел приводится
для информации

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

1. ВВЕДЕНИЕ

Испытание на активацию моноцитов в первую очередь предназначено для использования в качестве замены испытания на *Пирогенность*. Испытание на активацию моноцитов позволяет обнаруживать пирогенные и провоспалительные вещества: эндотоксины грамотрицательных бактерий и пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, включая патоген-ассоциированные молекулярные паттерны грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов и грибов; химические вещества, характерные для лекарственного средства и/или образующиеся в процессе производства. Пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов, представляют собой молекулы с разнообразными физико-химическими характеристиками, и обычно природа пирогена, присутствующего в испытуемом лекарственном средстве, неиз-

вестна. Уровень содержания неэндотоксиновых пирогенов выражается или в эквиваленте единиц эндотоксина, полученным путем сравнения со стандартом эндотоксина или с серией испытуемого лекарственного средства, утвержденной в качестве контрольной.

В испытании на активацию моноцитов концентрации маркеров, образующихся в результате реакции на стандарт эндотоксина, обычно разводят приблизительно в 10 раз (на 1 lg) и при испытании лекарственных средств, содержащих неэндотоксиновые пирогены (только неэндотоксиновые пирогены или в комбинации с эндотоксинами), при определении их способности стимулировать моноциты часто получают очень крутые кривые «доза – ответ» (обычно лишь в диапазоне 1 или 2 степеней разведений). Чаще всего наибольшие ответные реакции на такие лекарственные средства получают при использовании неразведенных растворов или небольших разведений испытуемых лекарственных средств. По этой причине испытуемые растворы лекарственных средств, которые содержат или могут содержать неэндотоксиновые пирогены, должны испытывать-

Таблица 2.1.6.13.-3. – *Приготовление растворов для испытания*

Раствор	Раствор/степень разведения	Число повторностей
A	раствор контрольной серии / f_1	4
B	раствор контрольной серии / f_2	4
C	раствор контрольной серии / f_3	4
D	раствор контрольной серии / f_1	4
E	раствор испытуемого лекарственного средства / f_2	4
F	раствор испытуемого лекарственного средства / f_3	4
G	положительный контроль (стандартный образец эндотоксина)	4
R ₀	растворитель (отрицательный контроль)	4

Примечание.

f, f_1, f_2 – степень разведения раствора.

Растворы A, B и C – разведения контрольной серии в степенях разведения f_1, f_2 и f_3 определенных в испытании на мешающие факторы.

Растворы D, E и F – разведения испытуемого лекарственного средства в степенях разведения f_1, f_2 и f_3 определенных для контрольной серии в испытании на мешающие факторы.

Раствор G – положительный контроль жизнеспособности клеток; представляет собой раствор стандартного образца эндотоксина в концентрации, при которой наблюдается однозначная положительная реакция.

Раствор R₀ – растворитель, используемый для разведения испытуемого лекарственного средства; отрицательный контроль.

ся в диапазоне разведений, который включает минимальное разведение.

2. МЕТОДЫ

2.1. Информация относительно выбора методов

Методы 1, 2 и 3 обычно не применяют в случаях, когда испытуемое лекарственное средство может активировать высвобождение выбранного маркера, или когда одной из примесей в испытуемом лекарственном средстве является выбранный маркер. В обоих случаях эти обстоятельства должны привести к модификации и валидации выбранного метода.

Предполагается, что при валидации выбранного метода в отношении маркера будут определены:

- частота отсутствия реакции на соответствующую комбинацию лекарственного средства с пирогенными примесями;
- выбор мер по обеспечению надежности результатов испытаний, например, скрининг доноров, увеличение числа доноров, у которых получают клетки для каждого испытания;
- установление достаточно строгих критериев соответствия или несоответствия для максимального увеличения вероятности обнаружения серий лекарственных средств, содержащих существенное количество пирогенов.

Метод 1 подходит для испытания, если результаты различных разведений (эквивалент эндотоксина на миллилитр) показывают, что кривая «доза – ответ» параллельна калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина.

Метод 2 является полуколичественным испытанием, который можно применять, когда ответные реакции на разведения испытуемого лекарственного средства не параллельны ответным реакциям на разведения стандартного образца эндотоксина.

Метод 3 – сравнительное испытание с контрольной серией испытуемого лекарственного средства. Метод 3 подходит для случаев со значительной индивидуальной вариабельностью реакций донорских клеток на определенные комбинации лекарственных средств с пирогенами. Следует отметить, что реакция моноцитов большинства доноров на бактериальный эндотоксин приблизительно одинакова, тогда как реакции моноцитов отдельных доноров на неэндотоксиновые пирогены могут существенно различаться, что позволяет идентифицировать клетки «не реагирующие на неэндотоксиновые

пирогены» и клетки со «слабой» и «сильной» реакцией на определенные комбинации лекарственных средств и пирогенных веществ.

2.2. Вычисление предельной концентрации пирогена

Критерием приемлемости для принятия решения о соответствии или несоответствии является предельное содержание пирогена, которое выражается в эквивалентах эндотоксина на миллиграмм или миллилитр или на единицы биологической активности испытуемого лекарственного средства. Если предельное содержание эндотоксина для лекарственного средства установлено, то предельное содержание пирогена будет равно предельному содержанию эндотоксина, при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье. Предельное содержание пирогена выражают в эквивалентах эндотоксина и рассчитывают по формуле:

$$\text{ПСП} = \frac{K}{M}$$

- где: K — предельная пирогенная доза бактериального эндотоксина из расчета на килограмм массы тела;
- M — максимальная разовая доза испытуемого лекарственного препарата из расчета на килограмм массы тела.

В случае введения лекарственного препарата через частые интервалы или инфузионно, в качестве « M » используют общую максимальную дозу, вводимую в течение одного часа.

Предельное содержание пирогена зависит от лекарственного препарата, пути его введения и представлено в некоторых частных фармакопейных статьях.

Значения для предельной пирогенной дозы бактериального эндотоксина на килограмм массы тела (K) приведены в таблице 2.1.6.13.-4.

2.3. Информация относительно криоконсервантов

Следует учитывать воздействие криоконсервантов, например диметилсульфоксида (ДМСО), и их остаточных количеств на размороженные клетки: ДМСО обладает токсичностью и может изменять свойства клеток, в частности, проницаемость клеточных мембран, даже после тщательной отмывки размороженной клеточной взвеси.

2.4. Испытание на мешающие факторы

В случаях, когда это практически осуществимо, проводят испытание на мешающие факторы по крайней мере трех различных серий

испытуемого лекарственного средства. Испытуемые лекарственные средства, у которых отмечается значительная вариабельность реакций от серии к серии, должны подвергаться испытанию на мешающие факторы в рамках каждого индивидуального испытания, то есть сопутствующей валидации.

Испытание на мешающие факторы в большинстве случаев выполняют на сериях испытуемого лекарственного средства, которые не содержат эндотоксинов и других пирогенов, но, если это невозможно, на сериях с минимальным содержанием пирогенов. Если имеется только одна серия испытуемого лекарственного средства, валидация должна выполняться на этой серии в трех независимых испытаниях. Должны выполняться параметры прецизионности для воспроизводимости, например $\pm 50\%$.

2.5. Перекрестная валидация

В общей фармакопейной статье 2.1.6.21. *Применение испытания на бактериальные эндотоксины* указано, что испытание на активацию моноцитов следует проводить для лекарственных средств, где нельзя исключить присутствие неэндотоксиновых пирогенов. Исходя из этого, рекомендуется проводить эксперименты перекрестной валидации испытаний на активацию моноцитов вместе с экспериментами испытаний на бактериальные эндотоксины, используя те же три серии. В случае изменения критических параметров процесса перекрестная валидация должна быть повторена на трех сериях, поскольку потенциальное загрязнение неэндотоксиновыми пирогенами не может быть исключено.

Испытание на присутствие пирогенов проводимое на кроликах (2.1.6.2) должно выполнять только для перекрестной валидации, если ни один из методов испытания на активацию моноцитов (метод 1, метод 2 или метод 3) не

может быть подтвержден для определенного лекарственного средства.

3. ЗАМЕНА ИСПЫТАНИЯ ПИРОГЕННОСТЬ НА ИСПЫТАНИЕ НА АКТИВАЦИЮ МОНОЦИТОВ

Испытание на активацию моноцитов прежде всего, предназначено для использования в качестве замены испытания пирогенность на кроликах. Частные фармакопейные статьи могут содержать требования проведения испытания на бактериальные эндотоксины, пирогенность или испытание на активацию моноцитов.

Общие принципы:

– в любой частной фармакопейной статье, при наличии требований к содержанию пирогенных веществ, указывается только одно испытание: испытание на бактериальные эндотоксины, пирогенность или испытание на активацию моноцитов. Перед включением испытания на активацию моноцитов в частную фармакопейную статью требуется подтверждение пригодности одного из трех методов, указанных в общей фармакопейной статье 2.1.6.13. *Испытание на активацию моноцитов*, для оценки лекарственного средства, являющегося предметом данной частной фармакопейной статьи;

– необходимая информация предоставляется производителями.

Производителям предлагается предоставить любые подтверждающие данные, относящиеся к применимости испытания на активацию моноцитов для контроля активных фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Такие данные включают подробное описание приготовления образцов и любых процедур по удалению мешающих факторов. Дополнительно требуются любые доступные данные по параллельному испытанию продукта на *Пиро-*

Таблица 2.1.6.13.-4. – *Пределные пирогенные дозы бактериального эндотоксина*

Путь введения	К
внутривенный	5,0 МЕ эндотоксина на килограмм массы тела, МЕ/кг
внутривенный, для радиофармацевтических лекарственных препаратов	2,5 МЕ эндотоксина на килограмм массы тела, МЕ/кг
интратекальный	0,2 МЕ эндотоксина на килограмм массы тела, МЕ/кг
парентеральный, для лекарственных препаратов вводимых в дозе, рассчитываемой на квадратный метр поверхности тела	100 МЕ эндотоксина на квадратный метр поверхности тела, МЕ/м ²

генность, обосновывающие целесообразность замены испытания на пирогенность на испытание на активацию моноцитов.

4. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МЕТОДИК

Замена испытания *Пирогенность* или метода определения провоспалительных или пирогенных веществ на другой метод должны рассматриваться как использование альтернативной методики при замене фармакопейного метода согласно требованиям, представленным в разделе 1. *Общие сведения* Фармакопеи Союза.

Для валидации методики испытания на активацию моноцитов, отличной от описанной в общей фармакопейной статье, предполагается соблюдение следующих требований:

- процедура, материалы и реактивы, используемые в испытании, должны быть валидированы в соответствии с рекомендациями для данного испытания;
- испытание на присутствие мешающих факторов (и, если необходимо, процедура по их устранению) выполняется на образцах не менее трех производственных серий.

201060014-2023

2.1.6.14. МИКОБАКТЕРИИ

Общая фармакопейная статья распространяется на метод определения микобактерий.

Если испытуемый образец может содержать микроорганизмы, отличные от микобактерий, его обрабатывают подходящим деконтаминирующим раствором, например, раствором ацетилцистеина и натрия гидроксида или раствором натрия лаурилсульфата.

На каждую из двух подходящих твердых питательных сред (например, среда Левенштейна-Йенсена или среда Миддлбрук 7H10) инокулируют по 0,2 мл испытуемого образца. Испытание выполняют в трех повторностях. В подходящую жидкую питательную среду также в трех повторностях инокулируют по 0,5 мл испытуемого образца. Все среды инкубируют при температуре 37 °С в течение 56 сут.

Определяют способность среды обеспечить рост микобактерий в присутствии испытуемого образца путем инокуляции подходящего штамма семейства *Mycobacteriaceae*, например,

БЦЖ, и, при необходимости, используют подходящий нейтрализующий агент.

Если в течение первых восьми суток инкубации наблюдают рост посторонних микроорганизмов, испытание повторяют с одновременным проведением испытания на бактериологическую стерильность.

Испытуемый образец выдерживает испытание, если в конце инкубационного периода ни в одной из пробирок не наблюдают рост микобактерий.

201060015-2023

2.1.6.15. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммунохимические методы основаны на селективном, обратимом и нековалентном связывании антигенов антителами. Данные методы используют для обнаружения или количественного определения как антигенов, так и антител. Комплекс антиген-антитело можно идентифицировать и количественно определить различными методами. Положения общей фармакопейной статьи относятся к иммунохимическим методам с использованием реактивов с меткой или без метки.

Результаты, получаемые иммунохимическими методами, зависят от экспериментальных условий, характера и качества используемых реактивов. Важно стандартизировать компоненты иммунохимического анализа и по возможности использовать для количественных определений международные стандартные образцы.

Для проведения иммунохимических исследований обычно используют коммерчески доступные наборы, включающие реактивы (в частности, антиген или антитело) и материалы, предназначенные для оценки *in vitro* конкретной субстанции, а также инструкции по их применению. Наборы используют в соответствии с инструкциями производителя. Перед использованием необходимо убедиться, что селективность и чувствительность наборов являются подходящими для анализа конкретной субстанции.

Общая фармакопейная статья включает также следующее понятие:

набор (реактивов) – комплект специально подобранных реактивов, составных частей и инструкций по проведению анализа, предназначенный для определения *in vitro* одного кон-

кретного вещества, возбудителя (или активности фермента), нескольких конкретных веществ, возбудителей (или суммарной активности ферментов), а также для детекции участка генома. Совокупность компонентов, которые упакованы вместе и предназначены для выполнения специфического исследования *in vitro*. Компоненты набора реактивов могут включать в себя реактивы (антитела, ферменты, буферные и питательные растворы, разбавители), калибраторы, контрольные материалы и другие материалы.

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНОГО АНТИГЕНА ИЛИ АНТИТЕЛА

В методах с использованием меченых антигенов или антител могут применяться различные метки, например, ферментные, флуоресцентные, люминесцентные и радиоизотопные.

При использовании в качестве метки радиоизотопа метод называют радиоиммунным. Рекомендации по измерению радиоактивности, приведенные в общей фармакопейной статье 2.3.20.2. *Радиофармацевтические лекарственные препараты*, подходят также и для иммунологических методов с использованием радиоизотопов. Все работы с радиоактивными материалами должны выполняться в соответствии с законодательством государств – членом Союза и международными документами по защите от радиационной опасности.

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕМЕЧЕНОГО АНТИГЕНА ИЛИ АНТИТЕЛА

МЕТОДЫ ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ

Методы иммунопреципитации включают флоркуляцию и преципитацию. При смешивании раствора антигена с соответствующим антителом в определенных условиях образуются флоркулирующие или преципитирующие агрегаты. Соотношение концентраций реактивов, обеспечивающее наименьшее время флоркуляции или наиболее выраженную преципитацию, называют оптимальным соотношением. Такое соотношение обычно получают при смешивании антигенов и антител в эквивалентных количествах. Иммунопреципитацию оценивают визуально или с помощью методов светорассеяния (нефелометрия или турбидиметрия). Для повышения

чувствительности в качестве реактивов можно использовать частицы (например, из латекса), покрытые антигенами или антителами.

В методах флоркуляции обычно используют пошаговое разведение одного из реактивов, а в методах иммунодиффузии разведение происходит в процессе диффузии в гель и таким образом достигают градиента концентраций одного или обоих реактантов. При этом в геле образуются зоны с соотношением реактантов, оптимальным для преципитации. Постановку реакции флоркуляции выполняют в пробирках, тогда как в методах иммунодиффузии используют различные носители: пробирки, планшеты, предметные стекла, ячейки или камеры.

Системы иммунопреципитации могут быть простыми, комплексными и множественными. Простая система состоит из одного антигена в сочетании с соответствующим антителом; комплексная – из родственных, но серологически неидентичных реактантов, множественная – из нескольких серологически неродственных реактантов.

В *методах простой диффузии* градиент концентрации устанавливают только для одного реактанта, диффундирующего из внешнего источника в гель, который содержит соответствующий реактант в сравнительно низкой концентрации.

Простая (одиночная, радиальная) иммунодиффузия – количественный метод, при котором антиген (антитело), диффундируя в гель, образует кольцо преципитации с соответствующим ему антителом (антигеном). При достижении равновесия между антигеном и антителом, площадь образовавшегося кольца преципитации прямо пропорциональна содержанию антигена (антитела) и обратно пропорциональна содержанию антитела (антигена) в геле.

В *методах двойной диффузии* градиенты концентрации устанавливают для обоих реактантов. И антиген, и антитело из различных участков диффундируют в первоначально иммунологически нейтральный гель.

Методы сравнительной двойной диффузии используют для качественного сравнения различных антигенов по отношению к подходящему антителу или наоборот. Сравнение основано на наличии или отсутствии взаимодействия между компонентами преципитации. Реакции идентичности, неидентичности и частичной идентичности антигенов (антител) могут быть различными.

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммуноэлектрофорез (ИЭ) – качественный метод, сочетающий гель-электрофорез с последующей иммунодиффузией.

Перекрестный иммуноэлектрофорез является модификацией метода иммуноэлектрофореза и подходит как для количественного, так и качественного анализа. Первая часть метода представляет собой гель-электрофорез, после которого продольные полоски геля, содержащие разделенные фракции, вырезают и переносят на другую пластину. Электрофорез во втором направлении проводят перпендикулярно к предыдущему электрофоретическому процессу в геле, содержащем сравнительно низкие концентрации антител, соответствующих антигену. Зависимость между площадью пиков преципитации и количеством соответствующего антигена является линейной для данной концентрации антитела и толщины геля.

Электроиммунный анализ, часто называемый *ракетным иммуноэлектрофорезом*, является быстрым методом количественного определения антигенов с зарядом, отличным от заряда антител, и наоборот. Электрофорез определяемого антигена выполняют в геле, содержащем относительно низкие концентрации соответствующих антител. Испытуемый образец и разведения стандартного антигена, используемые для калибровки, вносят в разные лунки в геле. В процессе электрофореза образуются мигрирующие зоны преципитации в виде пиков, которые увеличиваются до тех пор, пока сохраняется избыток соответствующего антигена. Для данной концентрации антител зависимость между высотой пика преципитации и количеством антигена является линейной.

Встречный иммуноэлектрофорез – быстрый метод количественного определения, при котором градиент концентрации устанавливается между вносимыми антителом и антигеном в зависимости от заряда под действием постоянного электрического поля. Стандартные растворы для калибровки и разведения испытуемого образца вносят в лунки одного ряда в геле, а в лунки противоположного ряда вносят разведения соответствующего реактанта с известной концентрацией. Титром испытуемого образца считают наибольшее разведение, при котором образуется линия преципитации.

Существует ряд модификаций методов перекрестного иммуноэлектрофореза и электроиммунного анализа.

Другие методы сочетают разделение антигенов по размеру молекул и серологическим свойствам.

ОБНАРУЖЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ

Выявление и характеристику линий иммунопреципитации выполняют путем селективного или неселективного окрашивания с использованием флуоресцентных, ферментных или изотопных меток или другими подходящими методами. Методы селективного окрашивания в преципитатах обычно используют для определения характеристик веществ небелковой природы.

При подходящей концентрации каждого из реактантов в полупрозрачных гелях, например, агаре или агарозе, линии преципитации четко различимы невооруженным глазом.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

КРИТЕРИИ ВАЛИДАЦИИ

Методики считаются приемлемыми, если:

- антитело и антиген не имеют существенных отличий в стандартном и испытуемом образцах. В случае меченых реактивов различия между меченым и немеченым компонентами соответствующего реактива незначительны;
- на результат испытания не оказывает влияния матрица (любой компонент испытуемого образца или вспомогательные вещества, которые могут быть различными в разных образцах);
- результат количественного определения не выходит за пределы критериев приемлемости, указанных в частной фармакопейной статье;
- прецизионность количественного определения достаточна для выполнения требований, указанных в частной фармакопейной статье;
- порядок выполнения количественного определения не увеличивает систематические ошибки.

МЕТОДИКИ ВАЛИДАЦИИ

Для подтверждения соответствия критериям приемлемости валидация должна включать:

- проведение испытания в не менее трех повторностях;
- проведение испытания не менее чем на трех различных разведениях стандартных образцов и трех разведениях испытуемых образ-

цов, предполагаемая активность которых равна активности стандартного образца;

- использование рандомизации;
- приготовление стандартного образца аналогичным образом, если испытуемый образец находится в сыворотке или в смеси с другими компонентами;
- измерение неспецифического связывания меченого реактанта;
- для заместительного иммунного анализа:
- определение максимального связывания (нулевое замещение);
- использование разведений, охватывающих весь диапазон откликов от значений, близких к неспецифическому связыванию, до значений максимального связывания как для стандартных образцов, так и испытуемого образца.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА

Для анализа результатов испытаний могут быть использованы методы, представленные в общей фармакопейной статье 2.3.12.0. *Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств*.

Существенное отклонение от параллелизма указывает на то, что между антителом и антигеном в испытуемом и стандартном образцах имеются различия, и результаты испытания являются незначимыми.

Для заместительного иммунологического анализа не должно быть существенных различий между значениями неспецифического связывания и максимального замещения при высокой концентрации испытуемого и стандартного образцов. Различия могут указывать на наличие эффектов, обусловленных матрицей, ингибированием связывания или разложением метки.

201060016-2023

2.1.6.16. ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

Принцип проточной цитометрии (цитофлуориметрии) заключается в многопараметрическом исследовании оптических свойств отдельных частиц в проточной жидкой системе.

Клетки или частицы в суспензии индивидуально распределяются в линейном потоке, протекающем через измерительное устройство.

Для проведения анализа плотные ткани необходимо преобразовать в суспензию отдельных клеток.

С помощью проточной цитометрии определяют широкий спектр параметров: объем и морфологическую структуру клеток, клеточные пигменты, содержание ДНК и РНК, белки, поверхностные клеточные маркеры, внутриклеточные маркеры, ферментативную активность, значение рН, состояние мембраны, текучесть и т.д.

Проточная цитометрия позволяет определять для каждой отдельной клетки два морфологических параметра и один или более сигналов флуоресценции. Многопараметрический анализ позволяет определить фенотип клеточной популяции.

ПРИБОР

Фокусировка, усиление сигнала и выбор источника света должны быть оптимизированы для автоматического обнаружения и измерения морфологических различий и особенностей окрашивания. При выполнении метода проточной цитометрии проводят:

- выбор источника света в зависимости от параметров, которые будут проанализированы;
- настройку цитометра в зависимости от типа анализируемых клеток (например, клеточные культуры, лейкоциты, тромбоциты, бактерии, сперматозоиды, дрожжи) и целей анализа (например, фенотипирование, определение клеточного цикла, апоптоза, цитокинов, мембранной текучести, флуоресцентного белка).

Для проточной цитометрии характерно автоматизированное количественное определение ряда заданных параметров для большого числа единичных клеток в течение каждого анализа. Например, 100 000 частиц или более (фактически неограниченное количество) анализируются одна за другой, как правило, приблизительно в течение 1 мин. Предел обнаружения составляет 100 флуоресцентных молекул на клетку.

Прибор для проточной цитометрии (проточный цитометр, проточный цитофлуориметр) имеет пять основных блоков:

- система подачи растворов и проточная ячейка;
- источник света;
- система обнаружения (детектирование сигнала) и система аналого-цифрового преобразования;

- система усиления (амплификации);
- компьютер с программным обеспечением для анализа сигналов.

СИСТЕМА ПОДАЧИ РАСТВОРОВ И ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА

С помощью системы подачи растворов клетки переносят в проточную ячейку, где они под воздействием обжимающей жидкости распределяются в линию по одному за счет гидродинамического фокусирования (поток в потоке) и пересекают пучок световых лучей. Детектирование клеток в канале проточной ячейки, через который проходят клетки, происходит с помощью луча света, сфокусированного в эллипсоидном пространстве двумя конфокальными линзами. Для подсчета поверхностных клеточных маркеров скорость потока во время анализа должна быть постоянной и обеспечивать подходящее расстояние между клетками.

ИСТОЧНИКИ СВЕТА

Наиболее часто используют следующие источники света:

- лампы (ртутная, ксеноновая);
- лазеры большой мощности, охлаждаемые водой (аргоновый, криптоновый, лазер на красителях);
- лазеры низкой мощности, охлаждаемые воздухом (аргоновый (488 нм), красный гелий-неоновый (633 нм), зеленый гелий-неоновый, гелий-кадмиевый (ультрафиолетовый));
- полупроводниковые (диодные) лазеры (синий, зеленый, красный, фиолетовый).

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ СИГНАЛА

Когда частица проходит через пучок света, она рассеивает часть света во всех направлениях. Флуоресцентные красители, добавленные к частице, испускают свой собственный свет (флуоресценцию), которая также излучается во всех направлениях. Таким образом, генерируются два типа сигнала: рассеяние света и эмиссия флуоресценции.

Световые датчики прибора фокусируют часть этого рассеянного света и флуоресценции и преобразуют в электрические импульсы пропорционально количеству собранного света.

Светорассеяние

Измеряют 2 параметра:

- прямое рассеяние;
- боковое рассеяние, под углом 90° к направлению пучка света.

Прямое светорассеяние коррелирует с объемом клетки, в то время как боковое светорассеяние, связанное с такими параметрами, как форма ядра, количество и тип цитоплазматических гранул или шероховатость мембран, коррелирует с морфологическим строением клетки. С возрастом сложности клеточной структуры, интенсивность бокового светорассеяния также возрастает.

Сигналы светорассеяния, являющиеся функцией морфологических характеристик клеток и определяющиеся как базовые параметры, при анализе с помощью проточной цитометрии будут генерироваться всегда.

Флуоресценция

При прохождении частиц через лазерный луч, они будут испускать определенный флуоресцентный свет, в зависимости от типа и количества источников света. Излучение флуоресцентных сигналов происходит благодаря флуоресцентным красителям, естественно находящимся в клетках (например, коферменты, хлорофилл, пигменты морской водоросли), и (или) флуоресцентным зондам, использованным для маркировки клеток для определения специфических характеристик (например, флуоресцирующие антитела, красители нуклеиновых кислот, рН-метки и кальций-зависимые метки, флуоресцирующие белки). Каждая флуоресцентная метка характеризуется индивидуальным спектром возбуждения и спектром эмиссии, ее выбирают в зависимости от природы источника возбуждения, системы обнаружения и специфической цели анализа. Оптические фильтры должны соответствовать используемому флуорофору.

УПРАВЛЕНИЕ СИГНАЛОМ И АНАЛОГО-ЦИФРОВОЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕ

Сигналы светорассеяния и флуоресценции, испускаемые клетками при прохождении через лазерный луч, разделяются и направляются к детекторам с помощью оптических фильтров. Детекторы являются трансдукторами (фотоэлектронными умножителями), которые преобразуют световое излучение, генерируемое клетками, в импульсы напряжения.

Процесс подсчета каждого импульса в соответствующем канале является аналого-цифровым преобразованием. Процесс отображается графически в виде частотной гистограммы.

Усиление (амплификация)

Для оптимальной визуализации импульсы напряжения должны быть усилены. Процесс усиления подчеркивает различия между сигналами клетки и, следовательно, увеличивает разрешение между популяциями клеток с различными характеристиками (например, отличие жизнеспособных от нежизнеспособных клеток, или неспецифической флуоресценции от антиген-специфической флуоресценции после окрашивания мечеными моноклональными антителами).

Есть два метода усиления сигнала: линейный и логарифмический. Выбор между двумя типами делают для каждого отдельного сигнала в соответствии с морфологическими характеристиками клеток и используемыми красителями (например, флуоресцентно-меченые моноклональные антитела, красители нуклеиновой кислоты).

Линейное усиление увеличивает различия среди интенсивных импульсов, то есть используется с теми параметрами, которые производят сигналы высокой интенсивности, например:

- параметры светорассеяния клетки;
- флуоресценция красителей нуклеиновых кислот при изучении клеточного цикла.

Логарифмическое усиление, напротив, предназначено для слабых импульсов и параметров или аналитических условий, которые могут произвестись как слабый, так и сильный импульс, например:

- антигены клетки;
- светорассеяние от тромбоцитов, бактерий, дрожжей;
- флуоресценция от красителей нуклеиновых кислот при исследовании апоптоза.

Компенсация сигналов флуоресценции

У каждого флуоресцирующего красителя есть определенный спектр поглощения и спектр эмиссии. При использовании для окрашивания клеток двух или более флуоресцентных меток одновременно (например, иммунное фенотипирование по четырем антигенам), спектры эмиссии флуорофоров могут перекрываться. Как следствие, каждый детектор флуоресценции регистрирует как определенную флуоресцентную метку, так и какое-то количество света, излучаемого другими флуоресцентными метками. Это может привести к завышению сигнала и плохому разделению популяций клеток.

Использование электронной матрицы позволяет селективно разделять перекрестные сигналы после их улавливания детектором (компенсация флуоресценции).

Для компенсации флуоресценции требуется использование калибраторов флуоресценции, при этом предпочтительно использование положительных образцов клеток, меченных необходимыми флуорофорами, присоединенными тем же способом, что и к антителам, используемым для анализа.

ОТОБРАЖЕНИЕ СИГНАЛОВ

После усиления и компенсации сигналы отображаются в виде двух- или трехмерных гистограмм. Гистограммы показывают зависимость интенсивности сигнала от количества событий для данного параметра. Гистограммы, в которых каждая точка представляет клетку, основаны на комбинации двух сигналов (двухмерные точечные диаграммы с двумя параметрами). Тип и число распределений и комбинаций сигналов выбирают в зависимости от образцов клеток и использованных меток. При анализе полученных данных программное обеспечение для точной цитометрии может также генерировать и другие виды графических изображений (такие как накладывания, поверхностные гистограммы, томограммы (срезовые гистограммы), контурные гистограммы, гистограммы плотности или интенсивности, накладывающиеся гистограммы). Также могут быть использованы статистические данные, такие как средние интенсивности флуоресценции (и их изменения по времени или в зависимости от функции клетки).

АНАЛИЗ ДАННЫХ

Клеточная суспензия для испытания может содержать различные виды объектов, некоторые из которых нежелательны (такие как нежизнеспособные клетки, фрагменты клеток или макроагрегаты) или просто не являются целью анализа (например, гранулоциты при изучении лимфоцитов). Это зависит от типа образца (цельная кровь, костный мозг, клеточные культуры, биологические жидкости, клеточные суспензии из плотных тканей) и процедуры обработки (например, методы окрашивания, лизиса (эритроцитов), фиксации, криоконсервирования, размораживания, депарафинирования).

Как следствие, не все сигналы, генерируемые во время анализа, принадлежат изучаемым клеткам. Для исключения нежелательных и несоответствующих сигналов применяют два подхода.

Первый подход, который применяют в процессе накопления данных, представляет собой установление шумового порога для одного (или

более) существенного параметра (параметров). Данный подход регулирует включение в анализ только клеток, интенсивность сигнала которых выше, чем predetermined дискриминирующее (пороговое) значение для данного параметра. Параметр прямого светорассеяния чаще всего используют в качестве дискриминатора (фактора разделения) из-за его высокоинтенсивного сигнала с низким уровнем интерференции.

Второй подход, который применяют при анализе данных, заключается в процедуре гейтирования, ограничивая анализ только сигналами от тех популяций клеток, которые удовлетворяют определенным морфологическим и экспрессионным (по флуоресценции) профилям. Обычно используют 2 типа гейтирования. Первый тип основан на морфологии клеток. Клеточные популяции идентифицируют по их морфологическим характеристикам (определяемым с помощью прямого светорассеяния и бокового светорассеяния). Область гейтирования определяет границы представляющей интерес популяции (например, лимфоциты, жизнеспособные клетки), после чего графики флуоресценции отображаются только для выбранной области. Второй тип селекции сигнала основан на флуоресценции. Интересующую клеточную популяцию идентифицируют на основании интенсивности экспрессии антигена или красителя, затем определяют область гейтирования. Затем в рамках выбранной области строят графики флуоресценции. Соответствующее программное обеспечение позволяет создавать множественные области гейтирования, используя последовательный логический порядок. Это особенно информативно при изучении редких популяций клеток или при сортировке клеток.

КОНТРОЛИ

Внутренний контроль

Перед испытанием должна быть проведена настройка оптической системы с использованием подходящих флуоросфер, а также проверена стабильность проточной системы. По полученным данным формируют отчет и используют при проведении периодического контроля. Для доказательства того, что используемые в испытании антитела функциональны и позволяют надлежащим образом использовать проточный цитометр, применяют положительный контроль, в который должны быть включены образцы, из-

вестные как положительные для интересующего маркера.

Внешний контроль

Рекомендуется участвовать в межлабораторных испытаниях для подтверждения надежности полученных данных или проверки межлабораторной воспроизводимости.

201060017-2023

2.1.6.17. МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Методы амплификации нуклеиновых кислот основаны на следующих подходах:

- амплификация целевого фрагмента нуклеиновой кислоты с использованием, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР), лигазной цепной реакции (ЛЦР) или изотермической амплификации рибонуклеиновой кислоты (РНК);
- амплификация сигнала гибридизации с использованием, например, метода разветвленной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК); в этом случае амплификация сигнала достигается без повторяющихся циклов амплификации нуклеиновой кислоты.

В общей фармакопейной статье описаны требования к методам амплификации нуклеиновых кислот на примере типичного метода ПЦР для последующего детектирования амплифицированных фрагментов ДНК подходящим методом. Фрагменты РНК после обратной транскрипции в комплементарную ДНК и последующей амплификации полученного фрагмента ДНК могут быть детектированы подходящим методом.

Альтернативные методы амплификации нуклеиновых кислот могут применяться при условии, что они соответствуют требованиям к качеству испытаний, приведенным в данной общей фармакопейной статье.

Общая фармакопейная статья устанавливает требования к подготовке образца, амплификации *in vitro* фрагментов ДНК и детектированию специфического продукта ПЦР.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Типичная ПЦР представляет собой трехстадийную циклическую процедуру, позволяющую проводить *in vitro* амплификацию определен-

ных фрагментов ДНК или РНК (после обратной транскрипции в комплементарную ДНК).

Основные стадии амплификации ДНК включают:

– денатурацию двуцепочечной нуклеиновой кислоты (матричной ДНК, фрагментов ДНК), когда двуцепочечная ДНК под действием высокой температуры переходит в одноцепочечное состояние;

– специфический отжиг праймеров (синтетических олигонуклеотидов противоположной направленности, фланкирующих целевой участок ДНК) с комплементарным участком молекулы ДНК в подходящих реакционных условиях;

– элонгацию нуклеотидной цепи, комплементарной матричной, путем достраивания второй цепи ДНК с 3'-конца праймера под воздействием ДНК-полимеразы при подходящей температуре (синтез фрагментов ДНК).

В дальнейшем повторяющиеся стадии денатурации, специфического отжига и элонгации ведут к получению и накоплению амплифицируемого фрагмента, ограниченного праймерами с двух концов.

Специфический продукт ПЦР, называемый ампликоном, может быть детектирован различными методами соответствующей специфичности и чувствительности.

Мультиплексная ПЦР проводится с использованием нескольких пар праймеров, сконструированных для одновременной амплификации различных целевых фрагментов ДНК в одной реакции.

ИСПЫТУЕМЫЙ ОБРАЗЕЦ

В связи с высокой чувствительностью ПЦР испытуемые образцы должны быть оптимальным образом защищены от внешней контаминации нуклеиновыми кислотами и ампликонами. Отбор проб, хранение и транспортировку испытуемого образца производят в условиях, минимизирующих разрушение матричной ДНК. В случае проведения испытания по определению матричной РНК необходимо принять особые меры предосторожности ввиду высокой чувствительности РНК к деструктивному воздействию рибонуклеаз. Следует учитывать, что некоторые добавляемые реактивы, например, антикоагулянты или консерванты, могут оказывать влияние на ход определения.

МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЯ

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ

В связи с риском контаминации следует строго разграничивать рабочие зоны в зависимости от используемых материалов и применяемой технологии, учитывать передвижение персонала, использование средств индивидуальной защиты, перемещение материалов, подачу воздуха и процедуры деконтаминации.

При проведении испытания следует разделять такие зоны как:

– зона первичной подготовки (зона, в которой работы осуществляют только с материалами, не содержащими нуклеиновых кислот, способных быть матрицей, например, с праймерами, буферными растворами и др.);

– зона для пробоподготовки (зона, в которой осуществляют работу с реактивами, образцами и др.);

– зона ПЦР-амплификации (зона, в которой амплифицируемый материал обрабатывается в закрытой системе);

– зона детектирования (единственная зона, в которой операции с амплифицируемым материалом производятся в открытой системе).

В случае использования закрытой системы строгое разделение зон не обязательно.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для подготовки образцов к постановке ПЦР используют различные физико-химические процедуры экстракции и (или) обогащения. Подлежащая амплификации целевая ДНК должна быть экстрагирована или высвобождена из испытуемого материала таким образом, чтобы амплификация в выбранных реакционных условиях была осуществима. Используемая методика должна быть эффективной и воспроизводимой.

Добавки, присутствующие в испытуемом материале, могут оказывать влияние на ход ПЦР. Для контроля присутствия ингибиторов в испытуемом материале следует использовать образцы для внутреннего контроля, описанные в разделе *Контрольные образцы для проверки правильности хода испытания* данной общей фармакопейной статьи.

В случае РНК-матриц следует уделять внимание предотвращению проявления рибонуклеазной активности.

АМПЛИФИКАЦИЯ

Аmplификацию целевого фрагмента нуклеиновой кислоты методом ПЦР проводят при оптимальных для каждого цикла заданных условиях (температурный профиль для денатурации двуцепочечной ДНК, отжига и элонгации, время инкубации при выбранных температурах, скорость элонгации). Эти условия зависят от различных параметров, например:

- длины и состава праймера и целевого фрагмента;
- типа ДНК-полимеразы, состава буферной смеси и реакционного объема, используемых при амплификации;
- типа используемого устройства для амплификации и показателей теплопроводности между прибором, реакционной емкостью и реакционной смесью.

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Ампликон, образовавшийся в результате ПЦР, можно идентифицировать по размеру, последовательности нуклеотидов, химической модификации или комбинации этих параметров. Для обнаружения и определения размера фрагмента могут быть использованы методы гель-электрофореза (с использованием агарозного или полиакриламидного гелей или капиллярного электрофореза) или колоночной хроматографии (например, жидкостной хроматографии). Для обнаружения и определения характеристик последовательности нуклеотидов могут быть использованы специфическая гибридизация зондов, содержащих комплементарную мишень последовательность нуклеотидов, или расщепление амплифицированного материала, отражающее наличие мишень-специфических сайтов ферментативной рестрикции. Для обнаружения и определения характеристик химической модификации может быть использовано, например, введение в ампликоны флуорофора с дальнейшей детекцией флуоресценции, возникающей в результате возбуждения.

Детектирование ампликонов может быть достигнуто с помощью зондов, помеченных для последующего хемилюминесцентного, радиоизотопного или иммуноферментного детектирования.

ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат испытания является достоверным лишь при условии получения однозначно положительных результатов для образцов положительного контроля (контролей) и однозначно отрицательных результатов для образцов отрицательного контроля (контролей). В связи с исключительно высокой чувствительностью метода ПЦР и риском контаминации положительные результаты должны подтверждаться двукратным полным повторением процедуры испытания по возможности с новой аликвотой образца. Образец считается положительным, если хотя бы одно из двух повторных испытаний дает положительный результат.

При определении нуклеиновой кислоты, для которой установлен измеримый предел количественного определения, необходимо использовать методики для количественного определения.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИСПЫТАНИЯ

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ПЦР

Программа валидации должна включать квалификацию оборудования. Следует учитывать положения, изложенные в общей фармакопейной статье 2.3.14.0. *Валидация аналитических методик.*

Для валидации ПЦР-испытания применяют подходящие стандартные образцы предприятия, калиброванные относительно международных стандартных образцов целевой последовательности нуклеотидов, если применимо.

Определение наименьшего положительного значения

При валидации испытания должно быть установлено наименьшее положительное значение, определяемое как минимальное количество целевых матричных нуклеиновых кислот в объеме образца, которые могут быть обнаружены в 95 % испытаний. Наименьшее положительное значение зависит от таких взаимосвязанных факторов, как объем экстрагированного образца и эффективность методологии экстракции, транскрипция целевой РНК в комплементарную ДНК, процесс амплификации и детектирования.

При определении предела обнаружения системы следует учитывать наименьшие положительные значения для каждой целевой матричной нуклеиновой кислоты и результаты проведения испытания выше и ниже этих значений.

Системы для количественного определения

При валидации проводится оценка методики количественного определения по следующим характеристикам: правильность, прецизионность, специфичность, предел количественного определения, линейность, диапазон применения и устойчивость (робастность) аналитической методики.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕАКТИВОВ

Все реактивы, имеющие критическое значение для используемой методики, должны проходить контроль перед использованием в рутинных испытаниях. Их пригодность или непригодность должна основываться на заранее установленных критериях качества.

Праймеры являются важнейшими компонентами испытаний методом ПЦР, поэтому следует уделять особое внимание их строению, чистоте и пригодности для испытаний. Праймеры могут быть модифицированы (например, конъюгированием с флуорофором или антигеном) для возможности детектирования ампликона специфическими методами при условии, что такие модификации не приведут к ингибированию правильного и эффективного протекания процесса амплификации целевого фрагмента.

КОНТРОЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ПРАВИЛЬНОСТИ ХОДА ИСПЫТАНИЯ

Образцы для внешнего контроля

При постановке ПЦР для минимизации риска контаминации и обеспечения соответствующей чувствительности при каждом испытании используют следующие внешние контрольные образцы:

– образец положительного контроля: образец содержит определенное количество копий целевого фрагмента, близкое к пороговому наименьшему положительному значению, установленное индивидуально для каждой системы

и выраженное кратно по отношению к наименьшему положительному значению данной системы;

– образец отрицательного контроля: образец, аналогичный основной матрице, для которой доказано отсутствие целевой последовательности нуклеотидов. Используется для выявления ложноположительного сигнала.

Образцы для внутреннего контроля

При отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье, образцы для внутреннего контроля представляют собой определенные последовательности нуклеиновых кислот, содержащие сайты связывания с праймерами (праймеры для таких последовательностей добавляются в реакционную смесь дополнительно).

Образцы для внутреннего контроля должны амплифицироваться так же эффективно, как и испытуемая последовательность нуклеотидов, но ампликоны должны иметь четко определяемые отличия. Тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), используемой в качестве внутреннего контроля, должен быть тем же, что и в испытуемом образце.

Образцы для внутреннего контроля предпочтительно добавлять к испытуемому образцу до выделения нуклеиновой кислоты; чтобы можно было их использовать для общего контроля процесса (экстракция, обратная транскрипция, амплификация, детектирование).

Образец для контроля предела количественного определения

Для контроля предела количественного определения готовят образец, содержащий концентрацию определяемого компонента в испытуемом образце, максимально близкую, но не превышающую пороговую линию. Образец для контроля предела количественного определения содержит компонент, калиброванный предпочтительно в международных единицах, и используется параллельно при каждом количественном определении.

ВНЕШНЯЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА

Участие во внешних программах оценки качества представляет собой важную процедуру обеспечения качества испытания методом ПЦР для каждой лаборатории и каждого аналитика.

Следующие разделы приводятся для информации.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ПУЛАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Большинство аналитических методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, представляют собой испытания на наличие нуклеиновых кислот.

Существует также ряд методик количественного определения. Для определения контаминации пулов плазмы РНК вирусом гепатита С (*hepatitis C virus, HCV*) адекватными являются испытания, которые могут быть рекомендованы для контроля предельного содержания примесей.

В данном разделе описаны способы валидации только для аналитических методик качественного анализа амплификации нуклеиновых кислот, предназначенных для оценки контаминации пулов плазмы РНК *HCV*. Для этой цели двумя наиболее важными характеристиками для валидации аналитической методики являются специфичность и предел обнаружения. Кроме того, должна быть оценена устойчивость (робастность) аналитической методики.

Однако данный раздел также может быть использован в качестве основы для валидации всей процедуры амплификации нуклеиновых кислот.

В соответствии с данным разделом за аналитическую методику принимают всю процедуру от экстракции нуклеиновой кислоты до детектирования амплифицированного продукта.

При использовании в аналитической методике или ее части коммерческого набора, валидацию пользователя можно заменить документированным подтверждением валидации вышеуказанных положений, проведенной производителем набора. Тем не менее, пользователем должна быть подтверждена эффективность набора в отношении его предполагаемого использования (то есть предел обнаружения, устойчивость, перекрестная контаминация).

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность представляет собой способность к однозначной оценке наличия нуклеино-

вой кислоты в смеси с компонентами, присутствие которых можно ожидать.

Специфичность аналитических методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, зависит от выбора праймеров, выбора зонда (для анализа конечного продукта) и обоснованности условий проведения испытания (как для стадии амплификации, так и для стадии детектирования).

При разработке праймеров и зондов должна быть исследована их специфичность в отношении детектирования только РНК *HCV* путем сравнения выбранной последовательности нуклеотидов с последовательностями нуклеотидов, опубликованными в банках данных. В случае *HCV* праймеры (и зонды) обычно выбирают из областей 5'-некодирующего участка генома *HCV*, которые консервативны для всех генотипов.

Амплифицированный продукт должен однозначно идентифицироваться одним из методов, например, проведением амплификации с вложенными праймерами (гнездовая ПЦР), испытанием с использованием ферментов рестрикции, секвенированием или гибридизацией со специфическим зондом.

Для валидации специфичности аналитической методики испытание должно быть проведено в отношении не менее 100 образцов РНК *HCV*-отрицательных пулов плазмы, для которых должно быть доказано отсутствие реакции.

Способность аналитической методики к обнаружению всех генотипов *HCV* также зависит от выбора праймеров, зондов и параметров методики. Эта способность должна быть подтверждена с использованием охарактеризованных панелей сравнения. Однако ввиду сложности получения некоторых генотипов (например, генотипа 6) должны быть на подходящем уровне детектированы генотипы преобладающих типов (например, в Европе – генотипы 1 и 3).

ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ МЕТОДИКИ

За предел обнаружения данной аналитической методики принимают наименьшее количество нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть детектировано, но не обязательно определено как точное значение.

Аналитическая методика амплификации нуклеиновых кислот, используемая для детектирования РНК *HCV* в пулах плазмы, как правило, дает неколичественные результаты (либо положительный, либо отрицательный). Реко-

мендуется определение предела обнаружения, но в практических целях для аналитической методики на основе амплификации нуклеиновых кислот должно быть определено наименьшее положительное значение. Наименьшее положительное значение (в соответствии с определением, приведенным в данной общей фармакопейной статье) представляет собой минимальное количество целевых матричных нуклеиновых кислот в испытуемом объеме образца, которые могут быть определены в 95 % испытаний. Минимальное положительное значение зависит от распределения вирусных геномов в индивидуальных испытуемых образцах и такого фактора, как эффективность фермента, что может привести к получению различных наименьших положительных значений для отдельных испытаний.

Для определения наименьшего положительного значения ряд разведений стандартного образца предприятия или *СО ФЕАЭС вируса гепатита С*, калиброванного по международному стандартному образцу *HCV* Всемирной организации здравоохранения, должен быть подвергнут испытанию в разные дни для проверки варибельности результатов анализа. Для проведения статистического анализа результатов должно быть испытано не менее трех независимых рядов разведений в достаточном количестве повторностей для получения 24 результатов испытания для каждого разведения.

Например, в лаборатории в разные дни могут быть проведены испытания трех рядов разведений в восьми повторностях для каждого из них, четырех рядов разведений в шести повторностях для каждого из них или шести рядов разведений в четырех повторностях для каждого из них. Для того, чтобы число разведений не было слишком большим, следует провести предварительное испытание (например, с использованием логарифмических разведений образца пула плазмы) с получением предварительного наименьшего положительного значения (то есть наибольшего разведения, дающего положительный результат). После этого диапазон разведений может быть выбран в области полученного предварительного значения (с использованием, например, логарифмического фактора разведения 0,5 или менее и отрицательного пула плазмы для матрицы разведения). Концентрацию РНК *HCV*, которая

может быть детектирована в 95 % испытаний, рассчитывают с использованием соответствующих методов статистической оценки.

Эти результаты также могут служить для оценки изменчивости результатов, получаемых данной аналитической методикой в ходе испытания и в разные дни.

УСТОЙЧИВОСТЬ (РОБАСТНОСТЬ)

Устойчивость (робастность) аналитической методики – мера ее способности выдерживать воздействие незначительных изменений параметров, являющаяся показателем надежности методики при обычном использовании.

Оценка надежности аналитической методики должна проводиться на этапе ее разработки. Устойчивость должна показать надежность аналитической методики с учетом определенных вариаций параметров. Для методов амплификации нуклеиновых кислот небольшие изменения параметров методики могут иметь решающее значение. Однако в ходе разработки устойчивость методики может быть подтверждена небольшим изменением концентраций реактивов (например, магния хлорида, праймеров или нуклеотидов). Для подтверждения устойчивости не менее 20 РНК *HCV*-отрицательных пулов плазмы, отобранных случайным образом и инфицированных РНК *HCV* с получением конечной концентрации, в 3 раза превышающей заранее определенное наименьшее положительное значение, должны быть испытаны и признаны положительными.

Проблемы с устойчивостью могут возникнуть также в связи с методиками, в которых стадия ультрацентрифугирования предшествует экстракции вирусной РНК. Поэтому для испытания устойчивости таких методик не менее 20 пулов плазмы, содержащих различные уровни РНК *HCV*, но не содержащих специфических антител к *HCV*, должны быть испытаны и признаны положительными.

Предотвращение перекрестной контаминации должно быть подтверждено путем точного детектирования панели не менее чем из 20 образцов, попеременно заполненной образцами отрицательных пулов плазмы и отрицательных пулов плазмы, инфицированных высокими концентрациями *HCV* (не менее 100-кратного наименьшего положительного значения или не менее 10^4 МЕ/мл).

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИСПЫТАНИЯ

Для таких биологических методов, как амплификация нуклеиновых кислот, существует вероятность возникновения специфических проблем, которые могут повлиять как на валидацию, так и на интерпретацию результатов. Методики испытаний должны быть четко описаны в виде стандартных операционных процедур, в которых следует указывать:

- способ отбора проб (тип упаковки и др.);
- приготовление мини-пулов (если применимо);
- условия хранения до испытания;
- четкое описание условий испытания, включая меры предосторожности против перекрестной контаминации и деградации вирусной РНК, используемых реактивов и стандартных образцов;
- четкое описание используемого оборудования;
- детальные формулы расчета результатов, включая статистическую обработку.

В качестве удовлетворительной проверки соответствия системы качества и надежности аналитической методики, когда бы она ни использовалась, может быть рекомендован подходящий образец для контроля хода испытания (например, подходящее разведение *СО ФЕАЭС вируса гепатита С* или образец плазмы, инфицированной *HCV*, калиброванный по международному стандартному образцу *HCV* Всемирной организации здравоохранения).

Квалификация оборудования. Соответствующая программа квалификации монтажа и функционирования должна быть реализована для каждой критически важной части используемого оборудования. После замены критически важного оборудования (например, терморегуляторов) должна быть документально подтверждена функциональность аналитической процедуры путем проведения параллельного испытания в отношении 8 повторных образцов пула плазмы, инфицированных РНК *HCV* с получением конечной концентрации, соответствующей ранее определенному наименьшему положительному значению. Все результаты должны быть положительными.

Квалификация аналитика. В отношении каждого аналитика, принимающего участие в испытании, должна действовать соответствующая квалификационная программа.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ДНК ВИРУСА В19 В ПУЛАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Согласно требованиям Фармакопеи Союза пулы плазмы, используемые при производстве определенных продуктов, должны быть проверены на содержание ДНК вируса В19 (*B19V*) в концентрации не выше допустимой. Для этого предпочтительно использовать методики амплификации с количественным определением нуклеиновых кислот. Наиболее важными характеристиками для валидации таких методик являются: правильность, прецизионность, специфичность, предел количественного определения, линейность и диапазон применения. Кроме того, должна быть оценена устойчивость (робастность) аналитической методики.

В разделе описаны способы валидации методик амплификации нуклеиновых кислот для определения контаминации пулов плазмы ДНК *B19V*. Однако данный раздел также может быть использован в качестве основы для валидации в целом процедуры амплификации нуклеиновых кислот.

В соответствии с данным разделом за аналитическую методику принимают всю процедуру от экстракции нуклеиновой кислоты до детектирования амплифицированного продукта.

В случае использования в аналитической методике или ее части коммерческого набора валидацию можно заменить документированным подтверждением валидации вышеуказанных характеристик от производителя набора. При этом пользователем должна быть подтверждена эффективность набора в отношении его предполагаемого использования (то есть правильность, прецизионность, диапазон применения, устойчивость).

ПРАВИЛЬНОСТЬ

Правильность представляет собой близость совпадения между найденным значением и значением, которое определено как условно правильное, либо принято как значение сравнения. Правильность количественного определения зависит от калибровочного графика и отклонений на различных стадиях количественного опреде-

ления. Хотя рекомендовано определять правильность во всем специфицированном диапазоне, наиболее важно подтвердить правильность в диапазоне около предельного значения концентрации (количество). В случае количественного определения ДНК *B19V* в пулах плазмы рекомендуется оценивать правильность методики путем количественного определения не менее 5 концентраций (с логарифмическим коэффициентом разведения 0,5) *СО ФЕАЭС вирусной ДНК В19 для метода амплификации нуклеиновых кислот* или иного стандартного образца, калиброванного в международных единицах по международному стандартному образцу ДНК *B19V* Всемирной организации здравоохранения в диапазоне рекомендованного на данный момент порогового значения 10,0 МЕ/мкл ДНК *B19V* (то есть 10^5 МЕ/мл, $10^{4,5}$ МЕ/мл, 10^4 МЕ/мл, $10^{3,5}$ МЕ/мл и 10^3 МЕ/мл) не менее чем в трех повторностях для каждого разведения. Правильность должна быть документирована для различных концентраций в процентах, определенных в сравнении с известным количеством ДНК *B19V*. Следует сопоставить технологический уровень соответствующего метода количественного определения, например, с помощью совместных испытаний.

ПРЕЦИЗИОННОСТЬ

Прецизионность представляет собой близость совпадения между сериями измерений, полученных в многочисленных испытаниях различных проб одного и того же гомогенного образца. Прецизионность определяется на трех уровнях:

- повторяемость: выражает точность при одних и тех же условиях испытания в течение короткого промежутка времени, оценивается с использованием одной методики количественного определения, с помощью которой трижды испытывают подходящие разведения положительных образцов с ДНК *B19V*, калиброванных в международных единицах и охватывающих весь диапазон применения методики количественного определения; коэффициент вариации рассчитывают для индивидуальных образцов;

- промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность: выражает внутрилабораторную вариабельность, устанавливается оценкой повторных испытаний (как рутинный количественный анализ) подходящих разведений положительных образцов с ДНК *B19V*, калиброванных в международных единицах и охватывающих

весь диапазон применения методики количественного определения, в различной обстановке (то есть различные дни, различные аналитики, различное оборудование, различные реактивы); коэффициент вариации рассчитывают для индивидуальных образцов;

- воспроизводимость: выражает точность между различными лабораториями (межлабораторная прецизионность), оценивается путем участия в совместных количественных испытаниях на содержание ДНК *B19V*.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность представляет собой способность к однозначной оценке наличия нуклеиновой кислоты в смеси с компонентами, присутствие которых можно ожидать. Специфичность аналитических методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, зависит от выбора праймеров, выбора зонда (для испытания конечного продукта) и обоснованности условий проведения испытания (как для стадии амплификации, так и стадии детектирования).

При разработке праймеров и зондов должна быть исследована их специфичность в отношении детектирования только ДНК *B19V* путем сравнения избранной последовательности нуклеотидов с последовательностями нуклеотидов, опубликованными в банках данных. Не должно обнаруживаться значительное сходство с последовательностями нуклеотидов, не относящимися к *B19V*.

Амплифицированный продукт должен однозначно идентифицироваться одним из методов, например, проведением амплификации с вложенными праймерами (гнездовая ПЦР), анализом с использованием ферментов рестрикции, секвенированием или гибридизацией со специфическим зондом.

Для проверки специфичности аналитической методики испытание должно быть проведено в отношении не менее 20 ДНК *B19V*-отрицательных пулов плазмы, для которых должно быть показано отсутствие реакции.

Генотипы парвовируса В19. Международный комитет по таксономии вирусов классифицирует представителей трех генотипов как штаммы человеческого парвовируса *B19*. Генотип 1 представляет прототип *B19V*, генотип 2 – вирусные последовательности нуклеотидов типа *А6* и генотип 3 – *V9*-подобные последовательности нуклеотидов. При проведении вырав-

нивания с использованием соответствующей последовательности нуклеотидов генотипа *B19V*, доступной из баз данных последовательностей нуклеиновых кислот, праймеры и зонды должны быть выбраны с таким расчетом, чтобы была возможность обнаружения и количественного определения в равной степени различных генотипов парвовируса *B19*. Для проверки выбранного подхода следует использовать стандартные образцы. Так как получение биологических препаратов сравнения может быть затруднено, соответствующие препараты плазмид или синтетических нуклеиновых кислот также могут служить в качестве источника охарактеризованных целевых фрагментов. Однако они не могут быть использованы для валидации процедуры экстракции.

ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Предел количественного определения представляет собой минимальное количество нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть определено с требуемой правильностью и прецизионностью. Предел количественного определения методики, основанной на амплификации нуклеиновых кислот *B19V*, оценивают при изучении правильности и межлабораторной прецизионности путем ограничения разведений. Определяют наименьшую концентрацию целевой матричной нуклеиновой кислоты, которая может быть определена количественно с достаточной правильностью и прецизионностью.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Линейность методики количественного определения – валидационная характеристика возможности получения результатов, прямо пропорциональных концентрации нуклеиновой кислоты. Линейность методики, основанной на амплификации нуклеиновых кислот *B19V*, оценивают по характеристикам повторяемости и промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности путем испытания в нескольких повторностях разведенных образцов с концентрациями, охватывающими весь диапазон применения методики. Определяют интервал, расположенный между верхней и нижней концентрациями целевой матричной нуклеиновой кислоты, при которых получаемые результаты прямо пропорциональны ее содержанию.

ДИАПАЗОН ПРИМЕНЕНИЯ

Диапазон применения – интервал, расположенный между наибольшей и наименьшей концентрациями (количеством) нуклеиновой кислоты в образце, для которого было показано, что методика имеет приемлемый уровень правильности, линейности и прецизионности. Диапазон применения методики амплификации нуклеиновых кислот *B19V* оценивают по характеристикам повторяемости и промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности путем испытаний в нескольких повторностях разведенных образцов. Определяют интервал, расположенный между наибольшей и наименьшей концентрациями целевой матричной нуклеиновой кислоты, который может быть выражен с приемлемой степенью правильности и прецизионности.

УСТОЙЧИВОСТЬ (РОБАСТНОСТЬ)

Устойчивость (робастность) аналитической методики – мера способности методики выдерживать воздействие незначительных изменений параметров, являющаяся показателем надежности этой методики при обычном использовании. Оценка надежности аналитической методики должна проводиться на этапе ее разработки. Устойчивость должна показать надежность аналитической методики с учетом определенных вариаций параметров. Для методов амплификации нуклеиновых кислот небольшие изменения параметров методики могут иметь решающее значение. Однако в ходе разработки методики ее устойчивость может быть подтверждена небольшим изменением концентраций реактивов, например, магния хлорида, праймеров или нуклеотидов. Для подтверждения устойчивости аналитической методики не менее 20 ДНК *B19V*-отрицательных пулов плазмы, инфицированных ДНК *B19V* до получения конечной концентрации около наименьшего значения, должны быть испытаны с получением приемлемых количественных значений.

Предотвращение перекрестной контаминации должно быть подтверждено путем точного детектирования панели не менее чем из 20 образцов, попеременно заполненной образцами пулов плазмы без ДНК *B19V* или с концентрацией ниже порогового значения (10 образцов) и пулов плазмы, инфицированных высокими концентрациями ДНК *B19V* (не менее 100-кратного наименьшего значения, 10 образцов).

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИСПЫТАНИЯ

201060018-2023

Для таких биологических методов, как амплификация нуклеиновых кислот, имеет-ся вероятность возникновения специфических проблем, которые могут повлиять как на валидацию, так и на интерпретацию результатов. Методики испытаний должны быть четко описаны в виде стандартных операционных процедур, в которых следует указывать:

- способ отбора проб (тип упаковки и др.);
- приготовление мини-пулов производителем (если применимо);
- условия хранения до испытания;
- четкое описание условий испытания, включая меры предосторожности против перекрестной контаминации и деградации вирусных нуклеиновых кислот, используемых реактивов и стандартных образцов;
- четкое описание используемого оборудования;
- детальные формулы расчета результатов, включая статистическую обработку.

Для проверки соответствия системы качества и надежности аналитической методики может быть использован подходящий образец для контроля хода испытания (например, плазма, инфицированная образцом ДНК вируса *B19V*, калиброванным в международных единицах в сравнении с *СО ФЕАЭС вирусной ДНК В19 для метода амплификации нуклеиновых кислот*).

Квалификация оборудования. Соответствующая программа квалификации монтажа и функционирования должна быть реализована для каждой критически важной части используемого оборудования. После замены критически важного оборудования (например, терморегуляторов) должна быть документально подтверждена функциональность путем проведения параллельного испытания с использованием 8 образцов пула плазмы, инфицированного ДНК *B19V* с получением конечной концентрации около наименьшего значения. Все результаты должны быть приемлемыми и отражать возможности методики количественного определения, как было установлено при валидации.

Квалификация аналитика. В отношении каждого аналитика, принимающего участие в испытании, должна действовать соответствующая квалификационная программа.

2.1.6.18. МЕТОД ИММУНОНЕФЕЛОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИН

Метод нефелометрии описан в общей фармакопейной статье *2.1.2.1. Прозрачность и степень опалесценции жидкостей*. Методом иммунонефелометрии измеряют мутность, обусловленную формированием иммунного комплекса при реакции «антиген-антитело». Данный метод применяют как для определения количества антител, так и для определения количества антигенов. В общей фармакопейной статье описано количественное определение антигенов как компонентов вакцин.

ОБОРУДОВАНИЕ

Для испытаний используют нефелометр, описанный в общей фармакопейной статье *2.1.2.1. Прозрачность и степень опалесценции жидкостей*. Допускается проведение измерения под ненулевым углом, отличным от 90°.

МЕТОДЫ

Измерение светорассеяния в процессе реакции может быть проведено в три этапа.

Сначала определяют базовый уровень светорассеяния реакционной средой. После добавления первого реактива (антигена) происходит увеличение сигнала с последующим плато. Когда добавляют второй реактив (антитело), происходит второе усиление сигнала со вторым плато, за которым следует окончательное увеличение интенсивности сигнала, продолжающегося до тех пор, пока не будет достигнуто третье плато. Зону измерения фиксируют с момента добавления второго реактива до достижения наиболее высокой интенсивности светорассеяния (третье плато) в зависимости от концентрации определяемого компонента.

Для количественной оценки иммунных комплексов, образующихся при реакции «антиген-антитело», используют следующие методы.

ИММУНОНЕФЕЛОМЕТРИЯ В КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ

Методом иммунонефелометрии в конечной точке измеряют светорассеяние после формирования иммунного комплекса, примерно через 60 мин. Измеренное значение в конечной точке в этом случае прямо пропорционально содержанию определяемого компонента в присутствии избытка антител. Проводят контрольный опыт, чтобы учесть значение неспецифического светорассеяния, обусловленного реакционной средой и реакционной измерительной кюветой.

КИНЕТИЧЕСКАЯ ИММУНОНЕФЕЛОМЕТРИЯ

Метод кинетической иммунонефелометрии основан на определении скорости образования иммунных комплексов (скорость увеличения светорассеяния), которая пропорциональна концентрации определяемого компонента.

Существует 2 типа кинетической иммунонефелометрии.

Иммунонефелометрия с фиксированным временем

Первое измерение светорассеяния проводят через несколько секунд после добавления последнего реактива. Второе измерение проводят через фиксированный интервал времени, установленный при разработке методики. Разница между двумя значениями пропорциональна количеству определяемого компонента.

Кинетическая иммунонефелометрия с использованием пика первой производной

Формирование иммунного комплекса описывает кривая, построенная по первой производной изменения светорассеяния во времени ($d\Theta_D/dt$). Появление двух последовательных пиков обусловлено добавлением первого, а затем второго реактива.

Высота третьего пика кривой, построенной по первой производной, пропорциональна количеству определяемого компонента в реакционной среде. Последовательные измерения проводят через несколько секунд после добавления второго реактива.

В этом случае свет, рассеянный реакционной средой, компонентом и реактивом, не влияет на исходное значение полученного сигнала.

РЕАКТИВЫ И СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Реактивы, в том числе разбавители, и стандартные образцы должны быть прозрачными и не содержать взвешенных частиц. При необходимости их предварительно фильтруют или центрифугируют.

Антисыворотки или антитела выбирают на основе их специфичности, способности к осаждению и их авидности по отношению к антигену, высокое значение которой обеспечивает быстрое появление четких сигналов, что улучшает качество результатов.

Устанавливают подходящий диапазон концентраций антигена (рабочий диапазон), определяемого в присутствии избытка антител, в котором отсутствует зональный эффект.

Рекомендуется убедиться, что профили отклика испытуемого образца и соответствующего стандартного образца аналогичны.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ИСПЫТУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

При необходимости проводят соответствующую предварительную обработку испытуемого образца для удаления адьюванта или другого мешающего вещества.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Необходимо убедиться, что все реактивы имеют подходящую температуру для оптимального протекания реакции. Образцы разводят подходящей средой в реакционной измерительной кювете, затем добавляют фиксированное количество антител. Выполняют несколько измерений каждого разведения испытуемого образца.

В некоторых случаях ход реакции можно улучшить путем введения в реакционную среду дополнительных веществ (например, полиэтиленгликоля).

Стандартные и испытуемые образцы обрабатывают одинаковым образом.

ПРОВЕДЕНИЕ КОНТРОЛЬНОГО ОПЫТА

Для обеспечения специфичности испытания, измеряют только светорассеяние, обусловленное

иммунными комплексами. Если другие частицы, матрица образца, реактивы или реакционная измерительная кювета могут мешать испытанию, то в таких случаях и в случае использования метода иммунонефелометрии в конечной точке проводят контрольный опыт для исключения неспецифического светорассеяния.

КАЛИБРОВКА

По разведениям стандартного образца строят калибровочную кривую, подбирая концентрации таким образом, чтобы охватить рабочий диапазон.

МЕТОДЫ РАСЧЕТА

Для расчетов используют метод параллельных прямых или метод калибровочной кривой (2.3.12.0).

КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

КАЛИБРОВОЧНЫЕ КРИВЫЕ

Калибровочные кривые должны соответствовать установленным критериям приемлемости.

Для установления критериев приемлемости могут быть использованы следующие параметры:

- минимальное светорассеяние, выраженное в единицах светорассеяния (*light scattering units; LSU*), для точки калибровочной кривой с самой низкой концентрацией;
- коэффициент вариации *LSU*, измеренный для каждой точки кривой;
- коэффициенты регрессии или корреляции калибровочной кривой;
- наклон калибровочной кривой и отрезок, отсекаемый калибровочной кривой на оси координат.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Примеры критериев приемлемости, которые следует оценивать:

- коэффициент вариации или диапазон значений результатов измерений испытуемого образца;
- результаты испытания стандартного образца с учетом тенденций или контрольной карты.

2.1.6.19. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТАТОЧНОЙ ДНК КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

Общая фармакопейная статья описывает аналитические методы, которые могут быть использованы для определения содержания и оценки размера остаточной ДНК клетки-хозяина в биотехнологических лекарственных средствах, произведенных с применением клеток-продуцентов, что не исключает возможности использования альтернативных подходов при согласовании с уполномоченным органом.

ВВЕДЕНИЕ

Для определения остаточной ДНК клетки-хозяина применяют различные чувствительные аналитические методы, в том числе метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР-РВ) (метод 1) и метод иммуноферментного анализа (метод 2).

Метод кПЦР-РВ может также быть использован при оценке распределения по размеру остаточной ДНК клетки-хозяина, как одной из характеристик, зависящей от природы клеточного субстрата (например, перевиваемые клеточные линии) и от количества остаточной ДНК клетки-хозяина.

Подходящий метод выбирают в зависимости от природы испытуемого образца и с учетом особенностей и ограничений каждого метода, указанных в таблице 2.1.6.19.-1.

ПРОБОПОДГОТОВКА

Концентрация остаточной ДНК клетки-хозяина существенно зависит от вида биотехнологического лекарственного средства, от технологии при его создании и степени очистки от ДНК в производственном процессе.

В зависимости от матрицы, для достижения надлежащей открываемости остаточной ДНК клетки-хозяина может потребоваться предварительная обработка образца.

Для анализа белков высокой степени очистки, таких как рекомбинантные белки или моноклональные антитела, необходимая величина

открываемости остаточной ДНК клетки-хозяина может быть достигнута с использованием обычного протеолитического расщепления или аффинной хроматографии. Для более сложной матрицы (например, вирусной вакцины или вирусного вектора) для высвобождения остаточной ДНК из вирусных частиц может потребоваться дополнительная стадия лизиса вируса.

Метод иммуноферментного анализа особенно чувствителен к интерферирующему воздействию белков, избежать которого можно, используя расщепление протеиназой К и натрия додецилсульфатом в качестве первоначальной стадии предварительной обработки образца. Этого может быть достаточно для достижения необходимой открываемости остаточной ДНК клетки-хозяина. В некоторых случаях остаточная ДНК клетки-хозяина может быть связана с компонентами испытуемого образца, в котором также могут присутствовать растворимые мешающие вещества, в этом случае может понадобиться выделение остаточной ДНК клетки-хо-

зяина из испытуемого образца.

Для выделения ДНК используют процедуры, при которых получена удовлетворительная величина открываемости в экспериментах с добавками. Существует несколько подходящих методов выделения, включая преципитацию ДНК или ДНК-специфическое связывание с матрицей (например, магнитными шариками или колонками с диоксидом кремния). Для выделения остаточной ДНК клетки-хозяина можно использовать коммерчески доступные наборы. В некоторых наборах для разрушения связи между остаточной ДНК клетки-хозяина и компонентами испытуемого образца используют хаотропные агенты (натрия йодид и др.) и детергент (натрия лаурилсаркозинат). Остаточную ДНК клетки-хозяина извлекают из испытуемого образца путем соосаждения с молекулой-носителем, такой как гликоген, в присутствии этанола или 2-пропанола. В зависимости от воспроизводимости результатов по проверке открываемости добавки может потребоваться несколько

Таблица 2.1.6.19.-1. – Сравнение методов кПЦР-РВ (метод 1) и иммуноферментного анализа (метод 2)

Характеристики	Метод 1	Метод 2
использование для оценки распределения по размеру ДНК	да	нет
предел количественного определения (зависит от матрицы, используемого метода и мешающих веществ) (пг/мл)	0,01 – 10	2 – 10
специфичность (определение общего содержания ДНК или содержания конкретной ДНК)	определение содержания конкретной ДНК	определение общего содержания ДНК
мешающие вещества	белки	детергенты, белки, растворители, РНК
ограничения	фрагменты, меньшие чем ПЦР-продукт, не могут быть обнаружены и определены количественно	не применимо для лекарственных средств, на основе ДНК. Для фрагментов, содержащих менее 1000 пар оснований определяемое содержание ДНК занижается. Детектирование зависит от размера ДНК. Короткие последовательности ДНК (менее 80 нуклеотидов) не определяются, но могут мешать количественному определению из-за связывания реактива. Лекарственное средство не должно содержать бактериальной ДНК. Узкий рабочий диапазон: 5 – 150 пг/пункта.

независимых процедур выделения. В каждую процедуру выделения должны быть включены отрицательные контроли. В некоторых случаях рекомендуется разведение полученных образцов (извлеченные пробы) для уменьшения эффекта матрицы. Также может быть применен поправочный коэффициент, учитывающий открываемость добавки.

МЕТОД 1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ кПЦР-РВ

Метод может быть использован для определения целевой последовательности клеточной ДНК, выделенной из различных испытуемых образцов. Для определения остаточной ДНК клетки-хозяина можно использовать метод кПЦР-РВ, направленный либо на стабильную последовательность нуклеотидов в высококонсервативной области генома клетки-хозяина, либо на повторяющиеся элементы для повышения чувствительности испытания. При определении повторяющихся элементов потенциальный фоновый «шум» ДНК из окружающей среды может быть трудно устраним (например, при использовании *Alu* последовательностей генома человека). Специфичность методики с использованием метода кПЦР-РВ должна быть установлена в ходе валидационных исследований путем подтверждения отсутствия перекрестной активности с неродственными нуклеотидными последовательностями.

В качестве альтернативы допустимо использование цифровые методы ПЦР.

АМПЛИФИКАЦИЯ

Обнаружение и определение остаточной ДНК клетки-хозяина методом кПЦР-РВ может включать использование ДНК зондов, специфичных к последовательности нуклеотидов, или неспецифического флуоресцентного красителя, интеркалирующего с любой двуцепочечной ДНК. Принципы метода кПЦР-РВ описаны в общей фармакопейной статье 2.1.6.17. *Методы амплификации нуклеиновых кислот.*

Количество циклов, необходимых для превышения порогового значения (C_t или C_p) при флуоресцентном измерении, зависит от исходного количества остаточной ДНК клетки-хозяина в образце.

Если выполняется несколько выделений, извлеченные пробы, при необходимости, после

подходящего разведения, должны иметь сопоставимую концентрацию ДНК клетки-хозяина.

Используют образцы для отрицательного контроля ПЦР.

Стандартную кривую содержания геномной ДНК строят с использованием серий разведений стандартного раствора геномной ДНК клетки-хозяина, чтобы можно было определить остаточные уровни ДНК клетки-хозяина в биотехнологических лекарственных средствах на основе их значений C_t или C_p . Для приготовления стандартного раствора рекомендуется использовать тщательно охарактеризованную репрезентативную геномную ДНК, выделенную из клеток, используемых для производства биотехнологического лекарственного средства.

Аналогичный подход применяют для оценки распределения по размеру остаточной ДНК клетки-хозяина. Для амплификации перекрывающихся фрагментов разного размера в целевой последовательности нуклеотидов могут быть использованы как минимум два набора праймеров.

КРИТЕРИИ ПРИГОДНОСТИ СИСТЕМЫ

Контрольные образцы для проверки правильности хода испытания

Для контроля надлежащей чувствительности и контроля риска контаминации в каждом испытании используют следующие образцы:

– *образец отрицательного контроля для метода кПЦР-РВ и образец отрицательного контроля для выделения, состоящие из подходящих матриц с доказанным отсутствием целевой последовательности нуклеотидов;*

– *образец положительного контроля для метода кПЦР-РВ* содержит определенное количество копий целевой последовательности или определенную концентрацию ДНК, которая определяется индивидуально для каждой системы анализа;

– *образец для внутреннего контроля* (используется для контроля выделения), представляющий собой испытуемый образец, в который добавляют в определенной концентрации или количестве копии целевой последовательности. В этом случае ампликоны должны иметь четко определяемые различия и возможность быть обнаруженными в отдельном испытании методом кПЦР-РВ. В качестве альтернативы допустимо использование образца для внешнего контроля, состоящего из испытуемого образца

с хорошо охарактеризованным уровнем геномной ДНК.

Открываемость методики должна находиться в пределах заданных значений, основанных на характеристиках методики, установленных во время валидации.

Стандартная кривая содержания геномной ДНК

Стандартная кривая содержания геномной ДНК в выбранном диапазоне должна быть линейной. Коэффициент детерминации R^2 стандартной кривой содержания геномной ДНК должен быть больше или равен 0,98. Эффективность ПЦР на основе значений C_t или C_p должна находиться в заранее установленных пределах.

Коэффициент вариации для различных извлечений или повторов не должен превышать предварительно установленного значения.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Если выполняется несколько выделений, то каждая извлеченная проба анализируется индивидуально. Остаточное содержание ДНК клетки-хозяина рассчитывают по стандартной кривой содержания геномной ДНК путем усреднения значений, полученных для различных извлечений или повторов. При необходимости, данный результат может быть скорректирован с учетом открываемости при выделении.

Для оценки распределения перекрывающихся фрагментов разных размеров остаточной ДНК клетки-хозяина рассчитывают соотношение количества копий для каждого размера ампликона к количеству копий ампликона наименьшего размера.

МЕТОД 2. МЕТОД ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Метод иммуноферментного анализа представляет собой неспецифический метод количественного определения остаточной ДНК клетки-хозяина (независимо от ее происхождения), позволяющий обнаруживать одноцепочечную ДНК.

Данный метод позволяет определить общее содержание ДНК, и, следовательно, важно не только избегать загрязнения ДНК от окружающей среды, но и все используемые материалы и реактивы не должны содержать ДНК. Испытуемые образцы не должны быть контаминированы микроорганизмами, и все образцы, в том числе стандартные

образцы, должны быть обработаны в контролируемых условиях до этапа денатурации.

ПРИНЦИП

Определение общей ДНК состоит из четырех этапов:

– *денатурация и образование комплексов*: при нагревании образца ДНК денатурируется в одноцепочечную ДНК; денатурированную ДНК смешивают с реактивом, который содержит белок, конъюгированный со стрептавидином (связывающим одноцепочечную ДНК), и моноклональное антитело к ДНК, конъюгированное с уреазой. ДНК-связывающий белок и моноклональное антитело специфичны для одноцепочечной ДНК, но не специфичны для двуцепочечной. Наличие стрептавидина в жидкой фазе способствует образованию комплекса с одноцепочечной ДНК из образца;

– *фильтрация*: комплекс фильтруют через биотинилированную нитроцеллюлозную мембрану. Биотин в мембране захватывает комплексы, связываясь со стрептавидином. Мембрану промывают для удаления любых несвязанных реактивов. Для исключения неспецифического связывания используют нитроцеллюлозную мембрану, покрытую альбумином;

– *детектирование*: мембрану помещают в планшетный спектрофотометр, содержащий раствор мочевины, реагирующий с уреазой в комплексе ДНК с образованием аммиака. Соответствующее изменение pH, которое измеряют потенциометрическим датчиком (в микровольт в секунду), прямо пропорционально количеству ДНК в образце;

– *анализ*: исходные данные для образца и стандартной кривой обрабатывают с использованием соответствующего программного обеспечения для определения остаточного содержания ДНК клетки-хозяина в образце.

Все образцы и отрицательные контроли испытывают с добавками и без добавок. Раствор добавки (1000 пг/мл) готовят путем разбавления концентрированного стандартного раствора (ДНК тимуса теленка) с концентрацией 5000 пг/мл.

КРИТЕРИИ ПРИГОДНОСТИ СИСТЕМЫ

Контрольные образцы

– количество ДНК в положительном контроле должно находиться в пределах диапазона, указанного производителем;

– открываемость добавки в отрицательном

контроле должна составлять от 80 % до 120 %.

Образцы

– при анализе нескольких повторов коэффициент вариации для разных повторов не должен превышать установленного значения;

– открываемость добавки должна составлять от 80 % до 120 %.

ВЫЧИСЛЕНИЯ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание остаточной ДНК клетки-хозяина рассчитывают в пикограммах на миллилитр по формуле:

$$\frac{ID \cdot (C - A)}{V}$$

где: *ID* — коэффициент разведения;

C — исходное (необработанное) среднее значение (в пикограммах на пробирку) для пробирок, содержащих образец;

A — исходное (необработанное) среднее значение (в пикограммах на пробирку) для пробирок, содержащих отрицательный контроль;

V — объем в пробирке, в миллилитрах (обычно 0,5 мл на пробирку).

При необходимости полученный результат может быть скорректирован с учетом открываемости при выделении (например, средней открываемости для конкретного продукта).

201060020-2023

2.1.6.20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

В общей фармакопейной статье представлены рекомендации по разработке и валидации методик определения остаточных белков клетки-хозяина, применяемых для испытаний лекарственных средств, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК, что не исключает возможности использования альтернативных методов, признанных приемлемыми уполномоченным органом.

ВВЕДЕНИЕ

Белки клетки-хозяина представляют собой производственные примеси, источником кото-

рых является организм, из которого получены клетки, используемые в производстве лекарственного средства с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Предполагают, что снижение содержания белков клетки-хозяина до минимально возможного уровня уменьшит побочные эффекты лекарственного препарата (например, иммуногенность).

Необходимо оценить эффективность удаления белков клетки-хозяина в процессе очистки. Содержание белков клетки-хозяина должно быть количественно определено с помощью методики, разработанной и валидированной для конкретного лекарственного средства.

Предел содержания остаточных белков клетки-хозяина, выраженный, как правило, в нанogramмах на миллиграмм действующего (активного) вещества (ppm), должен быть обоснован с учетом эффективности процесса очистки в отношении белков клетки-хозяина и их потенциально-го влияния на организм пациента, исходя из введения максимального количества остаточных белков клетки-хозяина с дозой лекарственного препарата.

При определении допустимых пределов содержания необходимо учитывать, что невозможно установить общий предел содержания остаточных белков клетки-хозяина для всех конкретных лекарственных препаратов, в связи с тем, что качественные и количественные характеристики остаточных белков клетки-хозяина изменяются от одного продукта к другому и даже от одной процедуры производства (очистки) к другой.

Определение остаточных белков клетки-хозяина, как правило, проводят методами иммуноферментного анализа (ИФА), используя в качестве реактивов специально приготовленный антиген (антигены) белка клетки-хозяина или стандартный образец белков клетки-хозяина и соответствующие поликлональные антитела. Антисыворотка должна содержать антитела к широкому спектру белков клетки-хозяина, характерных для конкретного лекарственного средства.

Для определения остаточных белков клетки-хозяина чаще всего используют метод «сэндвич» ИФА. Следует учитывать, что содержание остаточных белков клетки-хозяина, определяемое с помощью ИФА, не отражает абсолютное массовое содержание примесных белков. Чувствительность реакции обусловлена результатом, наблюдаемым при совокупной ответной реакции на множество отдельных белков клетки-хозяина, в сравнении

с ответной реакцией на стандартный образец белка клетки-хозяина. При разработке и выборе метода определения остаточных белков клетки-хозяина для получения характеристик различных белков клетки-хозяина, содержащихся в лекарственном средстве, рекомендуется использовать ортогональные аналитические методы (например, электрофорез, ВЭЖХ, вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия).

ВЫБОР МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Существуют различные типы методов количественного определения остаточных белков клетки-хозяина. Метод выбирают с учетом различных факторов, включая стадию разработки лекарственного препарата, природу клетки-хозяина и иммуногенность белков, тип экспрессии, производственный процесс и предшествующий опыт.

При выборе и разработке методики количественного определения остаточных белков клетки-хозяина необходимо учитывать жизненный цикл испытания (обеспеченность реактивами, постоянство их качества, валидацию методики количественного определения, внесение изменений в производственный процесс).

ТИПЫ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Процесс-специфичные методы количественного определения

Методику количественного определения остаточных белков клетки-хозяина, специфичных для процесса (процесс-специфичных или продукт-специфичных остаточных белков клетки-хозяина), разрабатывают и валидируют с учетом особенностей производственного процесса и с использованием той же экспрессирующей системы, что и при получении рекомбинантного продукта.

Антигены белков клетки-хозяина получают путем имитации процесса производства активной фармацевтической субстанции (или аналогичного ему процесса) до стадии, способной вырабатывать широкий спектр белков клетки-хозяина в достаточном количестве.

Полученные антисыворотки должны охватывать широкий диапазон белков клетки-хозяина, чтобы определять как можно больше различных белков клетки-хозяина и учитывать вариабельность производственного процесса.

Платформенные методы количественного определения

Платформенные методы количественного определения остаточных белков клетки-хозяина разрабатывают производители для конкретных биотехнологических процессов, используемых в производстве.

Одни и те же наборы реактивов применяют для определения остаточных белков клетки-хозяина в нескольких лекарственных средствах, полученных от одного типа экспрессирующей системы (например, линия клеток яичников китайского хомячка (*CHO*)), при условии, что процессы наработки биологического материала с целевым продуктом (и последующие за ним выделение и очистка целевого продукта, если применимо) достаточно схожи для этих лекарственных средств. Возможность применения антисыворотки должна быть оценена, как описано для процесс-специфичных методов количественного определения.

Общие методы количественного определения

Коммерчески доступные наборы реактивов для определения остаточных белков клетки-хозяина предназначены для работы с широким спектром белков от аналогичных типов экспрессирующих систем. Подробная информация по производству реактивов может быть не доступна. Например, антигены могут быть выделены из смеси штаммов клетки-хозяина, и используемый процесс (процессы) может не совпадать с процессом, применяемым для конкретного лекарственного средства. Возможность применения антисыворотки должна быть оценена, как описано для процесс-специфичного метода количественного определения.

КРИТЕРИИ ВЫБОРА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Ввиду потенциальных вопросов безопасности, ассоциированных с остаточным количеством белков клетки-хозяина в активных фармацевтических субстанциях, для выбора между общим, платформенным или процесс-специфичным методами количественного определения проводят оценку риска, принимая во внимание стадию разработки лекарственного средства.

На начальном этапе разработки могут быть использованы общий или платформенный методы количественного определения.

На поздних этапах разработки следует использовать процесс-специфичные методы количественных определений как более точные, особенно в сравнении с общими методами количественного определения, так как процесс-специфичные методы с большей вероятностью обнаружат иммунореактивность против характерных белков клетки-хозяина. Методы платформенного или общего количественного определения могут быть использованы при условии, что методика количественного определения соответствующим образом валидирована и ее пригодность оценена относительно специфичных для процесса остаточных белков клетки-хозяина.

*ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ХАРАКТЕРИСТИК АНТИГЕНОВ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ
РЕАКТИВОВ*

Для иммунологического количественного определения остаточных белков клетки-хозяина реактивы (антигены и антисыворотки) получают способами, которые при необходимости могут быть повторно воспроизведены.

Антигены используют для получения поликлональных антител с помощью иммунизации одного или нескольких подходящих видов животных. Кроме того, антигены белков клетки-хозяина применяют в качестве стандартного образца при количественном определении остаточных белков клетки-хозяина.

Антигены должны охватывать как можно более широкую совокупность видов белков клетки-хозяина, которые могут быть получены в производственном процессе целевого белка и по возможности включать в себя всю совокупность видов белков, получаемых в условиях наихудшего случая процесса очистки, а также обеспечивать робастность против потенциальных изменений производственного процесса в течение жизненного цикла лекарственного препарата.

**ПРОЦЕСС-СПЕЦИФИЧНЫЕ МЕТОДЫ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ**

НУЛЕВАЯ КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ

Разработка процесс-специфичного метода количественного определения остаточных белков клетки-хозяина включает выбор нулевой клеточ-

ной линии, не содержащей ген экспрессии целевого продукта и полученной из клеточной линии, использованной при создании производственной клеточной линии, продуцирующей целевой белок. Нулевая клеточная линия может быть не трансфицированной или ложно трансфицированной. Ложно трансфицированную линию клеток получают с помощью трансфекции родительской линии клеток плазмидой, используемой при создании производственной клеточной линии, но без гена, кодирующего целевой белок.

*ИМИТАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО
ПРОЦЕССА*

**Процессы наработки продукта,
содержащего целевой белок**

Антигены для процесс-специфичного метода количественного определения остаточных белков клетки-хозяина получают, имитируя планируемый производственный процесс с использованием нулевой клеточной линии и, где это возможно, в одних и тех же условиях производства.

Любая имитация производственного процесса является приближением к предполагаемому производственному процессу, поэтому они могут иметь отличия, например, различный масштаб, рабочие параметры, взаимодействие продуктов. Такие отличия необходимо тщательно оценить, так как они могут повлиять на совокупность видов белков клетки-хозяина.

Например, при имитации стадии ферментации процесса производства телец включения, получение желаемых телец включения может быть не достигнуто. В связи с этим, в зависимости от используемой нулевой клеточной линии (например, ложно трансфицированной или не трансфицированной), антигены получают иначе, чем в предполагаемом производственном процессе.

В отдельных случаях для некоторых параметров производственного процесса при имитации производства может потребоваться корректировка с учетом наихудшего случая (например, для получения антигенов, охватывающих широкий спектр различных видов белков клетки-хозяина). Например, супернатант клеточной культуры, содержащий антиген, может быть собран уже после достижения минимального уровня жизнеспособности клеток, чтобы включить больше цитозольных белков, которые высвобождаются при дополнительном лизисе клеток.

Процессы выделения и очистки целевого белка

Полученные антигены подвергают шадящему воздействию (филтрации, концентрированию) с целью получения репрезентативного спектра белков клетки-хозяина. Дальнейшую очистку обычно не рекомендуется, так как существует риск потери видового разнообразия остаточных белков. В случаях, когда не достигнута репрезентативность антигенов (например, в результате узкого охвата), можно рассмотреть возможность смешивания имитационных материалов с различных этапов обработки. Возможно увеличение разнообразия антигенов путем объединения материалов, полученных в результате имитации ферментации и (или) очистки с использованием различных производственных условий, или селективных этапов очистки (например, для уменьшения общего количества некоторых иммунодоминантных остаточных белков клетки-хозяина).

Перекрыстная контаминация целевым белком

Существенным фактором риска при получении антигенов, используемых в качестве реактивов, является контаминация целевым белком с последующей перекрыстной реакцией с поликлональными антителами, что необходимо учитывать при организации производственного и лабораторного процессов. По этой причине при получении антигенов максимально используют специальное или одноразовое оборудование. Когда это невозможно, оборудование должно быть очищено соответствующим образом.

Определение характеристик и испытания

Перед использованием антигенов для иммунизации, в них определяют общее содержание белка и подтверждают отсутствие целевого белка.

Сравнение совокупности белков клетки-хозяина, полученных в результате имитированного и предполагаемого производственных процессов, выполняют, как правило, при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом и (или) двумерного электрофореза с высокочувствительным красителем. Сравнение должно показать, что антигены, полученные при имитации процесса, содержат большинство видов белков клетки-хозяина предполагаемого производственного процесса. При необходимости дополнительная информация может быть получена с помощью ортогональных методов (например, масс-спектрометрии).

ПЛАТФОРМЕННЫЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ

НУЛЕВАЯ КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ

Разработка платформенного метода количественного определения остаточных белков клетки-хозяина включает выбор нулевой клеточной линии, не содержащей ген экспрессии целевого продукта, и использование одного и того же вида клетки-хозяина. Нулевая клеточная линия может быть не трансфицированной или ложно трансфицированной и может быть использована для производства антигенов для продуктов данной производственной площадки производителя.

ИМИТАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ПРОЦЕССА

Наработка биоматериала, содержащего целевой белок

Антигены для испытаний с использованием платформенного метода получают с помощью имитации производственного процесса, используемого для нескольких продуктов, обычно с использованием одних и тех же компонентов среды. При любой имитации производства используемый процесс должен быть максимально приближен к предполагаемому производственному процессу, так как это может повлиять на совокупность видов белков клетки-хозяина (см. раздел *Процесс-специфичные методы количественного определения остаточных белков* данной общей фармакопейной статьи).

Процесс выделения и очистки целевого белка

Как и для других методов количественного определения, антигены белков клетки-хозяина, полученные на технологической стадии наработки биоматериала, как правило, обрабатывают лишь в минимальной степени (например, без стадий очистки или с ограниченным количеством стадий) для получения широкого спектра белков клетки-хозяина, в то же время стратегии смешивания и объединения также могут использоваться для расширения спектра видов белков клетки-хозяина.

Определение характеристик и испытания

Определяют общее содержание белка и подтверждают отсутствие целевого белка. Сравнивают белки клетки-хозяина, полученные при имитации процесса и в предполагаемом производственном процессе.

ОБЩИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Общий метод количественного определения разрабатывает производитель коммерческого набора реактивов. Подробная информация по производству реактивов может быть не раскрыта. Например, клеточная культура может быть получена из смеси штаммов экспрессирующих клеток одного типа (вида), а используемый процесс (процессы) может не совпадать с процессом, применяемым для конкретного лекарственного средства. Общий метод количественного определения должен быть выбран с учетом предполагаемого конкретного производственного процесса (например, подходящая линия клетки-хозяина) и надлежащим образом валидирован для целевого продукта и этапа разработки.

Если общий метод количественного определения применяют на более поздних этапах разработки или во время промышленного производства, целесообразно валидировать методику количественного определения и контролировать постоянство состава реактивов от серии к серии используя либо соответствующие предшествующие фракции из производственного процесса, либо образец продукта, полученный при имитации процесса с использованием нулевой клеточной линии.

ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК АНТИТЕЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ РЕАКТИВОВ

ПРОЦЕСС-СПЕЦИФИЧНЫЕ И ПЛАТФОРМЕННЫЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Иммунизация

Для получения поликлональных антител иммунизируют один или несколько подходящих видов животных. Основной задачей иммунизации является получение высокоспецифичных поликлональных антител, чувствительных к каждому из антигенных белков в смеси белков клетки-хозяина, используемой в качестве иммуногена. Иммунный ответ животного должен индуцироваться как высокоиммунными, так и низкоиммунными антигенами.

Выбирают вид животного, позволяющее получить достаточное количество и разнообразие

специфического к белкам клетки-хозяина иммуноглобулина G.

Если поликлональные антитела для образования иммунного комплекса антиген – антитело (первичные антитела) и для детекции результатов реакции (вторичные антитела) получены из одного и того же источника, можно предположить, что при проведении количественного определения они распознают разные эпитопы на одном и том же белке клетки-хозяина. Альтернативно можно использовать поликлональные антитела к белкам клетки-хозяина от разных видов животных. Использование нескольких животных для каждого из данных видов позволяет уменьшить влияние индивидуальной изменчивости иммунной системы и обеспечить дополнительное разнообразие ответов, что будет способствовать максимальному охвату антителами против антигенов белков клетки-хозяина.

В случае ограниченного количества антигенов, использование адъювантов сокращает время формирования иммунного ответа. В случае сложного состава смеси антигенов может потребоваться дифференциальное усиление иммунного ответа к низкоиммуногенным антигенам или к антигенам в более низких концентрациях.

Для достижения максимального иммунного ответа может потребоваться несколько циклов иммунизации, и, в зависимости от частоты иммунизации, процесс может занять от 3 до 6 месяцев.

Иммунный ответ на белки клетки-хозяина для конкретной схемы иммунизации контролируют путем определения титра антител с использованием, например, ИФА, и путем сравнения результатов одно- или двумерного электрофореза после окрашивания белков и вестерн-блоттинга, где в качестве первичных антител используют поликлональные антитела к белкам клетки-хозяина. На практике некоторые белки, вызывающие сильный иммунный ответ, могут быть не видны в геле при окрашивании, а некоторые белки со слабыми антигенными свойствами, обнаруживаемые при окрашивании белков, могут не вызывать детектируемый иммунный ответ. В мультиплексных иммунологических испытаниях для достижения линейности при разведении образца важно, чтобы реактив, содержащий антитела, одновременно и специфически распознавал как можно больше отдельных молекул в образце, и присутствовал в стехиометрическом избытке. Для этой цели серии разведений испытуемых образцов, полученных на разных стадиях производственного процесса, предварительно оцени-

вают с помощью твердофазного ИФА, используя для этого очищенные антитела белков клетки-хозяина, показавшие высокую эффективность в вестерн-блоттинге.

На основании результатов описанных выше испытаний антисыворотки от разных животных объединяют, повторно испытывают и очищают.

Очистка и подготовка

Антитела к белкам клетки-хозяина должны быть очищены. Как правило, применяют аффинную хроматографию на основе связывания с белком А или белком G и (или) аффинную хроматографию на основе антигена белка клетки-хозяина.

Может потребоваться дополнительная очистка для удаления потенциальных агрегатов с помощью эксклюзионной хроматографии.

Для ИФА часть очищенных антител к белкам клетки-хозяина конъюгируют с меткой, необходимой для детекции результатов реакции (например, биотином или пероксидазой хрена).

Очищенные антитела к белкам клетки-хозяина и антисыворотки хранят при температуре, обеспечивающей их стабильность.

Определение характеристик и испытания

Полученные и используемые в качестве реактивов поликлональные антитела должны обеспечивать связывание максимального спектра белков антигена и не давать перекрестной реакции с целевым белком. Их пригодность оценивают путем подтверждения охвата белков клетки-хозяина, характерных для производственного процесса.

Для этого проводят двумерный электрофорез антигенов белков клетки-хозяина. Полученный белковый профиль после иммуноокрашивания сравнивают с белковым профилем, полученным при окрашивании неселективным красителем. Антитела к белкам клетки-хозяина должны распознавать широкий спектр белков клетки-хозяина при любых зарядах и молекулярных размерах. Могут быть рассмотрены другие подходящие методы.

ОБЩИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Иммунизацию, очистку и производство антител к белкам клетки-хозяина выполняет производитель коммерческого набора реактивов, и подробная информация по производству может быть не представлена. В большинстве случаев возможен лишь ограниченный контроль

за постоянством качества реактивов от серии к серии, в связи с чем необходимо проводить соответствующие сравнительные испытания серий.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

Метод твердофазного ИФА для определения остаточных белков клетки-хозяина разработан с целью обнаружения и количественного определения гетерогенной смеси антигенов, содержащихся в различных концентрациях, с помощью антител, добавляемых в соотношении не один к одному. Ниже описаны требования к разработке и валидации данного типа ИФА.

Методику испытания на остаточные белки клетки-хозяина методом ИФА, валидируют по характеристикам: правильность, специфичность, прецизионность, предел количественного определения, предел обнаружения, линейность, диапазон применения и робастность. В течение жизненного цикла лекарственного препарата может потребоваться полная или частичная повторная валидация методики, например, при внесении изменений в производственный процесс, которые могут повлиять на пригодность антигенов.

ПРАВИЛЬНОСТЬ

Правильность подтверждают методом добавок и открываемости стандартного образца белка клетки-хозяина в соответствующем «фоновой» матрице (например, активная фармацевтическая субстанция или образец с соответствующего этапа очистки).

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность подтверждают отсутствием интерференции со стороны матрицы (например, содержащей активную фармацевтическую субстанцию). Для оценки специфичности могут быть использованы результаты проверки правильности.

ПРЕЦИЗИОННОСТЬ

Повторяемость, промежуточная прецизионность и воспроизводимость должны быть соответствующим образом подтверждены.

ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Чувствительность обычно находится в диапазоне частот на миллион (ppm) и выражается через предел количественного определения. Предел количественного определения как правило определяют методом добавок белков клетки-хозяина в активную фармацевтическую субстанцию или в соответствующую пробу матрицы и рассчитывают на основе минимальной добавки, обеспечивающей отклик с заданной правильностью и прецизионностью.

Предел обнаружения чаще всего не определяют, так как он не является обязательным параметром валидации.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Линейность методики количественного определения остаточных белков клетки-хозяина подтверждают с помощью серии разведений стандартного образца белка клетки-хозяина и изучения правильности.

В силу особенностей количественного определения остаточных белков клетки-хозяина, большим количеством видов белков и поликлональных антител белков клетки-хозяина, может наблюдаться нелинейность при разведениях образцов. Например, полученные путем обратных вычислений результаты возрастают по мере роста числа разведений образцов. В большинстве случаев это связано с избытком одного или нескольких отдельных белков клетки-хозяина в образце по сравнению с доступным количеством антител в ИФА белков клетки-хозяина. Как следствие, необходимо оценить линейность при разведениях для соответствующих стадий процесса путем сравнения целевой и измеренной концентрации остаточных белков клетки-хозяина при разной степени разведения пробы. Линейность методики считается подтвержденной, если для разных разведений образца соблюдаются критерии приемлемости. Исследования, подтверждающие линейность при разведениях образца, можно проводить при разработке метода или на этапе валидации.

Если при разведении образца отмечают отсутствие линейности, делают многократные разведения вне границ диапазона, в котором обнаруживается нелинейность.

Окончательное содержание остаточных белков клетки-хозяина обычно выражают как среднюю концентрацию белков клетки-хозяина, полученную как минимум для двух разведений в пределах линейного диапазона. При соответствующем обосновании может быть достаточно одного разведения.

ДИАПАЗОН ПРИМЕНЕНИЯ

Диапазон применения методики обычно определяют по концентрациям остаточных белков клетки-хозяина, для которых был показан подходящий уровень прецизионности, правильности и линейности.

РОБАСТНОСТЬ

Оценка робастности проводится на этапе разработки методики.

ЗАМЕНА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И (ИЛИ) ИСПОЛЬЗУЕМЫХ РЕАКТИВОВ

Количество антигенов и антител должно быть достаточным, чтобы обеспечить возможность проведения испытания на остаточные белки клетки-хозяина в течение нескольких лет. Следовательно, обеспеченность и постоянство качества реактивов должны надлежащим образом управляться на протяжении всего жизненного цикла испытания.

Для общего метода количественного определения остаточных белков клетки-хозяина, чтобы убедиться в постоянстве качества реактивов, может потребоваться повторная проверка пригодности или повторная валидация методики для каждой новой серии реактива, поскольку их качество может меняться от одной серии к другой.

Для процесс-специфичных и для платформенных методов количественных определений необходимость в новых сериях реактивов для испытания на белки клетки-хозяина может возникнуть в двух основных случаях:

- исчерпаны запасы стандартного образца белков клетки-хозяина и (или) антител; в таком случае антитела могут быть выделены из запаса замороженной сыворотки или требуется новая иммунизация;
- изменение производственного процесса может повлиять на совокупность видов белков

клетки-хозяина, присутствующих в очищенных промежуточных продуктах или активной фармацевтической субстанции; реактив для испытания может не подходить для обнаружения и количественного определения модифицированных белков клетки-хозяина; поэтому изменение производственного процесса может обусловить непригодность реактивов для использования в испытании.

Вновь приготовленные реактивы должны быть тщательно охарактеризованы (например, сочетанием методов двумерного элек-

трофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом и вестерн-блоттинга или сочетанием методов двумерного электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом с дифференциальным гель-электрофорезом и идентификацией с помощью масс-спектрометрии). Необходимо оценить валидационные характеристики методики с использованием новых реактивов. Проверку новых реактивов рекомендуется проводить параллельно с имеющимися ранее одобренными реактивами.

Таблица 2.1.6.20.-1. – Рекомендации по оценке пригодности реактивов и оценке валидационных характеристик методики испытания в случае истощения запаса используемых реактивов или внесения изменения в производственный процесс

	Реактив		Изменения в производственном процессе
	антигены или стандартный образец белка (белков) клетки-хозяина	антитела к белкам клетки-хозяина	
Оценка пригодности	<p>Концентрацию белка в новой серии реактива предпочтительно определять с использованием тех же методов, что и для текущей (одобренной) серии реактива, чтобы обеспечить сопоставимость концентраций белка. С помощью подходящих методов (например, одно- или двумерный электрофорез, двумерный дифференциальный гель-электрофорез) оценивают сходство совокупностей видов белков между новой серией и текущей (одобренной) серией реактивов.</p>	<p>Определяют общую концентрацию белка новой серии антител. Конечную концентрацию для количественного определения необходимо установить для новой серии, чтобы получить такую же калибровочную кривую, что и для текущей (одобренной) серии реактива. Для детектирующих антител с меткой (вторичные антитела) контролируют стехиометрию белков для подтверждения аналогичности текущей (одобренной) серии антител. Иммунореактивность новой серии антител сравнивают качественно (визуальное сравнение) или полуколичественно (определение области охвата) с текущей (одобренной) серией подходящими методами (например, одно- или двумерный вестерн-блоттинг). Из-за изменчивости методики настоятельно рекомендуется проводить эту проверку пригодности параллельно с текущей (одобренной) серией антител.</p>	<p>Эффекты изменений производственного процесса, которые могут повлиять на совокупность видов белков клетки-хозяина, проверяют подходящими методами (например, одно- или двумерный электрофорез, вестерн-блоттинг, количественное определение белков клетки-хозяина).</p> <p>Если изменение производственного процесса не приводит к соответствующему изменению совокупности видов белков клетки-хозяина, текущие (одобренные) реактивы подходят для нового производственного процесса. Если изменение производственного процесса приводит к соответствующему изменению совокупности видов белков клетки-хозяина, но была подтверждена пригодность текущих (одобренных) реактивов, то текущие (одобренные) реактивы подходят для нового производственного процесса. Если изменение производственного процесса приводит к соответствующему изменению совокупности видов белков клетки-хозяина, и было показано, что текущие (одобренные) реактивы не подходят для нового производственного процесса, необходимо разработать новую методику испытания, включая пробную ферментацию в соответствии с новым производственным процессом и новую иммунизацию.</p>

Таблица 2.1.6.20.-1. – Продолжение

	Реактив		Изменения в производственном процессе
	антигены или стандартный образец белка (белков) клетки-хозяина	антитела к белкам клетки-хозяина	
Испытание реактивов для количественного определения остаточных белков клетки-хозяина	Новую серию реактива испытывают в сравнении с текущей (одобренной) серией реактива с использованием метода добавок при различных концентрациях в пределах диапазона применения методики. Сравнивают сходимость калибровочных кривых, полученных с использованием новой серии реактива и текущей (одобренной) серии реактива.	Сравнивают калибровочные кривые, полученные при использовании новых и текущих (одобренных) серий антител. Совершенное исследование проводят с испытанием соответствующих технологических образцов (например, начиная от стадии очистки до получения активной фармацевтической субстанции). В параллельном эксперименте новая серия антител должна обнаруживать белки клетки-хозяина на разных этапах процесса в той же концентрации или ниже, что обнаруживает текущая (одобренная) серия антител.	Сбор, полученный в пробном этапе нового процесса, проверяют на открываемость добавки с использованием текущей методики количественного определения остаточных белков клетки-хозяина. Образцы, соответствующие стадии производственного процесса (например, начиная от стадии очистки сбора до получения активной фармацевтической субстанции) из нового и текущего процессов проверяют параллельно.

Таблица 2.1.6.20.-1. – Продолжение

	Реактив		Изменения в производственном процессе
	антигены или стандартный образец белка (белков) клетки-хозяина	антитела к белкам клетки-хозяина	
Оценка валидационного статуса	<p>Если проверка пригодности реактивов и испытания ИФА показали соответствие нового стандартного образца белка (белков) клетки-хозяина, текущий (одобренный) стандартный образец может быть заменен. Повторная валидация методики испытания не требуется.</p> <p>Если новая серия антител значитель но отличается по иммунореактивности вестерн-блоттинга или чувствительности иммуноанализа и (или) по рабочим характеристикам в количественном определении от текущей (одобренной) серии антител, требуется повторная валидация методики.</p>	<p>Если проверка пригодности реактивов и испытания ИФА показывают соответствие новой серии антител, текущая (одобренная) серия антител может быть заменена. Повторная валидация методики испытания не требуется.</p> <p>Если новая серия антител значитель но отличается по иммунореактивности вестерн-блоттинга или чувствительности иммуноанализа и (или) по рабочим характеристикам в количественном определении от текущей (одобренной) серии антител, требуется повторная валидация методики.</p>	<p>Если для нового производственного процесса текущая (одобренная) серия антител показывает аналогичную или более высокую иммунореактивность по сравнению с предыдущим процессом, и результаты количественного определения остаточных белков клетки-хозяина подтверждают приемлемую открываемость белков клетки-хозяина из пробного сбора нового процесса, а также аналогичную или более высокую чувствительность для образцов из соответствующих стадий производственного процесса, то текущая методика количественного определения и реактивы считаются подходящими для нового процесса. Повторная валидация методики испытаний не требуется.</p> <p>Если ИФА обнаруживает существенные различия в открытости добавки белков клетки-хозяина или в определяемых концентрациях белков клетки-хозяина на отдельных стадиях для текущего и нового процессов, при том, что реактивы признаны подходящими, требуется повторная валидация методики. Изменение производственного процесса может также повлиять на линейность разведения испытуемых образцов из отдельных стадий производственного процесса; если эти стадии являются критическими с точки зрения стратегии контроля содержания остаточных белков клетки-хозяина, может потребоваться повторная валидация или даже создание новых реактивов антител.</p> <p>В случае существенного изменения совокупности видов белков клетки-хозяина в новом производственном процессе, которое приводит либо к несоответствию совокупности видов белков по сравнению с текущим (одобренным) стандартным образцом (антигенами), либо к снижению иммунореактивности антител, либо к значительному снижению чувствительности иммунологического анализа, готовят новые реактивы для анализа и проводят валидацию методики анализа с использованием новых реактивов.</p>

201060021-2023

2.1.6.21. ПРИМЕНЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

Настоящая общая фармакопейная статья приводится для информации.

1. ВВЕДЕНИЕ

Эндоотоксины грамотрицательных бактерий являются самой распространенной причиной токсических реакций, возникающих в результате загрязнения фармацевтической продукции пирогенами; их общая пирогенная активность намного выше, чем у других известных пирогенных веществ. Бактериальные эндоотоксины представляют собой липополисахариды, которые являются термостабильным компонентом наружной части клеточной стенки всех грамотрицательных микроорганизмов. Существует лишь небольшое количество пирогенов, обладающих иной структурой. В целом, по отсутствию бактериальных эндоотоксинов в субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственном препарате можно сделать вывод об отсутствии пирогенных веществ при условии, что наличие пирогенов неэндоотоксиновой природы исключено. Испытания на пирогенность (2.1.6.2) и на активацию моноцитов (2.1.6.13) являются подходящими методами для определения отсутствия пирогенов неэндоотоксиновой природы в субстанции для фармацевтического применения и лекарственном препарате.

Присутствие бактериальных эндоотоксинов может быть замаскировано факторами, влияющими на реакцию между эндоотоксинами и лизатом амебоцитов мечехвоста. На обнаружение эндоотоксинов могут влиять условия и (или) время хранения образцов и реактивов. Следовательно, перед проведением испытания на бактериальные эндоотоксины или перед выбором между испытаниями на бактериальные эндоотоксины и на пирогенность или на активацию моноцитов, необходимо подтвердить возможность его проведения для конкретной субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственно-

го препарата; при этом может быть необходимо выполнение процедуры устранения мешающих факторов.

Согласно указаниям общей фармакопейной статьи 2.1.6.8. *Бактериальные эндоотоксины*, при проведении испытания должны быть выполнены следующие условия:

- подтвержденное отсутствие влияния материалов, используемых в испытании. Должно быть показано отсутствие эндоотоксинов в воде для испытания на бактериальные эндоотоксины, других реактивах и расходных материалах. Также, должна быть подтверждена чувствительность лизата амебоцитов, заявленная производителем;

- чувствительность лизата амебоцитов определенная как в присутствии, так и в отсутствии испытуемого образца, в связи с возможным влиянием на испытание. Между двумя полученными значениями чувствительности не должно быть значимой разницы.

В общей фармакопейной статье 2.1.6.8. *Бактериальные эндоотоксины* представлены методы удаления мешающих факторов; в случае использования других методов должно быть проведено дополнительное испытание для подтверждения нейтрализации или удаления мешающих факторов.

В данной общей фармакопейной статье приведены причины установления требований к испытаниям на бактериальные эндоотоксины, а также разъяснения по расчетам и интерпретации результатов.

Замена испытания *Пирогенность*, указанного в частной фармакопейной статье, на испытание *Бактериальные эндоотоксины* или другие методы, например, испытание на активацию моноцитов или испытание с использованием рекомбинантного фактора С, требует подтверждения возможности проведения метода для конкретной субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственного препарата и получения соответствующего результата альтернативным методом, в соответствии с указаниями раздела 1. *Общие сведения* Фармакопеи Союза (см. также раздел 13 данной общей фармакопейной статьи).

Метод определения бактериальных эндоотоксинов может быть указан в частной фармакопейной статье. Если метод не указан, используют любой из методов от А до F общей фармакопейной статьи 2.1.6.8. *Бактериальные эндоотоксины*.

2. МЕТОДЫ И КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

2.1. МЕТОДЫ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Добавление бактериальных эндотоксинов к лизату амебоцитов может привести к помутнению, осаждению или гелеобразованию (гель-тромб). Первоначально, только гель-тромб метод применяли для оценки качества субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственного препарата при проведении испытания на бактериальные эндотоксины. Преимущество метода заключалось в простоте принятия решения о качестве испытуемого образца по результатам испытания на основании отсутствия или присутствия плотного геля, видимого невооруженным глазом. Количественные фотометрические методы С, D, E и F были разработаны позднее: данные методы требуют оснащения соответствующим оборудованием, но могут быть автоматизированы для рутинных испытаний большого количества образцов одной и той же субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственного препарата.

Бактериальные эндотоксины могут адсорбироваться на поверхности пробирок или пипеток из определенных полимерных материалов или типов стекла. Мешающие факторы могут появиться вследствие высвобождения веществ из полимерных материалов. Следовательно, используемое оборудование должно быть проверено.

2.2. ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

Решение использовать в испытании на бактериальные эндотоксины методы качественного анализа подразумевает, во-первых, установление предельного содержания эндотоксинов для субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственного препарата, подлежащих исследованию, и, во-вторых, проведение испытания с целью получения информации будет ли концентрация эндотоксинов в испытуемом образце ниже или выше установленного предельного содержания эндотоксинов.

Количественные фотометрические методы С, D, E и F позволяют определить содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце, но для соответствия фармакопейным требованиям и при рутинном контроле качества

основной вопрос заключается в том, превышает ли это значение допустимое предельное содержание эндотоксинов.

При установлении предельного содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственном препарате следует учитывать его терапевтическую дозу и пути введения. При установлении предельного содержания эндотоксинов в субстанции для фармацевтического применения следует использовать рекомендации по применению и дозированию лекарственного препарата, в состав которого она входит.

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов определяет допустимую концентрацию эндотоксинов в лекарственном препарате. Если содержание эндотоксинов не превышает этого показателя, то даже при введении пациенту максимальной дозы лекарственного препарата в течение часа предполагаемым путем не возникает токсической реакции, обусловленной эндотоксинами.

Методы качественного анализа в испытаниях на бактериальные эндотоксины не позволяют установить различия между содержанием эндотоксинов равным предельному содержанию или выше его. Образование плотного геля происходит, если содержание эндотоксинов в испытуемом образце достигает значения предельного содержания эндотоксинов и когда превышает его. В обоих случаях испытуемый образец не выдерживает испытание. Только при отсутствии образования плотного геля можно сделать вывод, что содержание эндотоксинов ниже предельного содержания эндотоксинов.

Для испытуемых образцов в твердом состоянии предельное содержание эндотоксинов на единицу массы или международную единицу активности лекарственного средства должно быть преобразовано в содержание бактериальных эндотоксинов на миллилитр испытуемого раствора, поскольку данное испытание может быть проведено только в растворе. Лекарственные препараты в жидком состоянии (например, растворы для инфузий) обсуждаются ниже, в разделе 2.5 данной общей фармакопейной статьи.

2.3. ВЫЧИСЛЕНИЕ ПРЕДЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОТОКСИНОВ

Для лекарственных препаратов, вводимых парентерально, предельное содержание

эндотоксинов, определенное на основе дозы, рассчитывают по формуле:

$$\text{ПСЭ} = \frac{K}{M}$$

где: K — предельная пирогенная доза эндотоксина на килограмм массы тела;

M — максимальная разовая доза лекарственного препарата на килограмм массы тела.

Если лекарственный препарат вводится с частыми интервалами или инфузионно, величина M соответствует общей максимальной дозе, вводимой в течение 1 ч.

Предельное содержание эндотоксинов зависит от лекарственного препарата, пути его введения и может быть указано в некоторых частных фармакопейных статьях.

Значения предельной пирогенной дозы бактериальных эндотоксинов (K) приведены в таблице 2.1.6.21.-1.

**2.4. РЕКОМЕНДАЦИИ
ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛЬНОГО
СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОТОКСИНОВ
В КОНКРЕТНОЙ СУБСТАНЦИИ
ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО
ПРИМЕНЕНИЯ
ИЛИ ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ**

Допустимое предельное содержание эндотоксинов в субстанции для фармацевтического

применения или лекарственном препарате устанавливают с учетом следующих аспектов.

Расчет предельного содержания эндотоксинов

Предельное содержание эндотоксинов рассчитывают, как описано в разделе 2.3 данной общей фармакопейной статьи. Показатель определяет границу безопасности, которую нельзя превышать, если лекарственное средство предназначено для медицинского применения.

Значение предельного содержания эндотоксинов, указанное в частной фармакопейной статье

Обычно отражает достижимое в контролируемом производственном процессе содержание эндотоксинов в субстанции для фармацевтического применения или лекарственном препарате. Следовательно, значения предельного содержания эндотоксинов, указанное в частной фармакопейной статье, может быть меньше рассчитанного предельного содержания эндотоксинов. Производитель может установить более жесткие требования к предельному содержанию эндотоксинов, чем указанные в частной фармакопейной статье.

Возможности производственного процесса

Производственный процесс может обеспечивать снижение концентрации или удаление бактериальных эндотоксинов и соответственно приводить к более низким значениям предельного содержания эндотоксинов.

Дополнительные требования безопасности

Меры предосторожности принимают с учетом популяции пациентов (например, использо-

Таблица 2.1.6.21.-1. — Значения предельной пирогенной дозы бактериальных эндотоксинов

Путь введения	K
внутривенный	5,0 МЕ/кг (международных единиц эндотоксина на килограмм массы тела)
внутривенный, для радиофармацевтических лекарственных препаратов	2,5 МЕ/кг (международных единиц эндотоксина на килограмм массы тела)
интратекальный	0,2 МЕ/кг (международных единиц эндотоксина на килограмм массы тела)
интратекальный, для радиофармацевтических лекарственных препаратов	14 МЕ/V МЕ/мл (международных единиц эндотоксина на максимальную рекомендуемую дозу (объем)), где V максимальная рекомендуемая доза (объем)
парентеральный, для лекарственных препаратов, вводимых в дозе, рассчитываемой на квадратный метр поверхности тела	100 МЕ/м ² (международных единиц эндотоксина на квадратный метр поверхности тела)

Примечание.

Одна международная единица (МЕ) эндотоксина соответствует одной единице эндотоксина (ЕЭ).

вание в педиатрии, для пациентов с истощением или кахексией и т.д.), конкретных региональных требований (например, использование при расчетах предельного содержания эндотоксинов более низкой средней массы тела, 60 кг вместо 70 кг) или любые дополнительные меры безопасности, запрошенные уполномоченным органом.

Состав

При установлении значения предельного содержания эндотоксинов необходимо учитывать любую теоретическую эндотоксиновую нагрузку, вносимую любыми компонентами, используемыми для растворения и (или) разведения (например, вода для инъекций) субстанции для фармацевтического применения или лекарственного препарата, или получаемую от исходных материалов и (или) исходного сырья.

2.5. МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМОЕ РАЗВЕДЕНИЕ

В данном разделе рассматривают вопросы: какое разведение субстанции для фармацевтического применения или лекарственного препарата следует использовать в испытании для получения подтверждения, что при отрицательном результате содержание эндотоксинов в испытуемом образце меньше предельного содержания эндотоксинов, а при положительном результате равно или превышает допустимое предельное содержание.

Максимально допустимое разведение (МДР) представляет собой наибольшее разведение испытуемого образца, при котором может быть определено предельно допустимое содержание эндотоксинов. Оно зависит от предельного содержания эндотоксинов и чувствительности лизата амебоцитов (предела обнаружения). МДР рассчитывают по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{ПСЭ} \cdot \text{С}}{\lambda}$$

где: ПСЭ — предельное содержание эндотоксинов;
 С — концентрация испытуемого раствора;
 λ — чувствительность лизата амебоцитов в международных единицах в миллилитре.

Концентрацию испытуемого раствора выражают в единицах:

– мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов указано в массовых единицах (МЕ/мг);

– ЕД/мл, если предельное содержание эндотоксинов указано в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/ЕД);

– мл/мл, если предельное содержание эндотоксинов указано в объемных единицах (МЕ/мл).

Предел обнаружения (λ) представляет собой чувствительность лизата в гель-тромб методе (МЕ/мл), заявленную производителем лизата амебоцитов, или самую низкую концентрацию эндотоксинов, определенную по стандартной калибровочной кривой в турбидиметрическом или хромогенном методах. Если значение МДР не является целым числом, для рутинных испытаний можно использовать подходящее целое число, меньшее, чем МДР (приготовление раствора испытуемого образца в меньшем разведении, чем МДР). В таком случае, отрицательный результат означает, что содержание бактериальных эндотоксинов ниже допустимого предельного содержания. Если содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце ниже допустимого предельного содержания эндотоксинов, но достаточно велико, чтобы вызвать гелеобразование лизатом амебоцитов, то испытание в таких условиях может быть положительным. Следовательно, когда в испытании с использованием «рабочего» разведения, кратность которого меньше МДР, получен положительный результат, испытуемый образец разводят до МДР и повторяют испытание. В любом сомнительном или спорном случае необходимо использовать МДР. Данный факт подчеркивает важность подтверждения чувствительности лизата амебоцитов.

Пример

Необходимо провести испытание раствора 50 мг/мл натрия фенитоина (для внутривенного введения). Определяют МДР, используя следующие данные:

M — максимальная доза для человека 15 мг/кг;
 C — концентрация испытуемого раствора 50 мг/мл;

K — предельная пирогенная доза эндотоксинов 5 МЕ/кг;

λ — предел обнаружения 0,4 МЕ/мл.

$$\text{МДР} = \frac{5 \cdot 50}{15} \cdot \frac{1}{0,4} = 41,67$$

Для рутинных испытаний данного лекарственного препарата 1 мл испытуемого раствора разводят до 20 мл (МДР/2 округляют до ближайшего меньшего целого числа). В случае, если результат испытания будет положительным, то 1 мл испытуемого раствора следует развести до 41,67 мл и повторить испытание. Разведение до 41,67 мл также необходимо, когда испытание проводят в спорных случаях.

3. ОЦЕНКА РИСКА

Отсутствие бактериальных эндотоксинов в субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственном препарате, как указано в разделе 1 данной общей фармакопейной статьи, позволяет сделать вывод об отсутствии пирогенов при условии исключения присутствия пирогенов неэндотоксиновой природы.

Для подтверждения отсутствия неэндотоксиновых пирогенов в субстанциях для фармацевтического применения и (или) лекарственных препаратах рекомендуется использовать испытания на пирогенность (2.1.6.2) или на активацию моноцитов (2.1.6.13) при выпуске или в ходе разработки производственного процесса. Если в производственный процесс вносят какие-либо изменения, способные повлиять на качество субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственного препарата в отношении пирогенности, испытания выбранным методом повторяют. Например, к таким изменениям относят использование другого исходного сырья, другой производственной площадки и других параметров процесса.

Решение об использовании испытания на бактериальные эндотоксины в качестве единственного испытания на пирогенность необходимо принимать после тщательной оценки риска для субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственного препарата, содержащих пирогены неэндотоксиновой природы. Оценку риска проводят с учетом любого фактора, способного привести к включению пирогенов, не обнаруживаемых при испытании на бактериальные эндотоксины.

Далее представлен перечень факторов, которые необходимо учитывать при оценке риска. Список не является исчерпывающим, при необходимости может быть дополнен.

Производство (химический синтез, ферментация, биотехнологический метод). Для продук-

тов ферментации учитывают экспрессионную систему: прокариотическая или эукариотическая и, в случае использования прокариотической системы, – грамположительные или грамотрицательные бактерии. Кроме того, рассматривают компоненты питательных сред с учетом их происхождения (синтетические, животного или растительного происхождения).

Бионагрузка. Должно быть учтено потенциальное присутствие дрожжевых грибов и грамположительных бактерий в качестве контаминантов активной фармацевтической субстанции, вспомогательных веществ или исходных материалов и исходного сырья, используемых при производстве лекарственного препарата, а также происхождение сырья (синтетическое, животного или растительного происхождения). Качество воды также играет важную роль в общей оценке риска.

Возможности последующей стадии производственного процесса. Необходимо подтвердить, удаляются ли бактериальные эндотоксины на последующих стадиях производственного процесса.

Безопасность. При оценке риска необходимо учитывать целевую популяцию и путь введения (например, внутривенно, интратекально и др.).

Стабильность обнаружения эндотоксинов. Следует учитывать, что на возможность обнаружения эндотоксинов оказывают влияние взаимодействие с определенными компонентами, условия или время хранения, температура, пробоподготовка испытуемого образца. Должны быть установлены процедуры хранения, пробоподготовки и смешивания образцов, подтверждающие отсутствие влияния на стабильность обнаружения бактериальных эндотоксинов.

4. СТАНДАРТЫ ЭНДОТОКСИНА

В качестве стандартного образца может быть использован стандартный образец, с содержанием бактериальных эндотоксинов, выраженным в международных единицах эндотоксина на упаковку, калиброванный относительно международного стандартного образца, например, *СО ФЕАЭС эндотоксина*.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца эндотоксина, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Одна международная единица

(МЕ) эндотоксина соответствует одной единице эндотоксина (ЕЭ).

5. ВОДА ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

Вода для испытания на бактериальные эндотоксины представляет собой стерильную воду, не содержащую эндотоксинов в количествах, определяемых в испытании. Обычно она коммерчески доступна и сертифицирована.

Для подготовки воды для испытания на бактериальные эндотоксины помимо тройной дистилляции могут быть использованы и другие методы. Приемлемые результаты дает метод обратного осмоса, в некоторых случаях предпочтительнее проведение процесса дистилляции более трех раз. Независимо от используемого метода, полученная вода не должна содержать поддающиеся обнаружению бактериальные эндотоксины.

6. pH СМЕСИ

В испытании на бактериальные эндотоксины оптимальное образование плотного геля происходит при pH (6,0 – 8,0). Следует учитывать, что добавление лизата амебоцитов в испытуемый образец может приводить к снижению значения pH.

7. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ЗАЯВЛЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛИЗАТА АМЕБОЦИТОВ

При приготовлении растворов лизата амебоцитов следуют инструкции производителя. Концентрации эндотоксинов в конечной точке реакции для каждого из разведений в гель-тромб методах А и В преобразуют в логарифмы. Необходимость преобразования заключается в том, что построенный график частотного распределения логарифмических значений, обычно гораздо ближе к кривой нормального распределения, чем частотное распределение самих коэффициентов разведения; фактически они настолько близки, что допустимо использовать нормальное распределение в качестве математической модели и вычисление доверительного интервала с помощью *t*-критерия Стьюдента.

8. ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ НА МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Испытания на присутствие бактериальных эндотоксинов не могут быть проведены без дополнительной подготовки, если:

- испытуемый образец не смешивается с реактивами;
- pH раствора испытуемого образца нельзя довести до значения 6,0 – 8,0;
- испытуемый образец ингибирует или активизирует ферментативную реакцию (например, испытуемый образец содержит β-D-глюканы).

Необходимо проводить предварительное испытание на наличие мешающих факторов. В случае обнаружения мешающих факторов необходимо доказать эффективность процедуры их удаления и отсутствие влияния процедуры на любые присутствующие бактериальные эндотоксины.

Целью предварительного испытания является проверка нулевой гипотезы, что чувствительность лизата амебоцитов в присутствии испытуемого образца не отличается от чувствительности лизата амебоцитов в отсутствие испытуемого образца. В методах А и В нулевую гипотезу принимают, если чувствительность лизата амебоцитов в присутствии испытуемого образца составляет не менее 0,5 и не более 2 от чувствительности лизата амебоцитов в отсутствие испытуемого образца.

В испытаниях на присутствие мешающих факторов методами А и В необходимо использование испытуемого образца, в котором эндотоксины не обнаруживаются. Это представляет собой теоретическую проблему при испытании новых лекарственных средств. В связи с этим, для количественных фотометрических методов С, D, E и F используют другой подход.

Следует обратить внимание, что для проведения испытания методами D и E, в которых используют хромогенный пептид, необходимы реактивы, не используемые в методах А, В, С и F. Следовательно, соответствие методов А, В, С или F требованиям к мешающим факторам нельзя без экспериментального подтверждения экстраполировать на метод D или метод E.

9. УСТРАНЕНИЕ МЕШАЮЩИХ ФАКТОРОВ

Методики устранения мешающих факторов не должны приводить к увеличению или уменьшению (например, вследствие адсорбции) количества бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце. Корректный способ проверки эффективности нейтрализации мешающих факторов состоит в применении метода добавок, который представляет собой добавление к испытуемому образцу известного количества бактериальных эндотоксинов с последующим измерением их открываемости.

Методы С и D. Если мешающие факторы обусловлены природой субстанции для фармацевтического применения или лекарственного препарата и не могут быть устранены общепринятыми методами (например, разведением или центрифугированием), возможно построение калибровочной кривой с использованием испытуемого образца той же субстанции для фармацевтического применения или лекарственного препарата, но очищенного от эндотоксинов путем соответствующей обработки или разведения. Испытание на бактериальные эндотоксины проводят путем сравнения с указанной калибровочной кривой.

Установлено, что в большинстве случаев подходит ультрафильтрация с использованием асимметричных мембранных фильтров из триацетата целлюлозы. Фильтры должны быть надлежащим образом проверены, поскольку при некоторых обстоятельствах производные целлюлозы (β -D-глюканы) могут быть причиной ложноположительных результатов.

Другим вариантом удаления мешающих факторов является двухэтапная процедура, при которой, на первом этапе бактериальные эндотоксины в испытуемом образце с мешающими факторами фиксируют на твердой фазе (например, метод предварительного концентрирования с использованием твердофазной экстракции), а на втором – после удаления мешающих факторов (например, путем промывки) бактериальные эндотоксины обнаруживают в неизменном виде в подходящих условиях испытания.

10. ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ

Цель проведения контрольных испытаний состоит в проверке активности лизата амебоцитов в условиях испытаний методами А и В.

Выполняют контрольное испытание с раствором стандартного образца эндотоксина в воде для испытания на бактериальные эндотоксины в концентрации, в два раза превышающей указанную производителем чувствительность лизата амебоцитов.

В качестве отрицательного контроля используют воду для испытания на бактериальные эндотоксины для подтверждения отсутствия бактериальных эндотоксинов в обнаруживаемой концентрации.

Положительный контроль, содержащий испытуемый образец в концентрации, применяемой в испытании, предназначен для подтверждения отсутствия мешающих факторов.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Незначительные количества бактериальных эндотоксинов, содержащиеся в воде или в любом другом реактиве или материале, с которыми во время испытания контактирует лизат амебоцитов, могут не обнаруживаться до тех пор, пока это количество не достигнет предела обнаружения лизата амебоцитов. Даже незначительные количества эндотоксинов могут увеличить их содержание в растворе с испытуемым образцом до значения, несколько превышающего предел обнаружения лизата амебоцитов, и вызвать положительную реакцию.

Риск возникновения такого нежелательного явления можно уменьшить путем проверки воды для испытания на бактериальные эндотоксины, других реактивов и материалов с использованием наиболее чувствительного лизата амебоцитов или, по крайней мере, более чувствительного, чем лизат амебоцитов, применяемый при испытании лекарственного средства. Даже в этом случае риск такого ложноположительного результата не может быть полностью исключен.

12. РЕАЛИЗАЦИЯ МЕТОДОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ФАРМАКОПЕЕ СОЮЗА

Методы испытаний, приведенные в общих фармакопейных статьях и частных фармакопейных статьях, валидированы в соответствии с принятой научной практикой и действующими рекомендациями по валидации аналитических методик и являются официальными (см. раздел *1. Общие сведения Фармакопеи Союза*). Следовательно, методы, представленные в общих фармакопейных статьях *2.1.6.8. Бактериальные эндотоксины*, *2.1.6.13. Испытание на активацию моноцитов* и *2.1.6.12. Испытание на бактериальные эндотоксины с использованием рекомбинантного фактора С* не нуждаются в повторной валидации (ревалидации), однако требуют подтверждения возможности их использования для конкретной субстанции для фармацевтического применения и (или) лекарственного препарата в конкретных условиях испытания. Процедура, а также материалы и реактивы, используемые в методике, должны быть проверены согласно указаниям для соответствующего испытания. Отсутствие мешающих факторов (при необходимости, процедуры их устранения) проверяют на образцах не менее, чем трех производственных серий.

Испытание на активацию моноцитов, согласно указаниям общей фармакопейной статьи *2.1.6.13. Испытание на активацию моноцитов*, в первую очередь, предназначено для замены испытания на пирогенность. В этой же общей фармакопейной статье представлены рекомендации

по выбору и использованию методов (1, 2 или 3) и валидации испытания.

13. ЗАМЕНА МЕТОДА, ПРЕДПИСАННОГО В ЧАСТНОЙ ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬЕ

13.1. ЗАМЕНА МЕТОДОМ, ПРЕДСТАВЛЕННЫМ В ФАРМАКОПЕЕ СОЮЗА

Замена метода, предписанного в частной фармакопейной статье, на другой метод, представленный в Фармакопее Союза, необходимо рассматривать как использование альтернативного метода взамен фармакопейного (см. раздел *1. Общие сведения Фармакопеи Союза*). Альтернативный метод, представленный в фармакопее не нуждается в повторной валидации, однако необходимо подтверждение возможности его использования для конкретной субстанции для фармацевтического применения или лекарственного препарата в конкретных условиях испытания, а также для подтверждения эквивалентности предписанному методу.

13.2. ЗАМЕНА МЕТОДОМ, НЕ ПРЕДСТАВЛЕННЫМ В ФАРМАКОПЕЕ СОЮЗА

Замена метода, предписанного в частной фармакопейной статье, методом, не представленным в Фармакопее Союза, необходимо рассматривать как использование альтернативного метода взамен фармакопейного (см. раздел *1. Общие сведения Фармакопеи Союза*).

2.1.8. МЕТОДЫ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

201080027-2023

2.1.8.27. КОЭФФИЦИЕНТ ПЕНООБРАЗОВАНИЯ (ИНДЕКС ВСПЕНИВАНИЯ)

Общая фармакопейная статья предназначена для определения пенообразующей способности лекарственного растительного сырья и др., содержащих сапонины.

Для выполнения методики используют 1,0 г испытуемого образца при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.

ОБОРУДОВАНИЕ

Прибор для определения коэффициента пенообразования (см. рисунок 2.1.8.27.-1) обычно состоит из:

- штатива с держателем для пипеток;
- пипетки класса А вместимостью 50 мл;
- стеклянного мерного цилиндра вместимостью 250 мл с градуировкой 2 мл и внутренним диаметром (38 ± 3) мм;
- резиновой груши для наполнения пипетки.

Закрепляют пипетку в штатив с держателем так, чтобы наконечник находился в 45 см от основания мерного цилиндра, расположенного под ним. Наконечник пипетки выравнивают по центру мерного цилиндра. Перед испытанием проверяют правильность установки мерного цилиндра, заполняя его и пипетку *водой дистиллированной Р* так, чтобы вода, вытекающая из пипетки, попадала в центр мерного цилиндра. Отмечают местоположение мерного цилиндра.

МЕТОДИКА

Приготовление испытуемого раствора.

В химический стакан вместимостью 250 мл помещают 1,00 г измельченного испытуемого образца (355) (2.1.1.4). Добавляют 50 мл *воды дистиллированной Р* и настаивают в течение 30 мин, перемешивая шпателем 3–5 раз для диспергирования испытуемого образца, избегая образования пены. Ополаскивают шпатель и внутренние стенки химического стакана дополнительно

50 мл *воды дистиллированной Р* так, чтобы смыть в воду как можно большее количество испытуемого образца. Продолжают настаивание в течение 30 мин без перемешивания и фильтруют через фильтровальную бумагу диаметром 125 мм. В качестве испытуемого раствора используют фильтрат.

Выполнение испытания. Закрепляют пипетку в штативе с держателем, отбирают 50,0 мл испытуемого раствора с помощью пипетки. Оставшийся объем испытуемого раствора переносят, избегая образования пены, в мерный цилиндр, стенки которого предварительно смочены *водой дистиллированной Р*. Помещают мерный цилиндр на отмеченное место под пипеткой. Открывают клапан Е и сливают раствор из пипетки в мерный цилиндр. Записывают максимальную высоту пены, прежде чем она начнет оседать. Испытание повторяют дополнительно два раза, тщательно промывая пипетку и мерный цилиндр *водой дистиллированной Р* между испытаниями.

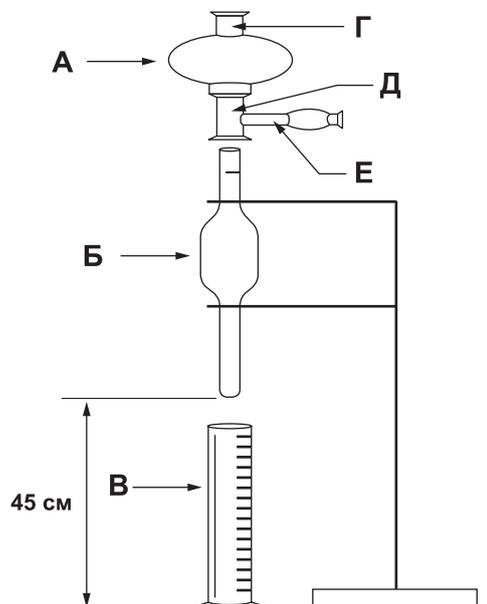


Рисунок 2.1.8.27.-1. – Прибор для определения коэффициента пенообразования

- А – резиновая груша для наполнения пипетки;
 Б – пипетка класса А вместимостью 50 мл;
 В – стеклянный мерный цилиндр вместимостью 250 мл с градуировкой 2 мл и внутренним диаметром (38 ± 3) мм;
 Г, Д, Е – клапаны груши

Результаты испытаний. Коэффициент пенообразования (I_F) рассчитывают по формуле:

$$I_F = \frac{H}{m}$$

где: H — высота образовавшейся пены в сантиметрах;

m — масса образца, используемого для приготовления испытуемого раствора, в граммах.

Результатом является среднее трех определений.

2.1.9. ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

201090030-2023

201090031-2023

2.1.9.30. СИТОВОЙ АНАЛИЗ

Общая фармакопейная статья распространяется на метод определения степени измельчения порошков с помощью ситового анализа.

Степень измельчения порошка выражают с учетом номинального размера отверстий сит, применяемых для неаналитических процедур (2.1.1.4, таблица 2.1.1.4.-1), или с применением специальных терминов: крупный, средnekрупный, мелкий и очень мелкий порошок (2.1.10.9).

Если такие термины не могут быть использованы, степень измельчения в процентах выражают отношением массы порошка, прошедшего через сито определенного номинального размера отверстий, к общей массе порошка.

МЕТОДИКА

Для определения степени измельчения порошков методом просеивания собирают сита так, чтобы сито с более крупным размером отверстий было верхним, а с более мелким размером отверстий – нижним, и присоединяют к ним собирательную чашку. Порошок просеивают (2.1.10.8), после чего взвешивают каждое сито и определяют массу остатка на нем, а также на собирательной чашке.

Для определения суммарного распределения частиц по массе или объему с размером не более x обычно используют величину $Q_3(x)$ (2.1.10.9).

Степень измельчения порошка, соответствующую номинальному размеру отверстий сита, указывают в скобках в частной фармакопейной статье.

В случае использования сита одного номинального размера отверстий через него должно проходить не менее 97 % массы порошка при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.

2.1.9.31. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСПЫЛЕНИЯ

Общая фармакопейная статья определяет характеристики лекарственных препаратов для распыления, предназначенных для доставки действующих веществ в легкие с помощью небулайзеров. Для определения характеристик используют следующие испытания:

- скорость высвобождения действующего вещества и общее содержание высвобождаемого вещества;
- аэродинамическая оценка распыляемых аэрозолей.

Данные испытания представляют подходы к определению дозы, получаемой пациентом, но не предназначены для оценки качества небулайзера. Для определения эффективности лекарственного препарата более приемлемым является средневзвешенное распределение частиц по массе, чем по количеству. Кроме того, масса действующего вещества как функция аэродинамического диаметра в большей степени отражает их терапевтическое действие на дыхательные пути.

СКОРОСТЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА И ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ ВЫСВОБОЖДАЕМОГО ВЕЩЕСТВА

Испытания проводят для определения скорости высвобождения действующего вещества и общего содержания высвобождаемого вещества, используя стандартные условия волнометрического измерения скорости потока. Следует отметить, что небулайзеры с усилением дыхания или активируемые дыханием, оцениваются с помощью симулятора дыхания, так как выход лекарственного препарата из устройства значительно зависит от скорости вдыхаемого потока. Приведенная ниже методика основана на применении стандартной

модели дыхания для взрослых. Если лекарственный препарат для распыления показан для применения только в педиатрии (новорожденные, младенцы и дети), должна использоваться модель дыхания для ребенка. Для проведения подходящего измерения массы высвобождаемого вещества использование моделей дыхания является более предпочтительным, чем испытания при скорости непрерывного потока. Скорость высвобождения действующего вещества и общее содержание высвобождаемого вещества являются наиболее подходящими характеристиками для оценки высвобождаемой массы стандартным способом независимо от типа небулайзера. Соответственно, приведенная ниже методика испытания позволит измерить массу действующего вещества, высвобождаемого в первом периоде времени, обычно составляющем 1 мин (оценка скорости высвобождения действующего вещества), а также общую массу высвобождаемого вещества.

ОБОРУДОВАНИЕ

Симулятор дыхания. Для испытания используют коммерчески доступный симулятор дыхания, способный воспроизводить определенную модель дыхания, технические характеристики которого приводятся в таблице 2.1.9.31.-1. Модель дыхания взрослого человека применяют за исключением случаев, когда лекарственный препарат предназначен только для педиатрии. Тогда используют альтернативную модель дыхания, как указано в таблице 2.1.9.31.-1.

Система фильтров. Для испытания используют подходящий валидированный фильтр с низким сопротивлением, обеспечивающий количественный сбор аэрозоля и полноту извлечения действующего вещества соответствующим растворителем. Пустой (не используемый)

объем корпуса фильтра не должен превышать 10 % дыхательного объема симулятора дыхания.

МЕТОДИКА

Фильтр вдоха (А), входящий в состав держателя фильтра, присоединяют к симулятору дыхания (Б) в соответствии с рисунком 2.1.9.31.-1. Наполняют распылитель небулайзера (В) лекарственным препаратом в необходимом объеме в соответствии с инструкцией по применению. При необходимости, присоединяют мундштук распылителя к фильтру вдоха с помощью адаптера мундштука, обеспечивая герметичность соединения. Необходимо удостовериться, что распылитель ориентирован надлежащим образом, для этого может потребоваться изменение наклона симулятора дыхания и держателя фильтра. Симулятор дыхания настраивают для получения определенной модели дыхания.

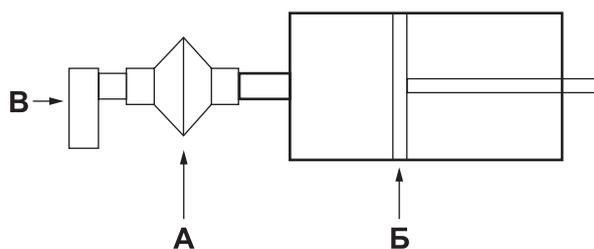


Рисунок 2.1.9.31.-1. – Установка для испытания с симулятором дыхания

А – фильтр вдоха и держатель фильтра;

Б – симулятор дыхания;

В – распылитель

Вначале запускают симулятор дыхания, затем, в начале ингаляционного цикла, – небулайзер, который функционирует в течение определенного периода времени. Выбранное время, обычно (60 ± 1) с, должно обеспечить накопление действующего вещества на фильтре вдоха,

Таблица 2.1.9.31.-1. – Технические характеристики симулятора дыхания (форма волны синусоидальная)

Показатель	Технические характеристики			
	взрослый	новорожденный	младенец	ребенок
дыхательный объем (мл)	500	25	50	155
частота (цикл/мин)	15	40	30	25
отношение вдох:выдох	1:1	1:3	1:3	1:2

достаточное для определения его содержания. Если количество действующего вещества, накопленное на фильтре вдоха в течение 60 с, недостаточно для проведения испытания, продолжительность промежутка времени для сбора аэрозоля можно увеличить. Если фильтр пропитывается лекарственным препаратом, указанное время можно уменьшить. Во избежание пропитываемости фильтра при необходимости распыление прерывают и заменяют фильтр. Новый фильтр и держатель фильтра помещают в рабочее положение и продолжают процесс до остановки распыления. По завершению выбранного периода времени останавливают небулайзер.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью подходящего метода испытания определяют массу действующего вещества, накопленного на фильтре вдоха и держателе фильтра в течение каждого промежутка времени. Определяют скорость высвобождения действующего вещества путем деления массы действующего вещества, накопленного на первом фильтре вдоха, на время сбора. Определяют общую массу высвобождаемого действующего вещества, суммируя массу действующего вещества, накопленного на всех фильтрах и держателях фильтра.

АЭРОДИНАМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РАСПЫЛЯЕМЫХ АЭРОЗОЛЕЙ

Размер частиц (капель) лекарственных препаратов для распыления определяют при более низких скоростях потока, чем обычно используются для порошковых ингаляторов и дозирующих ингаляторов. Как правило, рекомендуют использовать скорость потока 15 л/мин, так как указанное значение приближено к средней скорости дыхания здорового взрослого человека (дыхательный объем 500 мл). Хотя лазерные приборы рассеяния света под малым углом (лазерная дифрактометрия) могут обеспечить быстрое измерение распределения по размеру частиц аэрозолей, образуемых небулайзером, указанные способы не обнаруживают действующее вещество; в большей степени они измеряют частицы (капли) по размеру независимо от их состава. Изложенное выше применимо для гомогенных растворов, но может приводить к существенным ошибкам, если лекарственный

препарат для распыления представляет собой суспензию или если происходит значительное испарение капель, как в определенных типах небулайзеров. Каскадные импакторы позволяют однозначно охарактеризовать аэрозоли по массе действующего вещества как функции аэродинамического диаметра. Кроме метода каскадной импакции, может применяться дифракция лазерного излучения при условии валидации методики. Для проведения испытания используют каскадный импактор (см. раздел *Прибор* данной общей фармакопейной статьи), откалиброванный на скорость потока 15 л/мин. Для небулайзеров определение баланса масс способом, аналогичным для порошковых ингаляторов и дозирующих ингаляторов, не приемлемо, так как доза фиксируется при непрерывном выходе лекарственного препарата. Опыты по количественному извлечению действующего вещества должны выполняться как часть разработки методики с целью ее валидации. В процессе измерения размера частиц (капель) важно контролировать испарение образуемых капель в небулайзерах для предотвращения ошибок.

Испарение можно минимизировать, охладив импактор до температуры около 5 °С, поместив его в холодильник примерно на 90 мин. Вследствие высокого риска коррозии, вызываемой конденсацией соледержащих капель при охлаждении импактора, прибор должен быть полностью очищен, включая межкаскадные каналы, после каждого дня использования. После каждого испытания рекомендуется высушивать все поверхности прибора, например, сжатым воздухом. Не следует сушить сжатым воздухом коллектор с микроотверстиями.

ПРИБОР

Подробное описание прибора, представляющего собой каскадный ступенчатый импактор, оснащенный коллектором с микроотверстиями (импактор нового поколения), и индукционного порта представлено в соответствующей общей фармакопейной статье и включает информацию о критических размерах и особенностях квалификации импактора (измерение уровня). Для обеспечения полного количественного извлечения действующего вещества из распыленного аэрозоля при заданной скорости потока в 15 л/мин в дополнение к коллектору с микро-

отверстиями используют резервный фильтр. Фильтр размещают ниже микроотверстий (опция внутреннего фильтра) или используют в держателе вне импактора для улавливания любых мелких капель, прошедших последний уровень фракционирования по размеру. Для испытания аэрозолей, образуемых небулайзером, пресепалятор не применяют.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК

Перегрузка импактора. При разработке и валидации методики важно подтвердить, что объем распыляемой жидкости, отобранной из небулайзера, не перегружает импактор. Визуальный осмотр поверхностей сбора на уровнях, собирающих наибольшее количество капель, может выявить полосы, если произошла перегрузка. Данное явление может быть связано и с увеличением массы действующего вещества, собранного на последнем уровне и резервном фильтре. Наиболее эффективным способом избежать перегрузки для любой системы является уменьшение времени распыления испытуемого образца (T_0) путем уравнивания перегрузки и аналитической чувствительности.

Обратный захват. Отскок и обратный захват капель в систему является маловероятным для капель, образующихся в небулайзере в отли-

чие от твердых частиц в ингаляторе. Вследствие этого допускается не закрывать импактор.

МЕТОДИКА

Собранный импактор и индукционный порт предварительно охлаждают в холодильнике (при температуре около $5\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 90 мин и начинают испытание в течение 5 мин после извлечения импактора из холодильника. Допускается применение других методик для поддержания постоянной температуры импактора (например, холодильный шкаф или холодная комната) после их валидации. Небулайзер соединяют с регулятором подачи газа (обычно воздух или кислород) или используют компрессор при давлении и скорости потока, указанных производителем устройства. Принимают меры предосторожности для обеспечения того, чтобы линия подачи газа не отсоединялась от небулайзера под давлением. В небулайзер помещают лекарственный препарат в необходимом количестве в соответствии с инструкцией по применению. Импактор достают из холодильника, присоединяют к нему индукционный порт, подключают к выходному отверстию импактора или наружного фильтра источник вакуума, способный откачивать воздух из системы со скоростью 15 л/мин, как указано на рисунке 2.1.9.31.-2. Пропускают поток через импактор. К порту

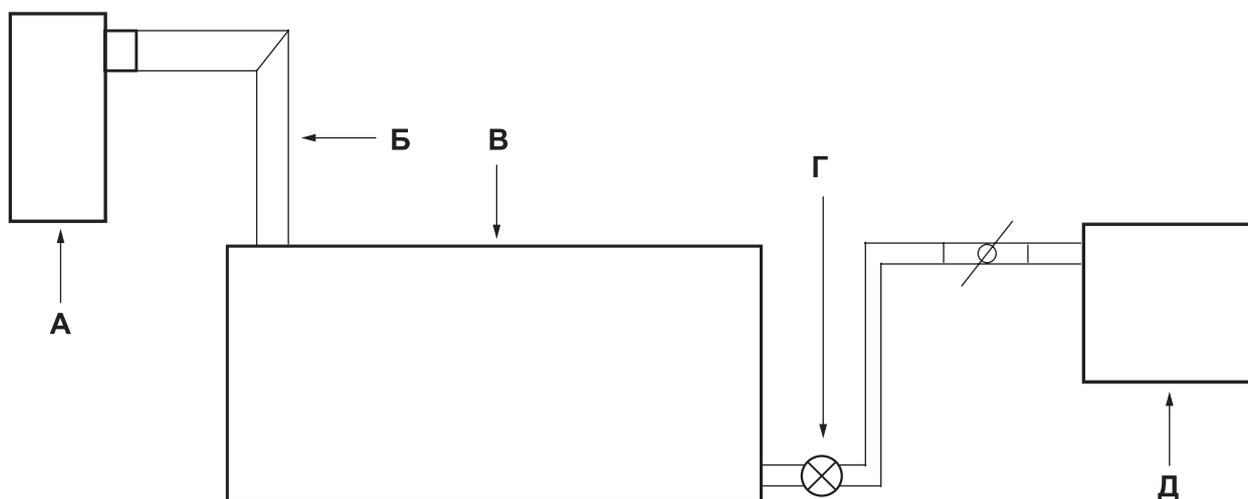


Рисунок 2.1.9.31.-2. – Схема использования импактора нового поколения для определения размера частиц лекарственных препаратов для распыления

А – небулайзер (распылитель);

Б – порт индукции;

В – импактор нового поколения;

Г – контрольный клапан;

Д – источник вакуума

индукции подсоединяют измеритель потока, откалиброванный для измерения выходящего потока. Регулируют контрольный клапан, расположенный между импактором и источником вакуума, для обеспечения постоянного потока через систему со скоростью 15 л/мин ($\pm 5\%$). Отсоединяют измеритель потока. Удостоверяются, что небулайзер располагается в таком же положении, что и при использовании его пациентом. Затем присоединяют мундштук небулайзера к индукционному порту, используя при необходимости адаптер мундштука для обеспечения герметичности соединения. Включают подачу газа или компрессор небулайзера и производят отбор проб в течение предварительно установленного времени (T_0). Значение T_0 должно использоваться в аналитической методике на данный лекарственный препарат для сопоставимости показателей массы фракций. После отбора проб выключают подачу газа или компрессор, отсоединяют небулайзер от индукционного порта и отключают источник вакуума.

Отсоединяют импактор и с помощью подходящего метода анализа определяют массу действующего вещества, собранного в индукционном порте, на каждом из уровней и ре-

зервном/наружном фильтре в соответствии с описанием импактора нового поколения. Массу действующего вещества, собранную в коллекторе с микроотверстиями, суммируют с массой, собранной на резервном/наружном фильтре, и далее обрабатывают как единый образец для последующих расчетов. Массовую долю фракции (F_m) действующего вещества, собранного на каждой составной части импактора, начиная с индукционного порта и других расположенных в нем по порядку элементов, рассчитывают по формуле:

$$F_m = \frac{m}{M}$$

где: m — масса действующего вещества, собранная на каждой составной части импактора;

M — общая масса действующего вещества, собранная в системе.

Величину F_m представляют в виде диаграммы ее значений, соответствующих составным частям измерительного оборудования, начиная от индукционного порта и заканчивая резервным фильтром импактора (рисунок 2.1.9.31.-3).

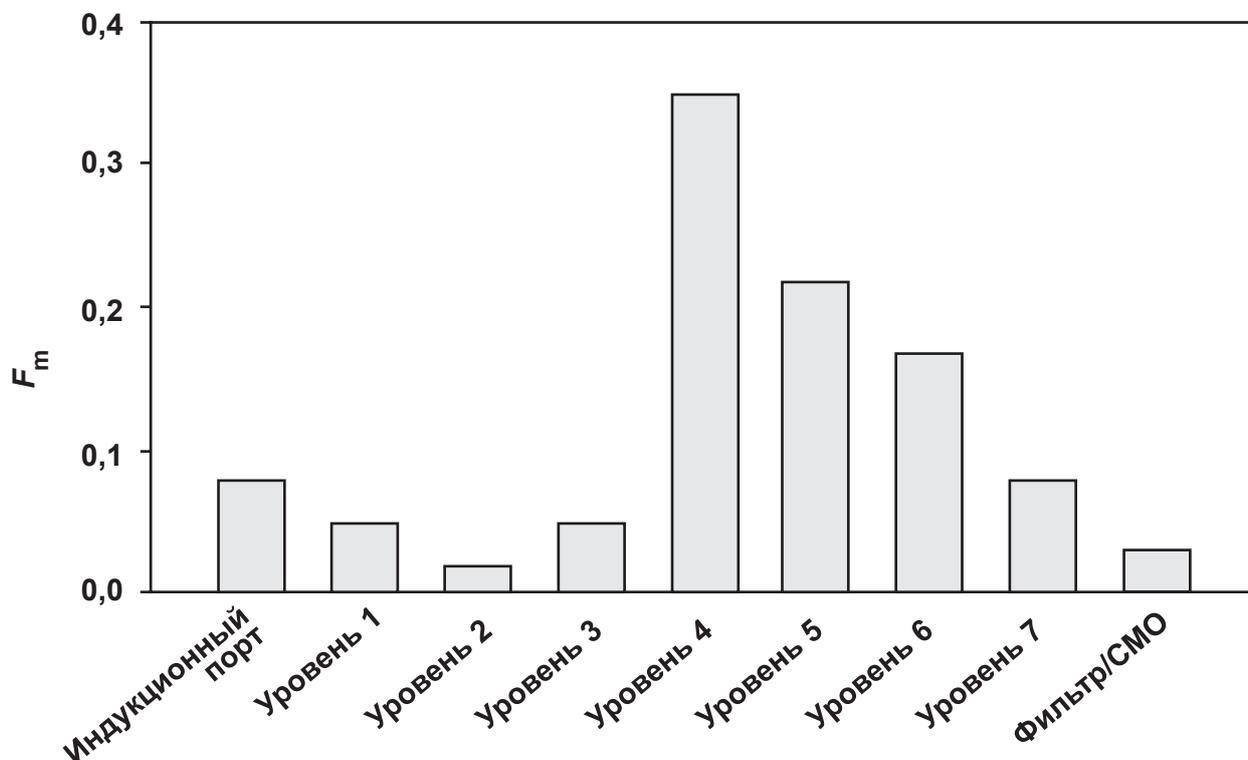


Рисунок 2.1.9.31.-3. – Диаграмма распределения значений массовой доли капель, соответствующих составным частям импактора

При необходимости допускается объединение значений F_m соседних уровней импактора для представления массовой доли фракции действующего вещества, собранного на нескольких уровнях, в виде одного значения.

Определяют кумулятивное средневзвешенное распределение частиц аэрозоля по массе, фракционированных в соответствии с размером с помощью импактора нового поколения. Начиная с фильтра распределяют кумулятивную массу фракции действующего вещества в зависимости от эффективного предельного диаметра частиц фракции соответствующего уровня (таблица 2.1.9.31.-2 подходящих диаметров

частиц фракции при скорости потока 15 л/мин). Строят график зависимости кумулятивной фракции действующего вещества от эффективного предельного диаметра частиц фракции в подходящем формате, например, логарифмическом или пробит-анализа. При необходимости с помощью интерполяции определяют значения массовой доли фракции с диаметром частиц ниже указанного в таблице 2.1.9.31.-2 значения или фракцию с размером частиц между верхним и нижним пределами. При необходимости определяют значения медианной массы аэродинамического диаметра и геометрического стандартного отклонения, если приемлемо.

Таблица 2.1.9.31.-2. – Диаметры частиц фракции импактора нового поколения при скорости потока 15 л/мин

Уровень	Диаметр частиц фракции (мкм)
1	14,1
2	8,61
3	5,39
4	3,30
5	2,08
6	1,36
7	0,98

2.1.11. АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

201110001-2023

2.1.11.1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕИНА С ЧЕЛОВЕКА

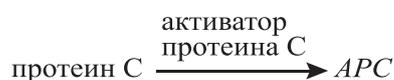
В общей фармакопейной статье приведены примеры методик количественного определения протеина С человека (протеин С) хромогенным методом в конечной точке (метод 1) и клоттинговым методом (метод 2).

МЕТОД 1. ХРОМОГЕННЫЙ МЕТОД

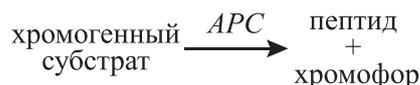
Протеин С представляет собой витамин К-зависимый плазменный белок, который после активации (активированный протеин С (*activated protein C, APC*)) подавляет свертывание крови путем протеолитического расщепления факторов Va и VIIIa. Активность протеина С определяют с помощью двухстадийного метода:

- на первой стадии протеин С в образце активируют специфическим активатором, выделенным из яда змеи;
- на второй стадии активированный протеин С расщепляет специфический хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта (хромофора), который может быть количественно определен методом спектрофотометрии.

Стадия 1



Стадия 2



Количественное определение протеина С основано на его способности расщеплять хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта и оценивается путем сравнения активности испытуемого образца с активностью

стандартного образца протеина С, выраженной в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца протеина С человека, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть приобретены по отдельности или в виде коммерческих наборов. Для количественного определения протеина С применяют как метод определения в конечной точке, так и кинетический метод.

Методики и реактивы могут отличаться в разных наборах, поэтому следует придерживаться инструкции производителя набора.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения с pH 8,4. Растворяют 6,055 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 16,84 г *цезия хлорида Р* в воде *Р*, при необходимости корректируют pH раствора (2.1.2.3) и доводят водой *Р* до объема 1000,0 мл.

Активатор протеина С. Белок, специфично активирующий протеин С, выделяют из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкцией производителя. Перед использованием в испытании разводят водой *Р* до концентрации 0,25 ЕД/мл.

Хромогенный субстрат для активированного протеина С. Специфический хромогенный субстрат для *APC*, например, L-пироглутамил-L-пролил-L-аргинин-паранитроанилина гидрохлорид (пироGlu-Pro-Arg-pNA·HCl), растворяют в воде *Р* и доводят водой *Р* до получения концентрации 4,5 ммоль/л. Перед использованием разводят буферным раствором для разведения с pH 8,4 до концентрации 1,1 ммоль/л.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец восстанавливают или размораживают согласно инструкции по медицинскому применению. Готовят с использованием воды *Р* не менее трех отдельных разведений до концентраций в диапазоне 0,050 – 0,200 МЕ/мл в двух повторностях. Аналогичным образом готовят разведения восстановленного стандартного образца.

Стадия 1. Смешивают по 0,025 мл каждого разведения с 0,050 мл активатора протеина С, предварительно нагретых до температуры 37 °С, и инкубируют при той же температуре точно 10 мин. Для каждого разведения проводят контрольный опыт, используя *воду Р* вместо активатора протеина С.

Стадия 2. К каждой смеси прибавляют по 0,150 мл разбавленного хромогенного субстрата, предварительно нагретого до температуры 37 °С, и инкубируют при той же температуре точно 10 мин. При необходимости время инкубации должно быть скорректировано таким образом, чтобы получить линейную зависимость образования хромофора от времени. Останавливают реакцию добавлением 0,050 мл 50 % (об/об) раствора уксусной кислоты ледяной *Р*.

При расщеплении хромогенного субстрата под действием *АРС* образуется окрашенный продукт в количестве, пропорциональном концентрации протеина С в образце. Измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм (2.1.2.24). Значение оптической плотности контрольного опыта вычитают из значения оптической плотности испытуемого образца.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность протеина С в испытуемом образце с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

МЕТОД 2.

КЛОТТИНГОВЫЙ МЕТОД

Активность протеина С устанавливают после расщепления его до *АРС* специфическим активатором, выделенным из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*. Полученный *АРС* инактивирует факторы Va и VIIIa и таким образом удлинняет активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) системы, в которой присутствуют все факторы свертывания на постоянном избыточном уровне, за исключением протеина С, поступающего в систему с добавляемым образцом. Увеличение времени свертывания пропорционально концентрации протеина С в образце.

Количественное определение протеина С, основано на его способности увеличивать время свертывания и оценивается путем сравнения активности испытуемого образца с активностью стандартного образца протеина С, выраженной в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца протеина С человека, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть приобретены по отдельности или в виде коммерческих наборов.

Методики и реактивы могут отличаться в разных наборах, поэтому следует придерживаться инструкции производителя набора.

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения с рН 7,4. Изотонический буферный раствор, не содержащий хелатирующих соединений.

Плазма крови человека, дефицитная по протеину С. Цитратная плазма крови человека, содержащая протеин С ниже определяемого уровня. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкцией производителя.

Активатор протеина С. Белок, специфично активирующий протеин С, выделяют из яда гадюки *Agkistrodon contortrix contortrix*. Восстанавливают и хранят в соответствии с инструкцией производителя.

Активатор свертывания. Используют подходящий реактив для АЧТВ, содержащий фосфолипиды и контактный активатор. Активатор свертывания может быть комбинирован с активатором протеина С.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец восстанавливают или размораживают согласно инструкции по медицинскому применению. Готовят с использованием *воды Р* не менее трех отдельных разведений до концентраций в диапазоне 0,010 – 0,150 МЕ/мл в двух повторностях с использованием буферного раствора для разведения с рН 7,4. Аналогичным образом готовят разведения восстановленного стандартного образца.

Смешивают один объем каждого разведения с одним объемом плазмы крови человека, дефицитной по протеину С, и одним объемом активатора протеина С (объединенного с реагентом для АЧТВ). Все растворы должны быть предварительно нагреты до температуры 37 °С. Прибавляют один объем раствора 3,7 г/л кальция хлорида *Р*, предварительно нагретого до температуры 37 °С, и регистрируют время свертывания.

Время свертывания пропорционально концентрации протеина С в каждом разведении.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность протеина С в испытуемом образце с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

201110002-2023

2.1.11.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕИНА S ЧЕЛОВЕКА

В общей фармакопейной статье приведен пример методики количественного определения протеина S человека (протеин S) клоттинговым методом.

Протеин S представляет собой витамин К-зависимый белок плазмы, который действует как кофактор активированного протеина С человека (активированный протеин С (*activated protein C, APC*)). Активность протеина S может быть определена по реакции свертывания крови, которая чувствительна к способности протеина S ускорять инактивацию фактора свертывания крови человека Va (фактор Va) под действием APC. Испытание заключается в прибавлении протеина S к смеси реактивов, содержащей APC, фактор Va и плазму крови человека, дефицитную по протеину S. Увеличение времени свертывания пропорционально концентрации протеина S в образце. Методики, в которых APC добавляется непосредственно как реактив, более предпочтительны по сравнению с теми, в которых APC генерируется во время проведения испытания путем добавления специфического активатора протеина С, выделенного из яда змеи. Активация свертывания инициируется добавлением активирующего реактива, такого как тромбопластин или активированный фактор свертывания крови человека X (фактор Xa), вместе с фосфолипидами и кальция хлоридом. Во время испытания фактор Va генерируется из фактора V в плазме крови человека, дефицитной по протеину S, с последующей активацией свертывания. Процедура испытания должна обеспечивать, чтобы единственным фактором, ограничивающим реакцию свертывания, являлся протеин S.

Количественное определение протеина S

основано на его способности увеличивать время свертывания, и оценивается путем сравнения активности испытуемого образца с активностью стандартного образца протеина S, выраженной в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца протеина S человека, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения.

Реактивы для испытания могут быть приобретены по отдельности или в виде коммерческих наборов. Методики и реактивы могут отличаться в разных наборах, поэтому следует придерживаться инструкции производителя набора.

КЛОТТИНГОВЫЙ МЕТОД

РЕАКТИВЫ

Буферный раствор для разведения с pH 7,4. Изотонический буфер, не содержащий хелатирующих соединений, приготовленный следующим образом: растворяют 6,08 г *трис(гидроксиметил)аминометана P* и 8,77 г *натрия хлорида P* в воде P и при необходимости корректируют pH раствора (2.1.2.3); далее прибавляют 10 г *альбумина бычьего P* или *альбумина человека P* и доводят водой P до объема 1000,0 мл.

Плазма крови человека, дефицитная по протеину S. Цитратная плазма крови человека с содержанием протеина S ниже определяемого уровня и, предпочтительно, не содержащая С4b-связывающего белка.

Активатор коагуляции. Реактив применяют для инициации свертывания плазмы крови человека, дефицитной по протеину S, а также для обеспечения образования фактора Va. Активатор может состоять из тканевого фактора, фактора Xa или агента, способного прямо активировать фактор X. Такой агент может быть выделен из яда гадюки Рассела (*Vipera russelli*). Реактив также содержит APC, фосфолипиды и *кальция хлорид P*, или кальция хлорид может быть добавлен отдельно после определенного периода активации.

МЕТОДИКА

Испытуемый образец восстанавливают или размораживают согласно инструкции по медицинскому применению. Готовят не менее трех отдельных разведений до получения концентраций в диапазоне 0,020 – 0,100 МЕ/мл в двух

повторностях с использованием буферного раствора для разведения с рН 7,4. Аналогичным образом готовят разведения восстановленного стандартного образца.

Смешивают по одному объему каждого разведения с одним объемом плазмы крови человека, дефицитной по протеину S. Все растворы должны быть предварительно нагреты до температуры 37 °С. Прибавляют два объема активатора коагуляции, нагретого до температуры 37 °С, и регистрируют время свертывания.

Альтернативная процедура может предусматривать использование активатора коагуляции без кальция хлорида и требовать точного измерения периода активации перед добавлением кальция хлорида и регистрации времени свертывания.

Время свертывания пропорционально концентрации протеина S в каждом разведении.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность протеина S в испытуемом образце с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

201110003-2023

2.1.11.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА α -1-ПРОТЕИНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

В общей фармакопейной статье приведена методика количественного определения ингибитора α -1-протеиназы человека (ингибитор α -1-протеиназы), известного также как α -1-анти-трипсин или α -1-антипротеиназа, хромогенным методом.

Методика основана на сравнении испытуемого образца со стандартным образцом ингибитора α -1-протеиназы человека, калиброванного в миллиграммах активного (функционального) ингибитора α -1-протеиназы, по способности инактивировать сериновую протеазу – эластазу (свиную панкреатическую эластазу или эластазу нейтрофилов человека). Различные количества образца, смешивают с заданным количеством эластазы, остаточную активность эластазы измеряют с использованием подходящего хромогенного субстрата.

ХРОМОГЕННЫЙ МЕТОД

РЕАКТИВЫ

Трис-альбуминовый буферный раствор. Растворяют 24,23 г *трис(гидроксиметил)аминометана P* в воде *P*, доводят рН раствора до значения $8,0 \pm 0,3$ (2.1.2.3), используя *хлороводородную кислоту P1*, и доводят водой *P* до объема 1000 мл. К 100 мл полученного раствора прибавляют 0,5 мл 20 % раствора *альбумина человека P* или *альбумина бычьего P*.

Буферный раствор, содержащий альбумин человека или альбумин бычий, должен быть приготовлен в день его использования; в противном случае, раствор стерилизуют фильтрацией (0,2 мкм) и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение двух недель.

МЕТОДИКА

Готовят в двух повторностях четыре или пять разведений испытуемого образца и стандартного образца в подходящем диапазоне концентраций ингибитора α -1-протеиназы, используя трис-альбуминовый буферный раствор.

В лунки микропланшета помещают по 50 мкл разведений стандартного образца или разведений испытуемого образца, затем в каждую лунку прибавляют по 150 мкл раствора свиной панкреатической эластазы (эластаза), разведенной до необходимой концентрации трис-альбуминовым буферным раствором. Инкубируют в течение определенного промежутка времени (3 – 10 мин) при температуре от 15 °С до 25 °С. Поскольку активность различных эластаз может варьировать, для получения подходящих изменений оптической плотности при длине волны 405 нм в данных конкретных условиях проведения испытания, концентрация эластазы может быть уточнена путем оценки активности в контрольных лунках, содержащих эластазу без ингибитора α -1-протеиназы.

В каждую лунку прибавляют по 100 мкл рабочего раствора хромогенного субстрата *N*-сукцинил-три-L-аланил-4-*n*-нитроанилида (Suc-Ala-Ala-pNA) (раствор 4,5 мг/мл хромогенного субстрата в *диметилсульфоксиде P*, разведенный трис-альбуминовым буферным раствором до рабочей концентрации 0,45 мг/мл). Измерение оптической плотности (2.1.2.24) начинают сразу

же и проводят в течение 5 мин и более при длине волны 405 нм, используя спектрофотометр микропланшетный. Рассчитывают скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$).

В качестве альтернативы можно использовать метод определения в конечной точке, оставив реакцию уксусной кислотой и измеряя оптическую плотность при длине волны 405 нм. Если испытание выполняют в пробирках и для измерения оптической плотности используют спектрофотометр, пропорционально изменяют объемы растворов реактивов.

Скорость изменения оптической плотности ($\Delta A/\text{мин}$) обратно пропорциональна активности ингибитора α -1-протеиназы.

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают активность ингибитора α -1-протеиназы в испытуемом образце общепринятыми статистическими методами (2.3.12.0).

201110004-2023

2.1.11.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИ-D ЧЕЛОВЕКА

Общая фармакопейная статья распространяется на методы количественного определения иммуноглобулина анти-D человека (иммуноглобулина анти-D) в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

МЕТОД 1

Активность иммуноглобулина анти-D определяют путем сравнения количества испытуемого образца, необходимого для агглютинации D-положительных эритроцитов, с необходимым для получения такого же эффекта количеством стандартного образца, активность которого выражена в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца иммуноглобулина анти-D, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения.

РЕАКТИВЫ

Используют пулы D-положительных эритроцитов не менее чем от четырех доноров с группой крови $0R_1R_1$, собранные не ранее чем за семь суток до испытания и хранившиеся соответствующим образом. К подходящему объему клеток, предварительно трижды промытых раствором 9 г/л натрия хлорида P, прибавляют равный объем раствора бромелайнов P, выдерживают при температуре 37 °C в течение 10 мин. Далее центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость, промывают трижды раствором 9 г/л натрия хлорида P. Суспендируют 20 объемов эритроцитов в смеси из 15 объемов инертной сыворотки, 20 объемов раствора 300 г/л альбумина бычьего P и 45 объемов раствора 9 г/л натрия хлорида P. Полученную суспензию охлаждают на ледяной бане при постоянном перемешивании.

Готовят подходящие разведения испытуемого образца и стандартного образца (например, СО ФЕАЭС иммуноглобулина анти-D человека), используя в качестве разбавителя раствор, содержащий 5 г/л альбумина бычьего P и 9 г/л натрия хлорида P.

Определение обычно проводят по изложенной ниже методике, используя соответствующий прибор для непрерывного автоматического анализа.

МЕТОДИКА

Температуру в трубках, за исключением инкубационных петель, поддерживают на уровне 15,0 °C. В трубки аппарата, используя насос, подают суспензию эритроцитов со скоростью 0,1 мл/мин и раствор 3 г/л метилцеллюлозы 450 P со скоростью 0,05 мл/мин. В течение 2 мин со скоростью 0,1 мл/мин вводят растворы испытуемого и стандартного образцов в соответствующих разведениях. Перед введением каждого следующего раствора в течение 4 мин вводят разбавитель со скоростью 0,1 мл/мин.

Вводят воздух со скоростью 0,6 мл/мин. Инкубируют при температуре 37 °C в течение 18 мин, после чего разбивают скопления эритроцитов путем введения со скоростью 1,6 мл/мин раствора 9 г/л натрия хлорида P, содержащего для предотвращения разрушения агрегированных эритроцитов подходящий смачивающий агент (например, полисорбат 20 P до получения концентрации 0,2 г/л).

После оседания агглютинатов образовавшуюся суспензию дважды декантируют: вначале – со скоростью 0,4 мл/мин, затем – со скоростью 0,6 мл/мин. Не подвергшиеся агглютинации эритроциты лизируют раствором, содержащим 5 г/л октоксинола 10 P, 0,2 г/л калия феррицианида P, 1 г/л натрия гидрокарбоната P и 0,05 г/л калия цианида P, подаваемым со скоростью 2,5 мл/мин. В течении десяти минут обеспечивают условия, необходимые для выхода гемоглобина. Оптическую плотность (2.1.2.24) гемолизата регистрируют непрерывно при длине волны от 540 нм до 550 нм. Определяют диапазон концентраций антител, в котором наблюдается линейная зависимость между концентрацией и полученным изменением оптической плотности (ΔA). Исходя из полученных результатов, строят калибровочную кривую, линейный участок которой используют для расчета активности испытуемого образца.

Активность испытуемого образца рассчитывают с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

МЕТОД 2

Активность иммуноглобулина анти-D определяют методом конкурентного твердофазного иммуоферментного анализа, проводимого на титрационных микропланшетах, покрытых эритроцитами человека. Метод основан на конкурентном связывании поликлональным иммуноглобулином анти-D и биотинилированными моноклональными анти-D антителами, специфичными в отношении эпитопа D антигена, с эритроцитами человека. Активность испытуемого образца сравнивают со стандартным образцом, активность которого выражена в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца иммуноглобулина анти-D, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения.

РЕАКТИВЫ

Реактивы, при отсутствии особых указаний, должны быть аналитической степени чистоты.

Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). Растворяют в воде P 8,0 г натрия хлорида P, 0,76 г динатрия гидрофосфата безводного P, 0,2 г калия хлорида P, 0,2 г калия дигидрофосфата P и 0,2 г натрия азидата P и доводят

до объема 1000 мл этим же растворителем.

Трис-солевой буферный раствор (ТСБ). Растворяют в воде P 8,0 г натрия хлорида P и 0,6 г трис(гидроксиметил)аминометана P, корректируют pH (2.1.2.3) раствором 103 г/л хлороводородной кислоты P до значения 7,2 и доводят водой P до объема 1000 мл.

Раствор папаина. При температуре 37 °C перемешивают в течение 30 мин 1 г папаина P в 10 мл 0,067 M фосфатного буферного раствора с pH 5,4 P, центрифугируют при 10 000 g в течение 5 мин и фильтруют полученный раствор через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Для активации смешивают 1 мл фильтра, 1 мл раствора 48,44 г/л L-цистеина P и 1 мл раствора 3,72 г/л натрия эдетата P и доводят 0,067 M фосфатным буферным раствором с pH 5,4 P до объема 10 мл. Аликвоты замораживают при температуре -20 °C или ниже.

Эритроциты. Пул D-положительных эритроцитов получают не менее чем от трех доноров с группой крови 0R₂R₂. Клетки четыре раза промывают ФСБ. Центрифугируют при 1800 g в течение 5 мин, надосадочную жидкость удаляют, подходящий объем осадка эритроцитов нагревают и смешивают с подходящим объемом предварительно нагретого раствора папаина (например, в объемном соотношении 2:1) и инкубируют при температуре 37 °C в течение 10 мин. Клетки четыре раза промывают ФСБ. Хранят при температуре 4 °C с подходящим стабилизатором не более недели.

Биотинилированный Brad-5. Используют в соответствии с инструкцией производителя.

Авидин, конъюгированный со щелочной фосфатазой, или стрептавидин, конъюгированный со щелочной фосфатазой. Предпочтительно использовать модифицированный реактив, сочетающий высокую специфическую активность с низким уровнем неспецифического связывания. Используют в соответствии с инструкциями производителя.

Раствор субстрата. Используют пара-нитрофенилфосфат в соответствии с инструкцией производителя.

Буферный раствор для фиксации клеток. Растворяют в воде P 18,02 г глюкозы P, 4,09 г натрия хлорида P, 1,24 г борной кислоты P, 10,29 г натрия цитрата P и 0,74 г натрия эдетата P. Корректируют pH (2.1.2.3) до значения 7,2 – 7,3, используя раствор 40 г/л натрия гидроксида P или раствор 103 г/л хлороводород-

ной кислоты *P*, и доводят водой *P* до объема 1000 мл. Хранят при температуре 4 °С и используют холодным.

Раствор глутарового альдегида. Непосредственно перед применением 750 мкл раствора 250 г/л глутарового альдегида *P* прибавляют к 50 мл холодного ФСБ.

Титрационные микропланшеты. Плоскодонные планшеты из полистирола со свойствами поверхности, оптимизированными для иммуноферментного анализа, с высокой связывающей способностью по отношению к белкам используют для покрытия эритроцитами. Планшеты из полистирола или поливинилхлорида с круглой или конусообразной формами лунок используют для приготовления разведений растворов иммуноглобулина.

МЕТОДИКА

Готовят 0,1 % (об/об) суспензию обработанных папаином эритроцитов в холодном буферном растворе для фиксации клеток. В каждую лунку плоскодонного титрационного микропланшета помещают по 50 мкл суспензии.

Планшет центрифугируют при 350 *g* в течение 3 мин предпочтительно при температуре 4 °С. Не удаляя надосадочную жидкость, к содержимому каждой из лунок осторожно прибавляют по 100 мкл раствора глутарового альдегида и выдерживают 10 мин. Содержимое лунок сливают путем быстрого переворачивания планшета и трижды промывают каждую лунку 250 – 300 мкл ФСБ. Эту процедуру производят вручную или с использованием автоматического устройства для промывания планшетов. После удаления ФСБ планшет используют в испытании или хранят при температуре 4 °С не более 1 месяца после прибавления в каждую лунку по 100 мкл буферного раствора для фиксации клеток и запечатывания полимерной пленкой.

Испытуемые растворы. В случае лиофильно высушенных лекарственных препаратов их восстанавливают в соответствии с инструкцией по медицинскому применению. Готовят пять последовательных двукратных разведений, начиная с концентрации 30 МЕ/мл, с использованием ФСБ, содержащего 10 г/л альбумина бычьего *P* в четырех повторностях. При необходимости, исходное разведение корректируют с целью получения эффектов, попадающих в линейную область графика зависимости «доза – ответ».

Растворы сравнения. Восстанавливают стандартный образец (например, СО ФЕАЭС иммуноглобулина анти-*D* человека) в соответствии с указаниями производителя. Готовят пять последовательных двукратных разведений, начиная с концентрации 30 МЕ/мл, с использованием ФСБ, содержащего 10 г/л альбумина бычьего *P*, в четырех повторностях.

В каждую серию лунок титрационного микропланшета с круглой или конусообразной формами лунок вносят по 35 мкл соответствующего разведения испытуемого раствора или раствора сравнения. К содержимому каждой лунки прибавляют по 35 мкл биотинилированного *Brad-5* в концентрации 250 нг/мл.

Осушают лунки планшета, покрытого эритроцитами, путем переворачивания и высушивания бумажным полотенцем. Прибавляют в каждую лунку по 250 мкл ФСБ, содержащего 20 г/л альбумина бычьего *P*, и выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С в течение 30 мин.

Осушают лунки планшета, покрытого эритроцитами, путем переворачивания и высушивания бумажным полотенцем, и помещают в каждую серию лунок по 50 мкл соответствующего испытуемого раствора или раствора сравнения, содержащих биотинилированный *Brad-5*.

В качестве отрицательного контроля используют 50 мкл ФСБ, содержащего 10 г/л альбумина бычьего *P*. Планшет запечатывают полимерной пленкой и инкубируют при температуре от 15 °С до 25 °С в течение 1 ч.

Удаляют жидкость из лунок планшета, покрытого эритроцитами, и трижды промывают каждую лунку 250 – 300 мкл ТСБ.

В каждую лунку прибавляют по 50 мкл авидина, конъюгированного со щелочной фосфатазой, или стрептавидина, конъюгированного со щелочной фосфатазой, разбавленного ТСБ, содержащим 10 г/л альбумина бычьего *P*. Инкубируют в течение 30 мин при температуре от 15 °С до 25 °С.

Удаляют жидкость из лунок планшета, покрытого эритроцитами, и трижды промывают каждую лунку 250 – 300 мкл ТСБ.

В каждую лунку прибавляют по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют в темноте при температуре от 15 °С до 25 °С в течение 10 мин. Для остановки реакции в каждую лунку прибавляют по 50 мкл 3 М раствора натрия гидроксида *P*. Измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм. Для построения кривой из значений, полученных для испытуемых и

стандартных растворов, вычитают значение, полученное для отрицательного контроля. Значения оптической плотности в линейной области калибровочной кривой используют для расчета активности испытуемого образца с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

МЕТОД 3

Активность анти-D иммуноглобулина человека определяют методом проточной цитометрии. Метод основан на специфическом связывании иммуноглобулина анти-D с D-положительными эритроцитами. Активность испытуемого образца сравнивают со стандартным образцом, активность которого выражена в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца иммуноглобулина анти-D, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения.

РЕАКТИВЫ

Реактивы, при отсутствии особых указаний, должны быть аналитической степени чистоты.

Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). Растворяют в воде *P* 8,0 г натрия хлорида *P*, 0,76 г динатрия гидрофосфата безводного *P*, 0,2 г калия хлорида *P*, 0,2 г калия дигидрофосфата *P* и 0,2 г натрия азиды *P* и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем.

Раствор ФСБ-БСА (ФСБ-БСА). ФСБ, содержащий 10,0 г/л альбумина бычьего *P*.

Эритроциты. Пул D-положительных эритроцитов получают от доноров с группой крови $0R_1R_1$ не ранее, чем за две недели до испытания. При необходимости хранят с соответствующим стабилизатором при температуре 4 °С. Клетки промывают не менее двух раз ФСБ-БСА и готовят суспензию, содержащую от $1 \cdot 10^4$ клеток в микролитре до $5 \cdot 10^4$ клеток в микролитре, с использованием ФСБ-БСА.

Пул D-отрицательных эритроцитов получают от доноров с группой крови $0rr$ и подготавливают аналогичным образом.

Вторичные антитела. Подходящий фрагмент анти-IgG-антитела, связанный с флуоресцентным красителем, обладающий специфичностью в отношении IgG человека или его

фрагментов. Хранят и используют в соответствии с инструкцией производителя.

Титрационные микропланшеты. Плоскостонные планшеты для иммуноферментного анализа без поверхностной обработки.

МЕТОДИКА

Испытуемые растворы. Лиофильно высушенные лекарственные препараты восстанавливают в соответствии с инструкцией по медицинскому применению. Готовят не менее трех полутора- или двукратных разведений, начиная с концентрации в диапазоне 1,2 – 0,15 МЕ/мл, с использованием ФСБ-БСА не менее чем в трех повторностях. При необходимости исходное разведение корректируют с целью получения эффектов, попадающих в линейную область графика зависимости «доза – ответ».

Растворы сравнения. Восстанавливают стандартный образец (например, *СО ФЕАЭС иммуноглобулина анти-D человека*) в соответствии с указаниями производителя. Готовят не менее трех полутора- или двукратных разведений, начиная с концентрации в диапазоне 1,2 – 0,15 МЕ/мл, с использованием ФСБ-БСА не менее чем в трех повторностях. При необходимости исходное разведение корректируют с целью получения эффектов, попадающих в линейную область графика зависимости «доза – ответ».

В каждую лунку титрационного микропланшета вносят по 50 мкл D-положительных эритроцитов. К содержимому каждой серии лунок прибавляют по 50 мкл соответствующего разведения испытуемого образца или стандартного образца. В качестве отрицательного контроля в серию соответствующих лунок прибавляют по 50 мкл ФСБ-БСА. Для контроля неспецифического связывания вносят по 50 мкл D-отрицательных эритроцитов в свободные лунки того же микропланшета и к содержимому каждой серии лунок прибавляют по 50 мкл наименьшего разведения испытуемого образца или стандартного образца. В качестве отрицательного контроля в серию соответствующих лунок, содержащих по 50 мкл D-отрицательных эритроцитов, вносят по 50 мкл ФСБ-БСА. Запечатывают пластиковой пленкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 40 мин.

Планшет центрифугируют при 50 g в течение трех минут, удаляют надосадочную

жидкость и промывают лунки 200 – 250 мкл ФСБ-БСА. Планшеты промывают не менее двух раз. Планшеты центрифугируют при 50 g в течение трех минут, удаляют надосадочную жидкость и прибавляют по 50 мкл раствора вторичного антитела, полученного разведением с помощью ФСБ-БСА до подходящей концентрации (рабочий титр вторичных антител заранее устанавливают опытным путем). Запечатывают полимерной пленкой и инкубируют при температуре от 15 °С до 25 °С в защищенном от света месте в течение 20 мин.

По окончании инкубации с вторичными антителами планшет отмывают не менее двух раз путем центрифугирования при 50 g в течение трех минут с 200 – 250 мкл ФСБ. Удаляют надосадочную жидкость и ресуспендируют эритроциты в 200 – 250 мкл ФСБ.

Суспензию клеток переносят в подходящие пробирки, совместимые с моделью проточного цитофлуориметра. При необходимости, для обеспечения подходящей скорости потока объемом полученных образцов доводят ФСБ до оптимального значения.

Накопление данных производят не позднее 20 мин от окончания пробоподготовки. Для статистического анализа накапливают не менее 10 000 событий без выхода за пределы установленного порогового значения какого-либо параметра с исключением нецелевых (дебрисных) включений (в том числе мертвых клеток). Учитывают медианную интенсивность флуоресценции и процент положительных клеток. С использованием значения медианной интенсивности флуоресценции в линейной области кривой зависимости «доза – ответ» рассчитывают активность испытуемого образца общепринятыми статистическими методами (2.3.12.0).

201110006-2023

2.1.11.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ Fc-ФРАГМЕНТА ИММУНОГЛОБУЛИНА

В общей фармакопейной статье описаны методики определения функционального состояния Fc-фрагмента иммуноглобулина методом комплемент-зависимого гемолиза.

Методика 2 является адаптацией методики 1 для микропланшетов при измерении комплемент-зависимого гемолиза. В статье указаны различия при проведении испытаний методикой 1 и методикой 2.

МЕТОД КОМПЛЕМЕНТ-ЗАВИСИМОГО ГЕМОЛИЗА

РЕАКТИВЫ

Стабилизированная кровь человека. Кровь доноров с группой крови O(I) собирают в контейнеры с антикоагулянтом. Стабилизированную кровь хранят при температуре 4 °С не более 3 недель.

Фосфатно-солевой буферный раствор с рН 7,2. Растворяют 1,022 г *динатрия гидрофосфата безводного Р*, 0,336 г *натрия дигидрофосфата безводного Р* и 8,766 г *натрия хлорида Р* в 800 мл *воды Р* и доводят до объема 1000 мл тем же растворителем.

Основной раствор магния и кальция. Растворяют 1,103 г *кальция хлорида Р* и 5,083 г *магния хлорида Р* в *воде Р* и доводят до объема 25 мл тем же растворителем.

Основной раствор барбиталового буфера. Растворяют 207,5 г *натрия хлорида Р* и 25,48 г *барбитала натрия Р* в 4000 мл *воды Р* и доводят рН раствора до значения 7,3, используя раствор 103 г/л *хлороводородной кислоты Р*. Прибавляют 12,5 мл основного раствора магния и кальция и доводят *водой Р* до объема 5000 мл. Фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм). Хранят при температуре 4 °С в прозрачных емкостях.

Альбумин-барбиталовый буферный раствор. Растворяют 0,150 г *альбумина бычьего Р* в 20 мл основного раствора барбиталового буфера и доводят *водой Р* до объема 100 мл. Готовят непосредственно перед использованием.

Раствор таниновой кислоты. Растворяют 10 мг *таниновой кислоты Р* в 100 мл фосфатно-солевого буферного раствора с рН 7,2. Готовят непосредственно перед использованием.

Комплемент морской свинки. Готовят пул сыворотки из крови не менее чем 10 морских свинок. Сыворотку отделяют центрифугированием при температуре около 4 °С и хранят в небольших количествах при температуре ниже –70 °С. Непосредственно перед началом комплемент-зависимого гемолиза разводят

альбумин-барбиталовым буферным раствором до 125 – 200 CH_{50} /мл и хранят в ледяной бане во время испытания (CH_{50} (гемолитическая единица активности комплемента) – концентрация комплемента в контрольной сыворотке, вызывающая в данных условиях испытания лизис 50 % эритроцитов).

Антиген краснухи. Для определения титра ингибирования геагглютинации в испытании может быть использован антиген краснухи, титр которого должен быть менее 1:256 геагглютинирующих единиц.

ОБРАБОТКА ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ТАНИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Эритроциты отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной крови человека. Промывают клетки не менее трех раз фосфатно-солевым буферным раствором с pH 7,2 и ресуспендируют в этом же растворе до получения концентрации 2 % (об/об). К 14,8 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,2 прибавляют 0,2 мл раствора таниновой кислоты и смешивают один объем полученного свежеприготовленного раствора с одним объемом суспензии эритроцитов человека. Инкубируют при температуре 37 °C в течение 10 мин. Клетки отделяют центрифугированием (800 g в течение 10 мин), надосадочную жидкость удаляют, а клетки однократно промывают фосфатно-солевым буферным раствором с pH 7,2. Обработанные таниновой кислотой эритроциты ресуспендируют в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,2 до получения концентрации 1 % (об/об).

ФИКСАЦИЯ АНТИГЕНА НА ПОВЕРХНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ, ОБРАБОТАННЫХ ТАНИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

К подходящему объему (V_s) суспензии эритроцитов, обработанных таниновой кислотой, прибавляют антиген краснухи (0,2 мл на 1,0 мл суспензии клеток) и инкубируют при температуре 37 °C в течение 30 мин. Клетки отделяют центрифугированием (800 g в течение 10 мин) и удаляют надосадочную жидкость. Прибавляют альбумин-барбиталовый буферный раствор в объеме, равном объему удаленной надосадочной жидкости, клетки ресуспендируют, отделяют, как описано выше, и повторяют операцию промывки.

Клетки ресуспендируют с помощью альбумин-барбиталового буферного раствора, используя объем, эквивалентный $\frac{3}{4} V_s$, получая таким образом начальный объем (раствор V_i).

Смешивают 900 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора с 100 мкл раствора V_i , получая таким образом объем (V_r), и определяют исходную оптическую плотность при длине волны 541 нм (A). Разводят V_r с коэффициентом разведения, равным A , с помощью альбумин-барбиталового буферного раствора, получая таким образом конечный скорректированный объем сенсibilизированных человеческих эритроцитов ($V_f = V_r \cdot A$) и доводя значение A до $1,0 \pm 0,1$ для десятикратного разведения.

СВЯЗЫВАНИЕ АНТИТЕЛАМИ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Готовят последовательно в двух повторностях нижеперечисленные растворы, используя для каждого из них отдельную одноразовую кювету или пробирку.

Испытуемые растворы. При необходимости доводят значение pH испытуемого раствора иммуноглобулина до 7,0.

При выполнении методики 1 объемы испытуемого образца разводят альбумин-барбиталовым буферным раствором таким образом, чтобы в 900 мкл раствора содержалось от 30 мг до 40 мг иммуноглобулина.

При выполнении методики 2 объемы испытуемого образца разводят альбумин-барбиталовым буферным таким образом, чтобы в 1200 мкл раствора содержалось от 15 мг до 30 мг иммуноглобулина.

Растворы сравнения. Готовят так же, как и испытуемые растворы с использованием СО ФЕАЭС иммуноглобулина человека для оценки функционального состояния Fc-фрагмента.

Контроль комплемента. Альбумин-барбиталовый буферный раствор используют в таком же объеме, что и испытуемый раствор.

При выполнении методики 1 к содержимому каждой кюветы или пробирки прибавляют по 100 мкл сенсibilизированных эритроцитов человека и хорошо перемешивают. Инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин, прибавляют 1000 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора, отделяют клетки центрифугированием (1000 g в течение 10 мин) и удаляют 1900 мкл надосадочной жидкости. Прибавляют 1900 мкл

альбумин-барбиталового буферного раствора и повторяют операцию промывки, оставляя объем 200 мкл. Полученные образцы могут храниться в герметично укупоренных кюветах (пробирках) при температуре 4 °С не более 24 ч.

При выполнении методики 2 к содержимому каждой кюветы или пробирки прибавляют по 300 мкл сенсibilизированных эритроцитов человека и хорошо перемешивают (конечная концентрация иммуноглобулина в пределах от 10 мг/мл до 20 мг/мл). Инкубируют при температуре от 15 °С до 25 °С в течение 15 мин, прибавляют 1500 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора, отделяют клетки центрифугированием (1000 *g* в течение 10 мин) и удаляют надосадочную жидкость. Прибавляют 3000 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора и повторяют всю операцию промывки четыре раза, оставляя объем 300 мкл. Полученные образцы могут храниться в герметично укупоренных кюветах (пробирках) при температуре 4 °С не более 24 ч.

КОМПЛЕМЕНТ-ЗАВИСИМЫЙ ГЕМОЛИЗ

При выполнении методики 1 для измерения гемолиза к полученному образцу прибавляют 600 мкл предварительно нагретого до температуры 37 °С альбумин-барбиталового буферного раствора, тщательно ресуспендируют клетки путем пипетирования (не менее пяти раз) и помещают кювету в термостатированный держатель кювет спектрофотометра. Через 2 мин прибавляют 200 мкл разведенного компонента морских свинок 125 – 200 CH_{50} /мл, двукратно пипетируют для перемешивания и сразу начинают регистрацию оптической плотности через установленные промежутки времени при длине волны 541 нм с использованием альбумин-барбиталового буферного раствора в качестве компенсационного раствора. Измерение прекращают при очевидном прохождении точки перегиба графика зависимости оптической плотности от времени.

При выполнении методики 2 для измерения степени гемолиза к полученному образцу прибавляют 900 мкл предварительно нагретого до температуры 37 °С альбумин-барбиталового буферного раствора, осторожно ресуспендируют клетки путем пипетирования (не менее пяти раз). Микропланшеты должны быть предварительно нагреты до температуры 37 °С. Переносят по 240 мкл каждой суспензии в 4 лунки

микропланшета и инкубируют при температуре 37 °С в течение шести минут, осторожно встряхивая каждые 10 с. В каждую лунку микропланшета прибавляют по 60 мкл разведенного компонента морских свинок 150 CH_{50} /мл, тщательно перемешивают в течение 10 с и начинают регистрацию оптической плотности при длине волны 541 нм при температуре 37 °С; измерение проводят каждые 20 с. Измерение прекращают при очевидном прохождении точки перегиба графика зависимости оптической плотности от времени.

ОЦЕНКА

Для каждой кюветы (пробирки, лунки) определяют угол наклона (S) кривой гемолиза в области точки перегиба путем сегментации участка с наибольшим наклоном на подходящие временные отрезки (например, $\Delta t = 1$ мин) и вычисляют значения S между соседними точками пересечений, выраженные как изменения оптической плотности в минуту ($\Delta A/\text{мин}$). Наибольшее значение S является экспериментально установленным углом наклона кривой гемолиза (S_{exp}). Кроме того, определяют оптическую плотность в начале измерения (A_s) путем экстраполяции кривой, практически линейной и параллельной оси времени в течение первых нескольких минут. Корректируют значение S_{exp} по формуле:

$$S' = \frac{S_{exp}}{A_s}$$

Рассчитывают среднее арифметическое значений S' для каждого образца (испытуемого раствора и раствора сравнения).

Рассчитывают индекс функционального состояния F_c -фрагмента (I_{Fc}) по формуле:

$$I_{Fc} = \frac{100 \cdot \bar{S}'_s - \bar{S}'_c}{\bar{S}'_s - \bar{S}'_c}$$

где: \bar{S}' — среднее арифметическое скорректированного угла наклона для испытуемого раствора;

\bar{S}'_s — среднее арифметическое скорректированного угла наклона для раствора сравнения;

\bar{S}'_c — среднее арифметическое скорректированного угла наклона для контроля компонента.

Рассчитывают индекс функционального состояния Fc-фрагмента для испытуемого образца: значение должно быть не менее указанного для стандартного образца.

201110007-2023

2.1.11.7. ПОДСЧЕТ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК CD34+/CD45+ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТАХ

Общая фармакопейная статья описывает методологию определения количества клеток CD34+/CD45+, содержащихся в биологических продуктах, путем проведения иммунного мечения и анализа методом проточной цитометрии (2.1.6.16). Под биологическими продуктами в данной общей фармакопейной статье понимают биологические лекарственные средства, а также исходные материалы и промежуточные продукты для их производства, содержащие гемопоэтические клетки. Определение выполняют на основе одноплатформенного метода с использованием калиброванных флуоросфер. При необходимости проводят предварительный лизис эритроцитов в образцах крови.

Метод применим ко всем типам биологических продуктов. Особенности метода делают его наиболее подходящим для продуктов с очень низким содержанием клеток CD34+/CD45+.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА НА ОСНОВЕ ПОДСЧЕТА КЛЕТОК CD34+/CD45+

Установлено, что 1 – 3 % клеток костного мозга, выделяющие поверхностный клеточный антиген CD34, способны к восстановлению долгосрочного многостадийного гемопоэза после миелоаблативной высокодозной терапии. Клетки CD34+/CD45+ также присутствуют в незначительном количестве (от 0,01 % до 0,1 %) в периферической крови здоровых людей. Клетки CD34+/CD45+ в значительных количествах могут быть мобилизованы из костного мозга в периферическую кровь под действием гемопоэтических цитокинов, таких как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, и (или) химиотерапии. Метод, используемый для подсчета клеток CD34+/CD45+, должен соответ-

ствовать следующим требованиям:

- высокая чувствительность (в связи с малым количеством гемопоэтических стволовых клеток);
- точность (для обеспечения клинически значимых результатов);
- воспроизводимость (для обеспечения клинически надежных результатов);
- скорость (для обеспечения проведения анализа в реальном времени).

ВЫБОР ПАРАМЕТРОВ

В проточной цитометрии используют коммерчески доступные моноклональные антитела, конъюгированные с флуорофором, стандартные процедуры окрашивания и лизиса цельной крови, а также применяют стратегию гейтирования с использованием светорассеяния и иммунофлуоресцентного анализа с применением комбинации пан-CD34/CD45 моноклональных антител.

Жизнеспособность клеток CD34+/CD45+ можно определить с помощью соответствующего окрашивания нуклеиновых кислот красителем, не проникающим через интактную клеточную мембрану (например, 7-аминоактиномицин D).

Выбор моноклональных антител

Антитела к CD34. Для обнаружения всех вариантов гликозилирования молекулы (например, клон 8G12 или 581) используют антитела к CD34 класса III. Для обнаружения редких эффектов используют антитела, конъюгированные с флуорофорами (например, фикоэритрин), имеющими максимальное свечение при использовании проточного цитометра с аргоновым лазером.

Антитела к CD45. Необходимо использовать пан-CD45 антитела, обнаруживающие все изоформы и все гликоформы этой структуры. Обычно используют антитела к CD45, конъюгированные с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) в качестве флуорофора (например, J33, HLe1, 2D1).

Контроли изотипов и изоклонов. Для обнаружения неспецифичных сигналов в области флуоресценции фикоэритрина используют отрицательный контроль. При применении контроля изотипов (моноклональные антитела к нерелевантным антигенам того же изотипа, что и используемые антитела к CD34) фикоэритрин-конъюгированный изотип объединяют с CD45-ФИТЦ (или PerCP). При применении контроля изоклонов неконъюгированные (в из-

бытке) и фикоэритрин-конъюгированные моноклональные антитела, идентичные антителам к *CD34*, объединяют с конъюгированными антителами к *CD45*. Могут быть использованы альтернативные комбинации.

Определение абсолютного количества клеток *CD34+/CD45+*

Калиброванные флуоросферы. В зависимости от применяемого оборудования, внутренний стандарт может представлять собой калиброванные сферы, находящиеся в суспензии, или может быть помещен непосредственно в прилагаемые производителем пробирки.

Абсолютное количество клеток *CD34+/CD45+* в миллилитре рассчитывают по формуле:

$$\frac{A}{B} \cdot C$$

где: *A* — количество подсчитанных клеток *CD34+/CD45+*;

B — количество подсчитанных флуоросфер;

C — известная концентрация флуоросфер.

Стратегии гейтирования

Целью стратегии гейтирования является последовательный выбор интересующей популяции и одновременная минимизация интерференции, вызываемой дебрисом (фрагментами клеток) и зрелыми клетками, с которыми антитела могут неспецифически связываться. При использовании коммерческих наборов применяют стратегию гейтирования, рекомендованную производителем набора. При использовании собственной методики применяют существующие рекомендуемые стратегии. Стратегия гейтирования, учитывающая параметры светорассеяния и флуоресценцию, будет обеспечивать правильную идентификацию и подсчет клеток *CD34+/CD45+*.

Количество обрабатываемых событий

Для достижения приемлемых правильности и прецизионности анализируют достаточное количество событий, например, не менее 100 событий *CD34+* и не менее 60 000 событий *CD45+*; общее количество клеток может быть выше при условии, если процентное содержание *CD34* составляет 0,1 % или менее.

ОТБОР И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ ПРОБ

Антикоагулянт при процедуре афереза является цитрат декстроза (состав А). Данный

антикоагулянт позволяет проводить на одном и том же испытуемом образце как автоматизированный подсчет клеток, так и испытание с помощью проточной цитометрии. При отборе проб периферической крови в качестве антикоагулянта, как правило, используют этилендиаминтетрауксусную кислоту.

Условия транспортирования проб должны гарантировать постоянство температуры и физическую сохранность проб.

ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Испытанию могут быть подвергнуты свежие (хранившиеся не более 24 ч) пробы продуктов афереза, цельной крови, пуповинной крови или костного мозга. Пробы, хранившиеся более 24 ч и пробы, которые претерпели заморозку и размораживание, окрашивают красителями, позволяющими оценить количество жизнеспособных клеток. При приеме проб проверяют температуру внутри упаковки.

МЕТОДИКА

ПРОБОПОДГОТОВКА ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА

Перед окрашиванием с помощью моноклональных антител необходимо убедиться, что концентрация клеток является подходящей. При необходимости испытуемый образец разводят средой, совместимой с испытуемым образцом и системой для лизиса. Учитывают коэффициент разведения. Рекомендуется проводить испытание с использованием отрицательного контроля.

АНАЛИЗ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Автоматическая стандартизация

Для анализа клеток, меченных с применением коммерчески доступных наборов, производители разрабатывают критерии для настройки проточного цитометра. Данные настройки затем автоматически переносят в протокол анализа испытуемых образцов. Для настройки фотумножительной трубки на заданные значения используют специальные флуоросферы, устанавливают поправку и проверяют систему с помощью контрольных образцов.

Настройки системы

Пороговое значение: во избежание учета дебриса (низкий уровень прямого светорассеяния) вместо

мелких форм лимфоцитов, на графике светорассеяния устанавливают порог прямого угла рассеяния.

Высоковольтные настройки фотоумножительной трубки: должны быть совместимы с анализом поверхностных клеточных маркеров; устанавливают в каждой лаборатории таким образом, чтобы была возможность различить отрицательные и положительные популяции клеток с умеренной плотностью антигенов; напряжение фотоэлектронных умножителей необходимо периодически проверять и настраивать в соответствии со стандартными процедурами, принятыми в лаборатории.

Поправка: должна быть применена в случае интерференции в видимом диапазоне спектра (например, ФИТЦ/фикоэритрин), обнаруженной при анализе поверхностных клеточных маркеров; поправку на цвет анализируют и настраивают в соответствии со стандартными процедурами, принятыми в лаборатории.

Скорость потока: должна подходить для рутинного анализа поверхностных клеточных маркеров.

Диапазоны гейтирования: области, установленные для образцов *CD34/CD45*, которые оставляют неизменными для анализа отрицательной области.

Расчет абсолютного количества клеток *CD34+/CD45+*

Абсолютное количество клеток *CD34+/CD45+* рассчитывают по формуле:

$$n \cdot D \cdot V$$

где: *n* — общее количество клеток *CD34+/CD45+* в микролитре;
D — фактор разведения;
V — объем испытуемого образца, в микролитрах

Результаты испытания выражают как содержание клеток *CD34+/CD45+* в процентах, так и абсолютное количество клеток в микролитре. Если применимо, результаты могут быть выражены в абсолютном количестве клеток на килограмм массы тела реципиента.

2.1.11.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПО КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩИМ КЛЕТКАМ

Количество гемопоэтических прогениторных клеток человека определяют с помощью клоногенного анализа, основанного на их способности образовывать колонии или кластеры клеток в полужидких культуральных средах.

Определение в клеточном продукте количества клеток, способных к образованию колоний (колониеобразующих клеток, КОК), представляет собой индикатор функциональной способности прогениторных клеток. Измеренное количество КОК коррелирует с количеством прогениторных клеток, присутствующих в образце.

ПОВЕРХНОСТНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МАРКЕРЫ

Способность КОК формировать гемопоэтические колонии *in vitro* и (или) восстанавливать систему гемопоэза коррелирует с экспрессией определенных поверхностных клеточных антигенов. Экспрессия мембранного антигена *CD34* является маркером для большинства гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток.

ОСОБЕННОСТИ ИСПЫТАНИЯ

Колонии КОК могут содержать одну или несколько линий гемопоэтических клеток, которые идентифицируют в соответствии с классификацией, основанной на кластерах зрелых клеток, присутствующих в колонии в конце культивирования в полужидкой среде (например, смешанные колониеобразующие единицы; колониеобразующие единицы гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов, макрофагов (КОЕ-ГЭММ); колониеобразующие единицы гранулоцитов и макрофагов (КОЕ-ГМ); колониеобразующие единицы гранулоцитов (КОЕ-Г); колониеобразующие единицы макрофагов (КОЕ-М); бурстобразующие единицы эритроцитов (БОЕ-Э); колониеобразующие единицы эритроцитов (КОЕ-Э); колониеобразующие единицы мегакариоцитов (КОЕ-Meg)).

Количество и тип факторов роста, внесенных во время культивирования, определяют тип и размер колоний, которые будут сформированы.

Время, требуемое для дифференцировки *in vitro* в зрелые клетки, предоставляет дополнительную информацию о классе гемопоэтических прогениторных клеток и их относительном пролиферативном потенциале. Время, необходимое для формирования *in vitro* колоний зрелых клеток (взрослого типа) из постнатальных КОК, составляет от 10 сут до 14 сут.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИСПЫТАНИЯ

Важнейшим условием для обеспечения качества испытания клоногенности является использование строго стандартизованных процедур, в валидацию которых следует включать проведение внутри- и межлабораторных испытаний.

Источники материалов, в том числе реактивов, факторов роста и расходных одноразовых материалов, должны быть идентифицированы и документированы.

Основными факторами, влияющими на вариабельность испытания клоногенности, являются количество внесенных в лунки клеток и идентификация колоний. Для одного и того же испытания может наблюдаться внутрилабораторная вариабельность до 15 %. Если необходимо оценить количество КОК в чистой клеточной популяции, можно использовать подход с предельным разведением, при котором количество лунок с наблюдаемой клеточной пролиферацией, измеряют с помощью автоматизированной системы.

Другой важной причиной вариабельности является использование в испытании материалов сложного неопределенного состава (например, эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота или бычьего сывороточного альбумина), полученных из пулов исходных материалов и способствующих неспецифической стимуляции клеточной пролиферации. Однако довольно часто встречаются серии материалов с особыми характеристиками, которые селективно стимулируют пролиферацию специфических гемопоэтических линий.

Для проведения клоногенного анализа целесообразно использовать материалы с низким содержанием эндотоксинов (менее 0,01 МЕ/мл или менее 0,01 МЕ/мг), по-

скольку более высокое их содержание приводит сначала к последовательному изменению экспрессии гемопоэтических клонов в культурах, а впоследствии – в целом к ингибированию клеточной пролиферации и клоногенеза.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩИХ КЛЕТОК

Количественное определение КОК основано на способности прогениторных клеток формировать колонию при внесении в полужидкую культуральную среду или в гель в присутствии определенных факторов роста. В зависимости от цели испытания и способа регистрации результатов могут использоваться различные типы полужидких сред (например, метилцеллюлоза, коллаген, агар и свернувшаяся плазма). Коммерчески доступные среды обычно дают более воспроизводимые результаты.

МАТЕРИАЛЫ

Испытания проводят, как минимум, для следующих критических материалов.

Факторы роста

Для получения наибольшего числа колоний из клеточной суспензии, содержащей смешанную популяцию гемопоэтических прогениторных клеток, требуются факторы роста, стимулирующие как множество линий (например, *Kit*-лиганд или фактор стволовых клеток, интерлейкин 3, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), так и определенные линии (эритропоэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор).

Другие компоненты культуральной среды

В среды могут быть добавлены сыворотки (в частности, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота) и (или) альбумин.

КУЛЬТУРА КЛЕТОК

Клетки

Испытуемый образец для культивирования должен быть репрезентативной пробой клеточного продукта. Для этого испытания необходимо использовать суспензии клеток. В случае использования аспирации костного мозга такие суспензии могут быть получены, путем продавливания костного мозга через решетчатые фильтры или через постепенно уменьшающийся диаметр игл. Для диспергирования клеточных

кластеров в клеточную суспензию, как правило, достаточно повторных продавливаний через иглу размера 21G.

ПОСЕВ В ЧАШКУ И ПОДСЧЕТ

Суспензию клеток в культуральной среде смешивают с полужидкой средой. Обычно 1 мл смеси вносят в необработанную стерильную чашку Петри (диаметром 35 мм).

Из-за вязкости среды смесь не может быть нанесена на чашку с помощью автоматического дозатора, и требуется использование шприцов с иглами большого диаметра (размер 18G и менее).

Количество клеток, высеваемых в чашку Петри, зависит от концентрации гемопоэтических прогениторных клеток в испытуемом образце. Количество клеток должно приводить к образованию от 40 до 80 колоний на чашку (диаметром 35 мм), для предотвращения образования одной колонии из двух разных гемопоэтических прогениторных клеток.

Целевое количество колоний на чашку может быть рассчитано из процентного содержания клеток *CD34+* (или из концентрации клеток *CD34+* в миллилитре), определенного методом проточной цитометрии (2.1.6.16) или путем использования различных разведений клеточной суспензии (как правило, проверяют не менее двух концентраций).

Чашки инкубируют в аэробных условиях с концентрацией углекислого газа 5 % при температуре 37 °C во влажной (насыщенной) атмосфере в течение 10 – 14 сут и подсчитывают количество колоний с использованием инвертированного микроскопа. При манипуляциях с чашками, содержащими колонии, соблюдают меры предосторожности, поскольку среда с метилцеллюлозой является вязкой, но не желеобразной. Наклон чашки может привести к формированию сливающихся и кометообразных колоний, что делает подсчет некорректным.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОЛОНИЙ

Размер и структура колоний зависят от типа зрелых клеток, из которых они образованы. Обычно минимальное количество клеток на колонию составляет 50. Присутствие гемоглобинизированных клеток указывает на наличие прогениторных клеток эритробластного ряда. Поскольку количество зрелых клеток для каждой линии дифференцировки в значитель-

ной степени зависит от факторов роста, добавленных к культурам клеток, выполнение дифференцированного подсчета не рекомендуется, если иное не указано в частной фармакопейной статье и (или) нормативном документе по качеству.

ИНТЕПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты испытания обычно выражают как среднее арифметическое количества колоний, посчитанных не менее чем в 3 чашках, которое затем выражают в пересчете на 10^4 или 10^5 эукариотических жизнеспособных клеток, составляющих культуру.

201110009-2023

2.1.11.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Определение качества суспензий эукариотических клеток требует точного измерения как концентрации, так и содержания жизнеспособных клеток, выраженного в процентах. Эти данные необходимы для процесса принятия решений при производстве клеточных продуктов и поддержания оптимальных условий культивирования. Количество клеток может быть выражено как число клеток на объем клеточной суспензии, а жизнеспособность клеток – как число живых клеток на объем клеточной суспензии. Процедура подсчета клеток может быть выполнена вручную (гемоцитометр) или с использованием автоматических устройств (например, счетчик частиц, проточный цитометр). Также могут быть использованы и другие методы.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК

РУЧНОЙ МЕТОД ПОДСЧЕТА

Описание прибора и принцип испытания
Необходимо следующее оборудование:

– гемоцитометр: специальная камера в различных модификациях для микроскопического исследования. Камера состоит из толстого предметного стекла и покровного шлифованного стекла, предназначенного для разграничения камеры с определенным объемом для каждой моди-

фикации. На предметном стекле выгравированы глубокие бороздки, предназначенные для предупреждения перекрестного заполнения, и нанесена сетка, специфичная для каждой модели;

– световой микроскоп от 10× до 40× кратно-го увеличения;

– пипетки подходящего объема.

Гемоцитометр используют для определения количества клеток в суспензии путем расчета концентрации клеток в миллилитре (C), по формуле:

$$C = a \cdot 10^n \cdot d$$

где: a — число подсчитанных клеток;

d — коэффициент разведения (при необходимости);

n — коэффициент, меняющийся в зависимости от объема камеры гемоцитометра.

В смешанной популяции распознавание клеток проводят по их различиям в размерах или окраске (например, лейкоциты и эритроциты).

Подготовка камеры для подсчета и анализ. Покровное стекло устанавливают на предметное стекло. Притирают покровное стекло, избегая наличия пузырьков воздуха в камере. Готовят подходящее разведение клеточной суспензии в растворе 9 г/л натрия хлорида P или буферном растворе с добавками для предотвращения гемолиза.

Подходящий объем разведенной клеточной суспензии помещают в камеру подсчета, через щель, образующуюся между покровным стеклом и счетной камерой. Клеточная суспензия заполняет камеру подсчета благодаря капиллярности. Подсчет клеток в гемоцитометре проводят под микроскопом, настраиваемом так, чтобы были отчетливо различимы нанесенная сетка и клетки, распределенные на ней. Подсчитывают количество клеток на сетке и рассчитывают их концентрацию в разведенных и неразведенных образцах.

Для увеличения точности измерения необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

– используют покровное стекло подходящей толщины;

– по возможности, подсчитывают более 100 клеток (в случае необходимости, считают большее количество квадратов);

– при обнаружении кластеров клеток (клеточная суспензия содержит не только единичные клетки, но и их скопления) суспензию ресуспен-

дируют, отбирают образец и снова подсчитывают;

– для надлежащего подсчета клеток следует избегать неполного заполнения или переполнения счетной камеры.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА

Счетчики частиц, основанные на изменении проводимости

Электронные счетные устройства измеряют размер и число частиц в растворе. Перед использованием счетчики частиц калибруют раствором с известной концентрацией и размером частиц. Для подсчета частиц большего размера, применяют пробирки, оснащенные другими калибровочными насадками. Подобные приборы не позволяют различать нежизнеспособные и жизнеспособные клетки. Поскольку фрагменты клеток (дебрис) могут производить импульсы, которые вызывают ошибки, счетные устройства также оснащают пороговым контролем, позволяющим подсчитывать только большие частицы.

Прибор должен быть пригоден для подсчета клеточных продуктов (с точки зрения линейности, точности, и т.д.).

Счетчики частиц, основанные на проточной цитометрии (2.1.6.16)

Проточный цитометр калибруют по стандартным частицам известной концентрации и размера для подсчета абсолютного количества клеток в объеме. Для приборов с двумя электродами, погруженными в счетную камеру с постоянным размером и возможностью проведения измерений в фиксированном объеме, повторную калибровку проводят только при необходимости.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

Приведенные методы определения процента жизнеспособных клеток основаны на окрашивании клеток красителями и анализе суспензии клеток с помощью ручного или автоматизированного методов подсчета.

В зависимости от типа клеток и используемых методов подсчета результаты могут отличаться.

РУЧНОЙ МЕТОД

Принцип испытания

Испытание основано на проницаемости цитоплазматических мембран: нежизнеспособные

(мертвые или поврежденные клетки) абсорбируют краситель и окрашиваются, жизнеспособные клетки не окрашиваются. Испытание дает информацию о целостности мембраны, но его результаты не обязательно отражают функциональную активность клетки. Мембраны недавно трипановизированных или размороженных жизнеспособных клеток способны абсорбировать краситель.

Краситель

Наиболее часто используемым красителем для определения жизнеспособности клеток, является трипановый синий, но также могут быть использованы и другие подходящие красители, такие как эритрозин В или нигрозин.

Трипановый синий – кислотный краситель (M_r 961), анион с четырьмя сульфатными группами, легко связывающимися с белками, поэтому концентрация белка в испытуемом образце должна быть настолько низкой, насколько возможно.

Условия проведения испытания

Фиксация окраски клеток сильно зависит от значения рН, поэтому необходимо проведение окрашивания при рН в пределах от 6,6 до 7,6. Оптимальная фиксация осуществляется при значении рН 7,5. Другие условия, такие как концентрация красителя и время окрашивания, должны быть валидированы.

Условия хранения красителя. Обычно используют 0,4 % или 0,5 % раствор трипанового синего в стерильном подходящем фосфатно-солевом буферном растворе. Хранят в защищенном от воздействия света и воздуха месте.

Подготовка к испытанию и анализ. Суспензию клеток, разведенную до необходимой концентрации в подходящем фосфатно-солевом буферном растворе, окрашивают, например, с использованием раствора трипанового синего с конечной концентрацией от 0,1 % до 0,2 %. Аккуратно перемешивают. Инкубируют не более 2 – 4 мин при комнатной температуре. Вновь аккуратно перемешивают, помещают подходящий объем в счетную камеру и проводят подсчет клеток.

Определяют процент жизнеспособных клеток как отношение числа неокрашенных клеток к общему количеству клеток, подсчитанному с использованием оптического микроскопа, считая все окрашенные клетки нежизнеспособными.

Жизнеспособность клеток (V) в процентах рассчитывают по формуле:

$$V = \frac{n}{N} \cdot 100$$

где: n — число неокрашенных (жизнеспособных) клеток;
 N — общее количество клеток (окрашенных и неокрашенных).

Время инкубации не должно превышать 4 мин, так как впоследствии число окрашенных клеток может значительно увеличиться. В связи с этим для повторного определения необходимо подготовить новый образец.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ

Проточная цитометрия

Принцип испытания. Испытание основано на способности определенных красителей проникать через поврежденные мембраны и связываться с ДНК путем интеркалирования между основаниями, вследствие чего флюоресценцию нежизнеспособных клеток можно зарегистрировать с помощью проточной цитометрии (2.1.6.16). Нежизнеспособные клетки оценивают по различиям, выявляемым при окрашивании клеток, тогда как жизнеспособные клетки остаются неокрашенными. Анализ обычно выполняют с использованием 7-аминоактиномицина D (7-ААД) или пропидий-йодида, допустимо использование других подходящих красителей.

Красители. Мембранопроникающие вещества, например, 7-ААД и пропидий-йодид, могут быть использованы в качестве красителей для определения жизнеспособности клеток.

7-ААД является аналогом актиномицина D , у которого в положении 7 хромофора заменена аминокислотная группа. 7-ААД интеркалирует между цитозиновыми и гуаниновыми основаниями ДНК. Спектральные свойства 7-ААД позволяют использовать его как краситель для анализа методом проточной цитометрии. Максимум поглощения комплекса 7-ААД/ДНК расположен в зеленом диапазоне спектра и является подходящим для определения количества клеток с помощью цитометра, оснащенного аргоновым лазером (длина волны возбуждения 488 нм). Насыщенная красная флуоресцентная эмиссия 7-ААД (от 635 нм до 675 нм) обуславливает возможность его применения в комбинации

с антителами, конъюгированными с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) и фикоэритрином (ФЭ), поскольку, в отличие от пропидий-йодида, комплекс 7-ААД/ДНК имеет минимальное спектральное наложение с ФИТЦ и ФЭ.

Пропидий-йодид связывается с двухнитевой ДНК путем интеркалирования между парами оснований с небольшими предпочтениями или без них и со стехиометрией, соответствующей одной молекуле красителя на 4 – 5 пар оснований ДНК. Флуоресценция образовавшегося комплекса красителя с нуклеиновыми кислотами увеличивается в 20 – 30 раз, при этом максимум возбуждения флуоресценции смещается приблизительно на 30 – 40 нм в красную область, а максимум эмиссии флуоресценции (615 нм) – приблизительно на 15 нм в синюю область. Хотя способность пропидий-йодида к оптическому поглощению довольно низка, он проявляет достаточно большой Стоксовский сдвиг (разница длин волн максимумов спектров поглощения и флуоресценции), что позволяет одновременно обнаруживать нуклеиновые кислоты и антитела, меченные флуоресцеином при условии использования подходящих оптических фильтров.

Условия хранения растворов красителей нуклеиновой кислоты. При температуре от 2 °С до 8 °С.

Подготовка к испытанию и анализ. В случае гемопоэтических клеток краситель может быть добавлен после маркирования CD45+ на клетках для лучшего разделения клеток от клеточных фрагментов (дебриса) и тромбоцитов на основе установления области соответствия объектов по боковому светорассеянию (SS) и мечения CD45+. Условия инкубации клеточной суспензии с красителем должны быть валидированы.

Инкубацию выполняют при температуре от 15 °С до 25 °С, в защищенном от света условиях. При необходимости выполняют лизис эритроцитов, используя, например, аммония хлорид. Если в проведении лизиса нет необходимости, прибавляют только буферный раствор.

Процентное содержание жизнеспособных клеток определяют непосредственно с помощью проточного цитометра и анализа положительных клеток (нежизнеспособные клетки) на SS/7-ААД или SS/пропидий-йодид цитограммах графиках.

Положительные контроли могут состоять из стабилизированных клеток (нежизнеспособные клетки), смешанных со свежими жизнеспособными клетками в необходимом соотношении.

Цифровое изображение окрашенных клеток

Цифровое изображение позволяет автоматизировать методы с использованием световой микроскопии. Суспензию клеток и раствор красителя смешивают непосредственно в приборе. Система, которая позволяет проводить аспирацию образца, работу с реактивами и последующую очистку оборудования, полностью автоматизирована. Как только клеточная суспензия была отобрана и смешана с раствором красителя, она подается в проточную ячейку для анализа. Окрашенная клеточная суспензия протекает через камеру, где стробоскопический свет позволяет фотокамере фотографировать проходящие через счетную камеру клетки. Изображение оцифровывается, и число нежизнеспособных или жизнеспособных клеток подсчитывают с использованием программного обеспечения.

201110010-2023

2.1.11.10. АЛЮМИНИЙ В АДСОРБИРОВАННЫХ ВАКЦИНАХ И АЛЛЕРГЕНАХ

МЕТОДИКА 1

Испытуемый образец. В колбу для минерализации вместимостью 50 мл помещают соответствующее количество гомогенизированного образца, содержащего от 5 мг до 6 мг алюминия.

Прибавляют 1 мл *серной кислоты Р*, 0,1 мл *азотной кислоты Р* и несколько стеклянных шариков. Полученный раствор нагревают до выделения плотного белого дыма. Если на данной стадии наблюдается обугливание, прибавляют несколько капель *азотной кислоты Р* и продолжают кипячение до исчезновения окраски. Смесь охлаждают несколько минут, с осторожностью прибавляют 10 мл *воды Р* и кипятят до получения прозрачного раствора. Охлаждают, прибавляют 0,05 мл *раствора метилового оранжевого Р* и нейтрализуют *раствором натрия гидроксида концентрированным Р* (приблизительно 6,5 – 7 мл). Если образуется осадок, его растворяют, прибавляя по каплям достаточный объем *серной кислоты разбавленной Р*. Переносят раствор в коническую колбу вместимостью 250 мл, промывая колбу для минерализации 25 мл *воды Р*. Прибавляют 25,0 мл 0,02 М *раствора натрия эдетата*, 10 мл *ацетатного буферно-*

го раствора с pH 4,4 P , несколько стеклянных шариков и осторожно кипятят 3 мин, прибавляют 0,1 мл раствора пиридилазонафтаола P и титруют горячий раствор 0,02 M раствором меди сульфата до изменения окраски раствора на пурпурно-коричневую.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,02 M раствора натрия эдетата соответствует 0,5396 мг Al .

МЕТОДИКА 2

Испытуемый образец. В круглодонную колбу вместимостью 100 мл помещают соответствующее количество гомогенизированного образца, содержащего около 1 мг алюминия, прибавляют 2 мл раствора серной кислоты разбавленной P , перемешивают и нагревают до кипения. Во избежание выпаривания жидкости в колбу после закипания раствора периодически вносят при перемешивании от 2 до 5 раз по 5 мл воды P и продолжают нагревать до полного растворения осадка. Полученный раствор охлаждают до температуры от 15 °С до 25 °С, переносят в коническую колбу вместимостью 250 мл, промывая круглодонную колбу 25 мл воды P .

Прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора с pH 4,5 P и 10,0 мл 0,01 M раствора натрия эдетата, перемешивают и нагревают до кипения. Полученный раствор охлаждают до температуры от 15 °С до 25 °С, прибавляют 25 мл этанола (96 %) P , 1 мл раствора 0,25 г/л дитизона P в ацетоне P , перемешивают и титруют 0,01 M раствором цинка сульфата до изменения окраски на красную.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,01 M раствора натрия эдетата соответствует 0,2698 мг Al .

201110011-2023

2.1.11.11. ФЕНОЛ В ИММУНОСЫВОРОТКАХ, ВАКЦИНАХ И АЛЛЕРГЕНАХ

Испытуемый раствор. Гомогенизированный испытуемый образец разводят водой P до объема, необходимого для получения раствора фенола с концентрацией около 15 мкг/мл.

Растворы сравнения. Готовят ряд растворов сравнения с фенолом P , содержащих 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл, 20 мкг/мл и 30 мкг/мл фенола соответственно.

К 5,0 мл испытуемого раствора и 5,0 мл каждого из растворов сравнения прибавляют по 5,0 мл буферного раствора с pH 9,0 P , 5,0 мл раствора аминотиразолона P и 5,0 мл раствора калия феррицианида P . Выдерживают полученные растворы 10 мин и измеряют их оптическую плотность (2.1.2.24) при длине волны 546 нм.

Строят калибровочную кривую и рассчитывают содержание фенола в испытуемом образце.

201110012-2023

2.1.11.12. БЕЛОК В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Содержимое упаковки с испытуемым образцом количественно переносят в мерную колбу подходящего объема и доводят водой P для получения раствора полисахарида с концентрацией около 5 мг/мл. 1,0 мл полученного раствора помещают в стеклянную пробирку, прибавляют 0,15 мл раствора 400 г/л трихлоруксусной кислоты P , встряхивают, выдерживают 15 мин, центрифугируют 10 мин при скорости вращения 5000 об/мин и отбрасывают надосадочную жидкость. К полученному осадку прибавляют 0,4 мл раствора 4,2 г/л натрия гидроксида P .

Растворы сравнения. 0,100 г альбумина бычьего P растворяют в 100,0 мл раствора 4,2 г/л натрия гидроксида P (основной раствор с концентрацией белка 1 г/л). 1,0 мл основного раствора доводят раствором 4,2 г/л натрия гидроксида P до объема 20,0 мл (рабочее разведение 1 с концентрацией белка 50 мг/л). 1,0 мл основного раствора доводят раствором 4,2 г/л натрия гидроксида P до объема 4,0 мл (рабочее разведение 2 с концентрацией белка 250 мг/л). В 3 стеклянные пробирки помещают по 0,10 мл, 0,20 мл и 0,40 мл рабочего разведения 1, а в 3 другие стеклянные пробирки – по 0,15 мл, 0,20 мл и 0,25 мл рабочего разведения 2. Доводят объем раствора в каждой пробирке до 0,40 мл, используя раствор 4,2 г/л натрия гидроксида P .

Компенсационный раствор. Готовят, используя 0,40 мл раствора 4,2 г/л натрия гидроксида P .

В каждую пробирку прибавляют по 2,0 мл медно-тартратного раствора $P3$, встряхивают и выдерживают 10 мин. Далее в пробирки прибавляют по 0,2 мл смеси из равных объемов фос-

формомолибденово-вольфрамового реактива Р и воды *Р*, приготовленной непосредственно перед использованием. Закрывают пробирки, перемешивают, переворачивая их, и дают отстояться в темном месте 30 мин. Синяя окраска остается стабильной 60 мин. При необходимости центрифугируют для получения прозрачных растворов.

Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) растворов при длине волны 760 нм относительно компенсационного раствора.

Строят калибровочную кривую зависимости значений оптической плотности шести растворов сравнения от соответствующего содержания белка и с ее помощью определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

201110013-2023

2.1.11.13. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Содержимое упаковки с испытуемым образцом количественно переносят в мерную колбу подходящего объема и доводят *водой Р* для получения раствора полисахарида с концентрацией около 5 мг/мл.

При необходимости разводят испытуемый раствор до достижения значения оптической плотности, подходящего для используемого прибора. Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) раствора при длине волны 260 нм.

Оптическая плотность раствора 1 г/л нуклеиновой кислоты при длине волны 260 нм равна 20.

201110014-2023

2.1.11.14. ФОСФОР В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Содержимое упаковки с испытуемым образцом количественно переносят в мерную колбу подходящего объема и доводят *водой Р* для получения раствора полисахарида с концентрацией около 5 мг/мл. Раствор разводят до концентрации фосфора около 6 мкг/мл. Переносят 1,0 мл полученного раствора в пробирку из термостойкого стекла вместимостью 10 мл.

Растворы сравнения. 0,2194 г калия дигидрофосфата *Р* растворяют в воде *Р* и доводят тем же растворителем до объема 500,0 мл (основной раствор с концентрацией фосфора 0,1 мг/мл). 5,0 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объема 100,0 мл (разбавленный раствор с концентрацией фосфора 0,005 мг/мл). Переносят 0,5 мл, 1,0 мл и 2,0 мл разбавленного раствора в 3 пробирки из термостойкого стекла.

Компенсационный раствор. Готовят в пробирке из термостойкого стекла, используя 2,0 мл воды *Р*.

В каждую пробирку прибавляют по 0,2 мл *серной кислоты Р*. Пробирки нагревают в масляной бане при температуре 120 °С в течение 1 ч, а затем при температуре 160 °С до появления белого дыма (около 1 ч). Прибавляют по 0,1 мл *хлорной кислоты Р* и нагревают при температуре 160 °С до обесцвечивания раствора (около 90 мин). Охлаждают и прибавляют в пробирки по 4,0 мл *воды Р* и 4,0 мл *реактива аммония молибдата Р*. Нагревают в водяной бане при температуре 37 °С в течение 90 мин, охлаждают и доводят *водой Р* до объема 10,0 мл. Синяя окраска растворов остается стабильной в течение нескольких часов.

Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) растворов при длине волны 820 нм относительно компенсационного раствора.

Строят калибровочную кривую зависимости оптической плотности трех растворов сравнения от соответствующего содержания фосфора и с ее помощью определяют концентрацию фосфора в испытуемом растворе.

201110015-2023

2.1.11.15. О-АЦЕТИЛ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Содержимое упаковки с испытуемым образцом количественно переносят в мерную колбу подходящего объема и доводят *водой Р* для получения раствора полисахарида с концентрацией около 5 мг/мл. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в испытании, содержали от 30 мкг до 600 мкг ацетилхолина хлорида (О-ацетил). Помещают 0,3 мл, 0,5 мл и 1,0 мл полученного раствора в двух повторностях в 6 пробирок

(3 реагирующих раствора и 3 корректирующих раствора).

Растворы сравнения. 0,150 г ацетилхолина хлорида *P* растворяют в воде *P* и доводят тем же растворителем до объема 10,0 мл (основной раствор с концентрацией ацетилхолина хлорида 15 г/л). 1,0 мл основного раствора непосредственно перед использованием доводят водой *P* до объема 50,0 мл (рабочее разведение 1 с концентрацией ацетилхолина хлорида 300 мкг/мл). 1,0 мл основного раствора непосредственно перед использованием доводят водой *P* до объема 25,0 мл (рабочее разведение 2 с концентрацией ацетилхолина хлорида 600 мкг/мл). Помещают 0,1 мл и 0,4 мл рабочего разведения 1 в двух повторностях (реагирующий и корректирующий растворы) в 4 пробирки, 0,6 мл и 1,0 мл рабочего разведения 2 в двух повторностях (реагирующий и корректирующий растворы) в другие 4 пробирки.

Компенсационный раствор. Готовят, используя 1,0 мл воды *P*.

Объем раствора в каждой пробирке доводят водой *P* до 1,0 мл. В пробирки с корректирующим раствором и компенсационным раствором прибавляют по 1,0 мл раствора 412 г/л хлороводородной кислоты *P* и далее – по 2,0 мл раствора гидроксилamina щелочного *P*. Выдерживают точно 2 мин для протекания реакции и прибавляют в пробирки с реагирующим раствором по 1,0 мл раствора 412 г/л хлороводородной кислоты *P*. В каждую пробирку прибавляют по 1,0 мл раствора 100 г/л железа (III) хлорида *P* в растворе 10,3 г/л хлороводородной кислоты *P*, закрывают пробирки пробками и энергично встряхивают для удаления пузырьков.

Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) растворов при длине волны 540 нм относительно компенсационного раствора. Из значения оптической плотности каждого реагирующего раствора вычитают значение оптической плотности соответствующего корректирующего раствора.

Строят калибровочную кривую зависимости скорректированных значений оптической плотности четырех растворов сравнения от соответствующего содержания ацетилхолина хлорида и с ее помощью определяют концентрацию ацетилхолина хлорида в испытуемом растворе для каждого исследуемого объема. Рассчитывают среднее по трем значениям концентрации ацетилхолина хлорида.

1 моль ацетилхолина хлорида (181,7 г) соответствует 1 моль О-ацетила (43,05 г).

2.1.11.16. ГЕКСОЗАМИНЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Содержимое упаковки с испытуемым образцом количественно переносят в мерную колбу подходящего объема и доводят водой *P* для получения раствора полисахарида с концентрацией около 5 мг/мл. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в испытании, содержали от 125 мкг до 500 мкг глюкозамина (гексозамина). Помещают 1,0 мл полученного раствора в градуированную пробирку.

Растворы сравнения. 60 мг глюкозамина гидрохлорида *P* растворяют в воде *P* и доводят тем же растворителем до объема 100,0 мл (основной раствор с концентрацией глюкозамина 0,500 г/л). Помещают 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл и 1,0 мл основного раствора в 4 градуированные пробирки.

Компенсационный раствор. Готовят, используя 1,0 мл воды *P*.

Ацетилацетоновый реактив. Готовят непосредственно перед использованием. Смешивают один объем ацетилацетона *P* и 50 объемов раствора 53 г/л натрия карбоната безводного *P*.

Диметиламинобензальдегида раствор. Готовят непосредственно перед использованием. Растворяют 0,8 г диметиламинобензальдегида *P* в 15 мл этанола (96 %) *P* и прибавляют 15 мл хлороводородной кислоты *P*.

Объем раствора в каждой пробирке доводят водой *P* до 1,0 мл. В пробирки прибавляют по 1,0 мл раствора 824 г/л хлороводородной кислоты *P*, закрывают пробками, выдерживают в водяной бане 1 ч и охлаждают до температуры от 15 °С до 25 °С. Далее в пробирки прибавляют по 0,05 мл раствора 5 г/л тимолфталеина *P* в этаноле (96 %) *P*. Добавляют раствор 200 г/л натрия гидроксида *P* до появления голубого окрашивания, а затем раствор 103 г/л хлороводородной кислоты *P* до обесцвечивания раствора. Объем раствора в каждой пробирке доводят водой *P* до 10,0 мл (нейтрализованные гидролизаты).

Во вторую серию градуированных пробирок объемом 10 мл помещают по 1,0 мл каждого нейтрализованного гидролизата. В пробирки

прибавляют по 1,0 мл ацетилацетонового реактива. Пробирки закрывают пробками, выдерживают в водяной бане при температуре 90 °С в течение 45 мин и охлаждают до температуры от 15 °С до 25 °С. В пробирки прибавляют по 2,5 мл *этанол* (96 %) *P* и 1,0 мл раствора диметиламинобензальдегида, доводят объем растворов в пробирках *этанолом* (96 %) *P* до 10,0 мл. Пробирки закрывают, содержимое перемешивают, переворачивая пробирки, и выдерживают в темном месте 90 мин.

Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) растворов при длине волны 530 нм относительно компенсационного раствора.

Строят калибровочную кривую зависимости значений оптической плотности четырех растворов сравнения от соответствующего содержания гексозамина и с ее помощью определяют концентрацию гексозамина в испытуемом растворе.

201110017-2023

2.1.11.17. МЕТИЛПЕНТОЗЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Содержимое упаковки с испытуемым образцом количественно переносят в мерную колбу подходящего объема и доводят *водой P* для получения раствора полисахарида с концентрацией около 5 мг/мл. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в испытании, содержали от 2 мкг до 20 мкг рамнозы (метилпентозы). Помещают 0,25 мл, 0,50 мл и 1,0 мл полученного раствора в 3 пробирки.

Растворы сравнения. 0,100 г *рамнозы P* растворяют в *воде P* и доводят тем же растворителем до объема 100,0 мл (основной раствор с концентрацией метилпентозы 1 г/л). Непосредственно перед использованием 1,0 мл основного раствора доводят *водой P* до объема 50,0 мл (рабочее разведение с концентрацией метилпентозы 20 мг/л). В 5 пробирок помещают 0,10 мл, 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл и 1,0 мл рабочего разведения.

Компенсационный раствор. Готовят, используя 1,0 мл *воды P*.

Объем раствора в каждой пробирке доводят *водой P* до 1,0 мл. Пробирки помещают в ледя-

ную баню, прибавляют по каплям при постоянном помешивании по 4,5 мл охлажденной смеси, состоящей из одного объема *воды P* и 6 объемов *серной кислоты P*. Пробирки нагревают до температуры от 15 °С до 25 °С и далее продолжают нагревание на водяной бане в течение нескольких минут. Охлаждают до температуры от 15 °С до 25 °С. В каждую пробирку прибавляют по 0,10 мл приготовленного непосредственно перед использованием раствора 30 г/л *цистеина гидрохлорида P*. Пробирки встряхивают и выдерживают 2 ч.

Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) растворов при длинах волн 396 нм и 430 нм. Для каждого раствора рассчитывают разницу между значением оптической плотности, измеренным при длине волны 396 нм, и ее значением, измеренным при длине волны 430 нм.

Строят калибровочную кривую зависимости значений оптической плотности пяти растворов сравнения от соответствующего содержания метилпентозы и с ее помощью определяют концентрацию метилпентозы в испытуемом растворе для каждого исследуемого объема. Рассчитывают среднее по трем значениям концентрации метилпентозы.

201110018-2023

2.1.11.18. УРОНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Содержимое упаковки с испытуемым образцом количественно переносят в мерную колбу подходящего объема и доводят *водой P* для получения раствора полисахарида с концентрацией около 5 мг/мл. Разводят раствор так, чтобы объемы, используемые в испытании, содержали от 4 мкг до 40 мкг глюкоуроновой кислоты (уроновых кислот). Помещают 0,25 мл, 0,50 мл и 1,0 мл полученного раствора в 3 пробирки.

Растворы сравнения. 50 мг *натрия глюкоуроната P* растворяют в *воде P* и доводят тем же растворителем до объема 100,0 мл (основной раствор с концентрацией глюкоуроновой кислоты 0,4 г/л). Непосредственно перед использованием 5,0 мл основного раствора разводят *водой P* до объема 50,0 мл (рабочее разведение

с концентрацией глюкуроновой кислоты 40 мг/л). В 5 пробирок помещают 0,10 мл, 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл и 1,0 мл рабочего разведения.

Компенсационный раствор. Готовят, используя 1,0 мл воды *P*.

Объем в каждой пробирке доводят водой *P* до 1,0 мл. Помещают пробирки в ледяную баню и при постоянном перемешивании прибавляют в каждую пробирку по каплям по 5,0 мл *бурь раствора P*. Закрывают пробирки пробками и выдерживают в водяной бане 15 мин. Охлаждают до температуры от 15 °С до 25 °С. В пробирки добавляют по 0,20 мл раствора 1,25 г/л карбазола *P* в этаноле *P*. Закрывают пробирки пробками и выдерживают в водяной бане 15 мин. Охлаждают до температуры от 15 °С до 25 °С. Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) растворов при длине волны 530 нм.

Строят калибровочную кривую зависимости значений оптической плотности пяти растворов сравнения от содержания глюкуроновой кислоты и с ее помощью определяют концентрацию глюкуроновой кислоты в испытуемом растворе для каждого исследуемого объема. Рассчитывают среднее по трем значениям концентрации глюкуроновой кислоты.

201110019-2023

2.1.11.19. СИАЛОВАЯ КИСЛОТА В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемый раствор. Содержимое одной или нескольких упаковок с испытуемым образцом количественно переносят в мерную колбу подходящего объема и доводят водой *P* для получения раствора полисахарида с концентрацией около 250 мкг/мл. Переносят с помощью шприца 4,0 мл полученного раствора в ультрафильтрационную ячейку вместимостью 10 мл, пропускающую молекулы с относительной молекулярной массой менее 50 000. Дважды промывают шприц водой *P*, промывную жидкость переносят в ту же ультрафильтрационную ячейку. Проводят ультрафильтрацию при постоянном перемешивании в присутствии азота *P*

под давлением около 150 кПа. Наполняют ячейку водой *P* каждый раз, когда объем жидкости в ней уменьшается до 1 мл, до тех пор, пока не профильтруется 200 мл, а оставшийся в ячейке объем не будет составлять около 2 мл. Оставшуюся жидкость переносят с помощью шприца в мерную колбу вместимостью 10 мл. Ячейку трижды промывают водой *P* порциями по 2 мл. Промывную жидкость переносят в ту же мерную колбу и доводят водой *P* до объема 10,0 мл (испытуемый раствор). В две пробирки помещают по 2,0 мл испытуемого раствора.

Растворы сравнения. Используют растворы сравнения, указанные в частной фармакопейной статье.

Готовят 2 серии из трех пробирок. В пробирки каждой серии помещают 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл раствора сравнения, соответствующего типу вакцины, предназначенной для испытания, и объем в каждой пробирке доводят водой *P* до 2,0 мл.

Контрольный раствор. Готовят с использованием воды *P* по 2,0 мл в двух пробирках.

В каждую пробирку прибавляют по 5,0 мл резорцина реактива *P*. Пробирки нагревают при температуре 105 °С в течение 15 мин, охлаждают в холодной воде и помещают в ледяную баню. В пробирки прибавляют по 5,0 мл изоамилового спирта *P*, содержимое тщательно перемешивают и выдерживают в ледяной бане 15 мин. Пробирки центрифугируют и держат их в ледяной бане до проведения измерения.

Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) верхнего слоя при 580 нм и 450 нм, используя изоамиловый спирт *P* в качестве компенсационного раствора.

Для каждой длины волны рассчитывают среднее из значений оптической плотности, полученных для двух идентичных растворов. Вычитают среднее значение оптической плотности контрольного раствора из средних значений, полученных для других растворов.

Строят кривую зависимости разницы между значениями оптической плотности при 580 нм и 450 нм растворов сравнения от содержания сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты) и с ее помощью определяют концентрацию сиаловой кислоты в испытуемом растворе.

2.2. РЕАКТИВЫ

2.2.1. РЕАКТИВЫ, СТАНДАРТНЫЕ РАСТВОРЫ, БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

202010001-2023

2.2.1.1. РЕАКТИВЫ

ДОПОЛНЕНИЕ

Натрия карбоната раствор Р2.

Раствор 40 г/л *натрия карбоната безводного*
Р в 0,2 М растворе *натрия гидроксида*.

Папаин. [9001-73-4].

Протеолитический фермент, получаемый из
млечного сока зеленых плодов и листьев *Carica*
papaya L. Активность фермента должна быть
подтверждена.

2.3. ОБЩИЕ ТЕКСТЫ

2.3.1. ОБЩИЕ ТЕКСТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

203010005-2023

2.3.1.5. МЕТОДЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ ПРОДУКТОВ

Стерильность – отсутствие жизнеспособных микроорганизмов, определяемое уровнем обеспечения стерильности с содержанием жизнеспособных микроорганизмов в количестве не более 10^{-6} . Стерильность является критическим показателем качества для широкого спектра лекарственных средств, например:

- лекарственных препаратов, которые должны быть стерильными по причине способа их введения, таких как лекарственные препараты для парентерального и офтальмологического применения, а также некоторые лекарственные препараты для ингаляционного применения, лекарственные препараты для орошения и лекарственные препараты для внутриматочного введения;

- лекарственных препаратов, наносимых на значительно поврежденную кожу (раневую поверхность), таких как лекарственные препараты для наружного применения в виде мягких лекарственных форм;

- субстанции для фармацевтического применения, предназначенные для производства стерильных лекарственных препаратов без последующей стерилизации (в асептических условиях).

Стерильные продукты получают в соответствующих условиях и упаковывают в подходящую упаковку. Рекомендуется, чтобы выбор упаковки позволял применять оптимальный процесс стерилизации продукта. Упаковка и система укупорки должны обеспечивать сохранение стерильности продукта в течение всего срока годности (срока хранения).

Условия процесса стерилизации выбирают таким образом, чтобы достигалась максимальная степень стерильности, совместимая с лекарственным средством, и, если применимо, выбирают процесс, в котором продукт стерилизуется в его конечной упаковке (финишная стерилизация). При использовании полностью валидированного метода финишной стерилизации насыщенным паром, сухим жаром или

ионизирующим излучением, при наличии разрешения уполномоченного органа, может осуществляться выпуск продукции по параметрам (то есть выпуск партии стерильного продукта на основе данных процесса без передачи образца для испытания на стерильность). Если финишная стерилизация невозможна, производство осуществляют в асептических условиях или применяют стерилизующую фильтрацию. Для дополнительной гарантии обеспечения стерильности, если применимо, проводят подходящую дополнительную обработку (например, нагревание) продукта в его конечной упаковке.

Так как достижение стерильности каждой единицы из группы объектов, подвергнутых процессу стерилизации, не может быть ни гарантировано, ни подтверждено, важно изучить влияние выбранной процедуры стерилизации на продукт (включая конечную упаковку), чтобы быть уверенным в эффективности процесса и сохранности продукта, а также валидировать процедуру перед ее применением на практике. Недостаточное соблюдение валидированного процесса приводит к риску получения нестерильного и (или) некачественного продукта.

Общая фармакопейная статья содержит указания по валидации, условиям и контролю процессов стерилизации. Описанные методы применяют главным образом для инактивации или удаления бактерий и грибов (дрожжей и плесневых). Для биологических продуктов животного или человеческого происхождения или в тех случаях, когда такой материал использовался в процессе производства, в ходе валидации необходимо подтвердить, что процесс пригоден для удаления или инактивации любого вирусного заражения. Дополнительные указания приведены в общей фармакопейной статье 2.3.1.3. *Вирусная безопасность*.

Эффективность процесса стерилизации зависит от используемого метода, условий обработки (например, времени, температуры, влажности), уровня и типа контаминации микроорганизмами до стерилизации и состава продукта. Инактивация микроорганизмов физическими или химическими средствами происходит согласно экспоненциальному закону, поэтому всегда существует ненулевая вероятность того, что микроорганизм может выдержать процесс стерилизации.

Уровень обеспечения стерильности

Для методов, описанных ниже, при необходимости, указывают уровень обеспечения стерильности, выражающий для конкретного процесса стерилизации вероятность выживания микроорганизмов в продукте после воздействия процесса. Например, уровень обеспечения стерильности 10^{-6} означает вероятность наличия не более одной единицы нестерильного продукта из $1 \cdot 10^6$ простерилизованных единиц продукта. Уровень обеспечения стерильности для конкретного продукта устанавливают с помощью соответствующей валидации процесса стерилизации. Контаминация микроорганизмами характеризуется количеством, типом и устойчивостью любых присутствующих микроорганизмов, поэтому микробиологический мониторинг и установление соответствующих пределов необходимы для всех компонентов, входящих в состав стерильного лекарственного препарата. Меры, предназначенные для уменьшения контаминации микроорганизмами, такие как фильтрация перед стерилизацией, будут в значительной степени способствовать обеспечению стерильности. Компоненты в составе продукта могут влиять на поведение микроорганизмов, присутствующих в продукте, что в свою очередь может влиять на эффективность процесса стерилизации. Например, активность воды (A_w), pH и присутствие веществ с антимикробной активностью могут повлиять на устойчивость любых присутствующих микроорганизмов. Активность воды или компоненты, входящие в состав продукта (включая присутствие отдельных компонентов питательных сред), могут оказать влияние на количество микроорганизмов и, таким образом, на эффективность процесса мембранной фильтрации.

МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация может осуществляться одним из методов, описанных ниже. Модификации или комбинации этих методов могут быть использованы при условии, что выбранный процесс стерилизации валидирован и обеспечивает как ее эффективность, так и сохранность продукта, включая целостность упаковки. Мониторинг критических параметров процесса проводят для всех методов стерилизации для подтверждения, что любые ранее установленные требования

или условия соблюдаются на протяжении всего процесса стерилизации всей серии (партии) продукта. Это применимо во всех случаях, включая стандартные условия стерилизации. Руководство по валидации процесса стерилизации паром с использованием F_0 концепции описано в общей фармакопейной статье 2.3.1.6. *Применение F-концепций при термической стерилизации*. Для разработки и валидации процессов стерилизации, а также для мониторинга процессов газовой стерилизации используют биологические индикаторы стерилизации. Указания по использованию биологических индикаторов приведены в общей фармакопейной статье 2.3.1.7. *Биологические индикаторы стерилизации*.

После окончания цикла стерилизации должны быть приняты меры, предотвращающие контаминацию микроорганизмами простерилизованных продуктов.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ НАСЫЩЕННЫМ ПАРОМ (АВТОКЛАВИРОВАНИЕ)

Принцип

Стерилизация насыщенным водяным паром достигается путем теплообмена при конденсации воды из фазы насыщенного пара на поверхности стерилизуемых объектов. Если объекты (открытые или завернутые в материал, пропускающий воздух и пар) стерилизуются в прямом контакте с паром, увлажняющий эффект конденсата усиливает стерилизующий эффект. Для прямого воздействия пара важно, чтобы объекты были полностью пропитаны насыщенным паром, то есть не содержащим воздух и другие неконденсирующиеся газы. В случае стерилизации в закрытой упаковке камера стерилизатора служит в качестве паровой рубашки. Конденсация на поверхности упаковки служит высокоэффективным механизмом для передачи энергии, но не оказывает дополнительного стерилизующего воздействия. При стерилизации в закрытой упаковке стерилизующий эффект определяется условиями, достигнутыми в закрытой упаковке, где стерильными должны быть как продукт, так и свободное пространство в упаковке.

Оборудование

Стерилизация паром выполняется в автоклавах, то есть в сосудах под давлением, предназначенных для непрерывной подачи или генерирования пара и удаления конденсата из камеры для поддержания давления и температуры в пределах контролируемых уровней.

Для оборудования, используемого в циклах стерилизации с прямым воздействием пара, должна быть обеспечена подача насыщенного пара, свободного от неконденсируемых газов. В автоклавах, предназначенных для стерилизации объектов в закрытых емкостях, для достижения теплопередачи могут использоваться паровоздушные смеси или распыление перегретой воды. Для достижения однородных условий внутри камеры и загрузки применяют подходящие, прошедшие квалификацию автоклавы. Принципы работы должны соответствовать объектам, подлежащим стерилизации и конфигурации загрузки. Пригодность оборудования для стерилизуемых объектов его производительность в выбранном цикле должны быть подтверждены при проведении квалификации эксплуатации автоклава. Регистрируют температурные профили в наиболее медленно нагреваемых точках.

Для обеспечения эффективного управления процессом стерилизации автоклавы должны быть оснащены датчиками температуры и давления надлежащей чувствительности, расположенными в соответствующих положениях. Для подтверждения соблюдения условий стерилизации профили температуры и давления в камере записывают для каждого цикла, при этом должен быть по крайней мере один независимый температурный датчик, контролирующей температуру загрузки в наиболее медленно нагреваемой точке или в закрытой упаковке, находящейся в наиболее медленно нагреваемой точке.

Охлаждающая вода, подаваемая в камеру в конце процесса стерилизации закрытых емкостей, должна быть надлежащего качества во избежание отрицательного влияния на стерильность объектов стерилизации.

Цикл стерилизации

Циклы стерилизации выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с стерилизуемыми объектами и конфигурацией загрузки. В тех случаях, когда воздух вытесняется из камеры под действием силы тяжести, объекты, подлежащие автоклавированию, не должны препятствовать удалению воздуха и должны размещаться внутри автоклава таким образом, чтобы предотвратить образование недоступных воздушных карманов. В случае удаления воздуха с помощью циклов вакуумирования, сопровождаемых импульсами пара, необходимо убедиться в том, что данный процесс не воздействует на стерилизуемые объекты. Стерилизация насыщенным паром может быть не приемлема

для чувствительных к давлению продуктов в закрытых упаковках. Чтобы сбалансировать давление внутри камеры и в закрытой упаковке, в камеру могут подаваться паровоздушные смеси. Проникновение пара обеспечивается путем выбора подходящих циклов для удаления воздуха из пористых или полых тел. При разработке цикла стерилизации проникновение пара верифицируют, например, с использованием физических или химических показателей, а биологическую эффективность цикла – с использованием биологических индикаторов (2.3.1.7). Должны быть определены соответствующие схемы загрузки.

Эффективность цикла

Стандартными условиями для данного метода стерилизации являются продолжительность 15 мин, температура насыщенного пара (120 – 122) °С, определенная в самом холодном месте камеры, и давление 120 кПа. В зависимости от продукта или объема загрузки на основании разработки и валидации могут применяться иные комбинации времени и температуры. Минимальная температура, приемлемая для паровой стерилизации, составляет 110 °С. Минимальное значение F_0 , рассчитанное в наиболее медленно нагреваемой точке загрузки, составляет не менее 8 мин. Расчет эффективности стерилизации согласно F_0 -концепции проводят в соответствии с общей фармакопейной статьей 2.3.1.6. *Применение F-концепций при термической стерилизации*. Расчет эффективности для физического параметра (F_{phys}) коррелирует с биологической эффективностью (F_{bio}). Величина F_{bio} выражает летальность микроорганизмов в минутах при условии использования процесса с разрушением биологического индикатора. Значение F_{bio} рассчитывают по формуле:

$$F_{bio} = D_{121} \cdot (\lg N_0 - \lg N)$$

где: D_{121} — значение величины D для биологического индикатора при температуре 121 °С, обеспечивающая снижение числа жизнеспособных микроорганизмов до 10 % от их исходного числа (до экспозиции), в минутах;

N_0 — количество живых микроорганизмов в биологическом индикаторе до экспозиции;

N — количество живых микроорганизмов в биологическом индикаторе после экспозиции.

При валидации цикла стерилизации определяют позиции загрузки, наиболее трудные для стерилизации, и проверяют биологическую эффективность путем размещения биологических индикаторов в этих позициях. Оценивают защищенность спор от стерилизующего эффекта и принимают соответствующие меры. Значение F_{bio} , определенное для наиболее трудной для стерилизации позиции, используют при определении параметров выбранного цикла, необходимых для надежного достижения уровня обеспечения стерильности с содержанием жизнеспособных микроорганизмов в количестве не более 10^{-6} .

Рутинный контроль

Цикл автоклавирования контролируют физическим определением профилей давления в камере и температуры по крайней мере в самом холодном месте камеры. Для каждого цикла стерилизации регистрируют давление, время и температуру и по возможности рассчитывают значение F_0 .

СУХОЖАРОВАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Принцип

Стерилизация сухим жаром – метод термической стерилизации, основанный на передаче тепла стерилизуемым объектам. Тепло может передаваться посредством конвекции, излучения или прямой передачи.

Оборудование

Сухожаровую стерилизацию проводят в шкафу с принудительной циркуляцией воздуха или с использованием другого оборудования, предназначенного для данной цели, например, туннеля.

Цикл стерилизации

Стерилизатор загружают таким образом, чтобы заданная или требуемая температура достигалась для всей загрузки. Информацию о температуре внутри стерилизатора во время цикла стерилизации получают с помощью чувствительных к температуре элементов, которые подходящим образом размещены внутри или на соответствующих объектах, расположенных в предварительно определенной самой холодной части загруженного стерилизатора. На протяжении каждого цикла подходящим образом регистрируют время и температуру.

Эффективность цикла

Стандартными условиями для данного метода стерилизации являются продолжительность 2 ч, минимальная температура 160 °С. Другие комбинации времени и температуры могут использоваться, если подтверждено, что выбранный процесс обеспечивает адекватный и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов при работе с установленными допусками. Используемые процедуры и условия производства должны быть такими, чтобы уровень обеспечения стерильности был не более 10^{-6} содержания жизнеспособных микроорганизмов. Процессы сухожаровой стерилизации валидируют с использованием комбинаций температурного картирования и испытаний с биологическими индикаторами (2.3.1.7).

Сухой жар при температуре выше 220 °С в течение валидированного времени часто используют для депирогенизации стеклянной посуды. В этом случае при валидации в качестве критерия оценки эффективности может быть использован показатель снижения термостойкого эндотоксина на 3 единицы по шкале десятичного логарифма, а биологические индикаторы не требуются.

Рутинный контроль

Циклы стерилизации сухим жаром контролируют путем определения температурных профилей по крайней мере в самом холодном месте камеры. Для каждого цикла регистрируют время и температуру.

РАДИАЦИОННАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Принцип

Радиационный метод стерилизации осуществляют путем воздействия на объект ионизирующего излучения в виде гамма-излучения от подходящего изотопного источника (например, кобальта-60), пучка электронов, генерируемого подходящим ускорителем электронов, или рентгеновских лучей, возникающих в результате бомбардировки подходящих целей генерируемыми электронами. Ионизирующее излучение может быть использовано для финишной стерилизации лекарственных препаратов, микробиологической инактивации тканей и клеток или стерилизации материалов или упаковки, используемых в асептических процессах. Низкоэнергетические электроны могут использоваться для поверхностной стерилизации материалов при входе в изоляторы, используемые при производстве стерильных продуктов.

Эффективность цикла

Стандартная поглощенная доза для данного метода стерилизации составляет от 10 кГр до 50 кГр. Другие дозы могут быть использованы, если во время валидации стерилизующей дозы подтверждено, что выбранная доза обеспечивает адекватный и воспроизводимый уровень летальности при рутинном процессе в установленных допустимых пределах. Используемые процедуры и условия производства должны быть такими, чтобы уровень обеспечения стерильности был не более 10^{-6} содержания жизнеспособных микроорганизмов. Для разработки и валидации процесса стерилизации тканевых и клеточных продуктов могут быть применены биологические индикаторы. Они также могут потребоваться для продуктов, потенциально предотвращающих инактивацию спор микроорганизмов.

Рутинный контроль

Во время процесса стерилизации доставленную стерилизующую дозу контролируют с помощью дозиметрической системы, прослеживаемой до национального эталона.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ГАЗОМ (ПАРОФАЗНАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ)

Принцип

Стерилизация газом может использоваться для стерилизации первичных упаковочных материалов, оборудования и некоторых лекарственных препаратов.

Важно обеспечить проникновение газа и влаги в стерилизуемый материал и в последующем процессе удаления газа – снижение содержания любых остатков газа или побочных продуктов реакции взаимодействия с газом до уровня, не вызывающего токсического эффекта при применении лекарственного препарата.

Стерилизующие агенты

Существуют основные категории газообразных стерилизующих агентов, отличающихся своим антимикробным действием – алкилирующие агенты и окислители.

Алкилирующие агенты – высокореактивные соединения, взаимодействующие со многими функциональными группами и компонентами, такими как аминные, сульфгидрильные и гидроксильные группы в белках и пуриновые основания в нуклеиновых кислотах. К ним относится оксид этилена, ока-

зывающий цитотоксическое, канцерогенное и мутагенное действие.

Окислители – высокореактивные токсичные соединения. К ним относятся водорода пероксид и надуксусная кислота.

Разработка и валидация процессов стерилизации

Стерилизация газом выполняется путем воздействия на продукт стерилизующего агента в герметичной камере при определенных условиях.

Типичный процесс газовой стерилизации состоит из трех фаз: (предварительное) кондиционирование, стерилизация и аэрация. Параметры, необходимые для этих фаз с целью достижения требуемого уровня обеспечения стерильности, устанавливаются в процессе разработки. Для определения оптимальных условий стерилизации используют комбинацию физических и биологических методов. Метод стерилизации не должен нарушать функциональность продукта и (или) упаковки.

Цикл стерилизации

Для контроля температуры, влажности и концентрации газа может потребоваться специальное оборудование как в процессе валидации, так и в процессе рутинной работы.

Эффективность цикла

Валидация должна подтвердить эффективность определенного процесса относительно инактивации микроорганизмов для комбинации продукта и загрузки в стерилизаторе. Летальность микроорганизмов при стерилизации газом может быть определена с использованием соответствующего подхода: после градуированных по времени экспозиций скорость инактивации тест-микроорганизмов (значение величины D) может быть установлена путем построения кривой выживаемости или с использованием метода фракционно-негативного анализа.

Биологические индикаторы должны обладать как минимум такой же устойчивостью к стерилизующему агенту, как и микробиологические контаминанты стерилизуемого продукта. Они должны быть размещены внутри продукта в местах, где условия стерилизации наиболее труднодостижимы.

Эффективность процесса зависит от ряда параметров, включая концентрацию газа, температуру, влажность, время экспозиции, конфигурацию загрузки и характеристики продукта и его

упаковочных материалов. Влияние на эффективность процесса любого изменения одного или нескольких из данных параметров должно быть исследовано.

Рутинный контроль

Регистрируют соответствующие параметры процесса, включая результаты испытания с использованием биологического индикатора.

ХИМИЧЕСКАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ РАСТВОРАМИ

Принцип

Химическая стерилизация растворами применяется для стерилизации изделий, в конструкции которых использованы термолабильные материалы (например, полимерные или коррозионно-стойкие материалы) и для которых в связи с их особенностями невозможно использовать другие способы стерилизации. Предметы, подлежащие стерилизации, погружаются в раствор стерилизующего агента (химического вещества), после чего он должен быть удален способом, предохраняющим стерилизуемый предмет от повторной контаминации микроорганизмами. Повторная контаминация выходит за рамки обычного рассмотрения процесса стерилизации, но при химической стерилизации растворами принято включать этап удаления стерилизующего агента (независимо от того, достигается ли это физическими или химическими средствами) в общий процесс стерилизации вместе с любыми необходимыми дополнительными этапами для предотвращения повторной контаминации микроорганизмами. Конструкция изделия должна обеспечивать достаточный доступ стерилизующего раствора и промывной жидкости ко всем стерилизуемым поверхностям изделия.

Стерилизующие агенты

Химическую стерилизацию проводят с использованием растворов кислот, оснований, альдегидов и сильных окислителей, которые при соответствующих условиях способны уничтожать бактерии и грибы, включая как вегетативные клетки, так и споры (например, растворы водорода пероксида и надкислоты). Эффективность стерилизации изделий зависит от концентрации стерилизующего агента, времени стерилизации и температуры стерилизующего раствора.

Поскольку общепризнанных биологических индикаторов для химической стерилизации растворами не существует, использование обычных

мезофильных спорообразующих микроорганизмов, таких как *Bacillus atrophaeus* или *Bacillus subtilis*, является обычной практикой, так как они, вероятно, представляют собой изоляты бионагрузки для наихудшего случая. Используемые растворы различаются по стабильности в процессе стерилизации, эффективному диапазону pH, концентрации, температуре, требуемому времени контакта и возможному взаимодействию с материалами. При выборе наиболее подходящего стерилизующего агента производители должны учитывать его влияние на материалы, компоненты упаковки, оборудование, как и во всех других процессах стерилизации. Производителям следует учитывать, что данные агенты являются высокотоксичными, и соответствующие меры безопасности должны соблюдаться на всех этапах разработки цикла стерилизации, валидации и рутинного использования.

Цикл стерилизации

Процесс стерилизации проводят в закрытых емкостях из стекла, полимерного материала или емкостях, покрытых неповрежденной эмалью, при полном погружении изделия в раствор на время стерилизации. После этого изделие промывают стерильной водой в асептических условиях.

СТЕРИЛИЗУЮЩАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

Принцип

Стерилизующая фильтрация используется для уменьшения содержания жизнеспособных и нежизнеспособных микроорганизмов и других частиц в газах и жидких продуктах, которые не могут быть подвергнуты стерилизации нагреванием или облучением. Как правило, такие продукты содержат субстанции для фармацевтического применения, которые не могут быть подвержены термической стерилизации в виду особенностей их строения и физико-химических свойств.

В отличие от других методов стерилизации принцип стерилизующей фильтрации заключается не в инактивации, а удержании микроорганизмов фильтрами.

Оборудование

Стерилизующую фильтрацию осуществляют, используя мембранные фильтры в виде плоского фильтрующего материала (дисков) в соответствующих держателях или в виде картриджей. Оценка размера пор основана на корреляции между удерживающей способностью фильтра и результатами проверки целостности

фильтра. Эффективность процесса фильтрации зависит от многих факторов, например, формы, размера пор, структуры, свойств поверхности, структуры и расположения фильтрующего элемента, взаимодействия матрицы фильтра с продуктом, приложенного давления, потока и продолжительности процесса. Характеристики фильтра должны быть определены при валидации для каждого конкретного продукта. Подходящие процедуры проверки целостности фильтра (например, измерение диффузионного потока, определение «точки пузырька» или испытание на проникновение воды под давлением) используются в соответствии с рекомендациями производителей фильтров. В испытаниях при разработке должны быть подтверждены химическая и физическая совместимость мембран с продуктом, подлежащим фильтрованию, и условия процесса фильтрации. Размер фильтра должен соответствовать объему фильтруемого продукта и биологической нагрузке.

Для стерилизации технологических газов устанавливают подходящую частоту проверок физической целостности фильтра.

Эффективность фильтрации

При валидации процесса стерилизации необходимо подтвердить, что процесс фильтрации (обычно в уменьшенной модели) способен полностью удерживать микробную нагрузку подходящего тест-микроорганизма, составляющую как минимум $1 \cdot 10^7$ КОЕ/см² эффективной поверхности фильтра. Данное испытание должно максимально точно имитировать реальный процесс фильтрации. По возможности испытание проводят, используя продукт и указанные условия фильтрации. Если это невозможно, например, вследствие антимикробных свойств продукта, в испытании должна использоваться среда, максимально имитирующая продукт. Уровень фильтрации определяют как величину логарифма снижения контаминации микроорганизмами.

Для процессов, использующих систему фильтрации с номинальным размером пор не более 0,22 мкм, рекомендуется суспензия *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146, NCIMB 11091 или CIP 103020). Суспензия *Brevundimonas diminuta* должна быть приготовлена так, чтобы содержать преимущественно одиночные клетки наименее возможного размера. Другие микроорганизмы, например изоляты из бионагрузки, выделенные из рассматриваемого продукта или процесса, могут использоваться, если они пред-

ставляют более серьезную угрозу для системы стерилизующей фильтрации, чем *Brevundimonas diminuta*. Для систем фильтрации с номинальным размером пор 0,1 мкм или менее можно использовать суспензию *Acholeplasma laylawii* (ATCC 23206).

Рекомендуется, чтобы процесс фильтрации проводился по возможности ближе к точке наполнения (месту фасовки).

Стерилизация мембранных фильтров

Мембранные фильтры могут стерилизоваться в автономном режиме или в составе линии.

При стерилизации в автономном режиме проверяют проникновение пара и надлежащую защиту фильтра от контаминации. Фильтр после стерилизации устанавливают в асептических условиях на производственную линию согласно валидированной процедуре.

При стерилизации фильтров в составе производственной линии обеспечивают проникновение пара через фильтрующее оборудование и для предотвращения повреждения мембраны контролируют перепад давления на фильтре.

Процесс фильтрации

Стерилизация мембранной фильтрацией осуществляется путем пропускания продукта через микропористую мембрану с номинальным размером пор не более 0,22 мкм.

Для каждой серии (партии) продукта перед стерилизацией определяется уровень контаминации микроорганизмами и применяются параметры процесса, установленные и утвержденные при разработке и валидации процесса фильтрации.

Если с целью повышения эффективности процесса фильтрации используют несколько фильтров для уменьшения бионагрузки, фильтр, ближайший к точке наполнения в первичную упаковку, характеризуется как стерилизующий фильтр.

Для предотвращения повторной контаминации продукта должны обеспечиваться стерильность и целостность оборудования после точки фильтрации, соблюдаться квалифицированные условия окружающей среды и валидированные процедуры асептического производства.

Рутинный контроль

Процессы фильтрации контролируют согласно определенным физическим и микробиологическим параметрам, установленным в ходе процесса валидации: контаминация микроорганизмами до стерилизации, результаты испытания на целостность фильтра перед фильтра-

цией, продолжительность фильтрации, объем фильтруемой жидкости, результаты испытания на дифференциальное давление и целостность фильтра после фильтрации.

ПРОИЗВОДСТВО В АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Принцип

Целью асептического производства является поддержание стерильности продукта, состоящего из компонентов, каждый из которых был подвергнут стерилизации одним из вышеуказанных методов. Это достигается с помощью условий и процедур, предотвращающих контаминацию микроорганизмами.

Асептическое производство может включать стадии асептического наполнения (асептического розлива), лиофилизации в асептических условиях, асептического смешивания ингредиентов с последующим асептическим наполнением и укупоркой.

Разработка и валидация асептического производства

Для сохранения стерильности компонентов и продукта необходимо уделять особое внимание:

- состоянию производственной среды;
- персоналу;
- критическим поверхностям;
- процедурам стерилизации упаковки и средств укупорки и передаточным процедурам;
- максимальному сроку хранения продукта до наполнения в первичную упаковку.

При валидации процесса осуществляют надлежащие проверки всех процедур, указанных выше, а также периодическое моделирование процесса производства в асептических условиях с использованием питательной среды, которую затем инкубируют и проверяют на контаминацию микроорганизмами. Кроме того, подходящий образец каждой серии (партии) любого продукта, полученного в результате асептического процесса, проверяют на стерильность (2.1.6.1).

2.3.1.6. ПРИМЕНЕНИЕ F-КОНЦЕПЦИЙ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Общая фармакопейная статья приводится для информации.

Термическая стерилизация может быть проведена двумя методами:

- стерилизация насыщенным паром (влажная термическая стерилизация с использованием насыщенного пара или воды, нагретых до температуры стерилизации);
- сухожаровая стерилизация с использованием горячего воздуха с низким содержанием влаги.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Величина D (или величина десятичного уменьшения) – время в минутах, необходимое для обеспечения снижения численности жизнеспособных тест-микроорганизмов при заданной температуре до 10 % от исходной численности тест-микроорганизмов. Данная величина значима только для точно установленных экспериментальных условий.

Величина z – изменение температуры в градусах Цельсия, приводящее к изменению значения величины D в 10 раз (величина z обозначает термоустойчивость микроорганизмов к изменениям температуры).

Значение величины z рассчитывают по формуле:

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\lg D_1 - \lg D_2}$$

- где: D_1 — значение величины D при температуре T_1 в минутах;
 D_2 — значение величины D при температуре T_2 в минутах;
 T — температура в градусах Цельсия.

Величина F процесса термической стерилизации (F_0 для стерилизации насыщенным паром или F_H для сухожаровой стерилизации) – характеризует летальность микроорганизмов с теоретическим значением величины z , приведенным в таблице 2.3.1.6.-1, и выражается в цифровых

величинах, эквивалентных времени в минутах, при стандартной температуре, достигнутой в стерилизационной загрузке.

Общее значение величины F процесса, включающего стадию нагревания и охлаждения, можно рассчитать путем интегрирования (объединения) установленных норм летальности тест-микроорганизмов относительно времени в дискретных температурных интервалах выше минимальной температуры, приведенной в таблице 2.3.1.6.-1.

Значение величины F процесса рассчитывают по формуле:

$$F_0 = D_{121} \cdot (\lg N_0 - \lg N)$$

$$F_H = D_{160} \cdot (\lg N_0 - \lg N)$$

где: D_{121} — значение величины D контрольных спор тест-микроорганизмов (2.3.1.7) при температуре 121 °С;

D_{160} — значение величины D контрольных спор тест-микроорганизмов (2.3.1.7) при температуре 160 °С;

N_0 — исходное число жизнеспособных микроорганизмов;

N — конечное число жизнеспособных микроорганизмов.

Для циклов стерилизации насыщенным паром и сухожаровой стерилизации, соответствующее значение величины F используют для подтверждения того, что стабильно достигается требуемый уровень обеспечения стерильности не более 10^{-6} содержания жизнеспособных микроорганизмов.

2.3.1.7. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

1. ВВЕДЕНИЕ

В общей фармакопейной статье приведены подходы к использованию биологических индикаторов, предназначенных для оценки эффективности процесса финишной стерилизации и процессов стерилизации упаковки и предметов, вступающих в непосредственный контакт со стерильной промежуточной продукцией, активной фармацевтической субстанцией, нерасфасованной продукцией (далее – продуктом).

Общая фармакопейная статья не распространяется на использование биологических индикаторов для валидации процесса стерилизации иных объектов, не вступающих в непосредственный контакт со стерильным продуктом.

Биологические индикаторы – системы, содержащие жизнеспособные тест-микроорганизмы (обычно споры бактерий) и предназначенные для проверки требуемой эффективности процесса стерилизации.

Биологические индикаторы применяют для разработки и валидации процессов стерилизации. Данные индикаторы не предназначены для рутинного мониторинга, если иное не указано в данной общей фармакопейной статье.

Биологические индикаторы промышленного производства обычно содержат стандартизованную стабильную популяцию спор

Таблица 2.3.1.6.-1. – *Параметры для стерилизации насыщенным паром и сухожаровой стерилизации*

Стерилизация	F	Параметры стерилизации		
		теоретическое значение величины z (°С)	стандартная температура (°С)	минимальная температура (°С)
стерилизация насыщенным паром	F_0	10	121	110
сухожаровая стерилизация	F_H	20	160	140

подходящих бактерий, полученных из четко охарактеризованного и надлежащим образом поддерживаемого штамма спорообразующих бактерий. Бактериальные споры являются устойчивыми формами жизнеспособных микроорганизмов, которые можно производить и стандартизировать, а также хранить длительный период времени при соблюдении соответствующих условий.

Эффективность стерилизации и пригодность биологических индикаторов можно подтвердить с помощью сокращенного цикла стерилизации, при проведении которого небольшая часть тест-микроорганизмов в биологическом индикаторе способна выжить. При этом использование полного валидированного цикла стерилизации будет приводить к гибели жизнеспособных микроорганизмов (см. раздел 4.1.2 данной общей фармакопейной статьи).

2. ТИПЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ ПРОЦЕССОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ

В зависимости от характера процесса стерилизации могут использоваться разные типы биологических индикаторов:

- носители, инокулированные тест-микроорганизмами;
- автономные биологические индикаторы;
- предметы или продукты, инокулированные тест-микроорганизмами.

Перед использованием биологического индикатора пользователь должен удостовериться, что характеристики биологического индикатора отвечают установленным требованиям. С этой целью пользователь должен убедиться, что производство биологического индикатора осуществляется в рамках соответствующей системы качества (например, посредством аудита), или проверить характеристики биологического индикатора самостоятельно или в независимой контрактной лаборатории (см. *Предметы или продукты, инокулированные тест-микроорганизмами*).

Носитель, инокулированный тест-микроорганизмами, представляет собой носитель (удерживающий материал, например, полоска фильтровальной бумаги, стеклянная пластинка, полимерная пробирка), инокулированный определенной популяцией бактериальных спор. Данный вид биологического индикатора в боль-

шинстве случаев находится в защитной оболочке. После стерилизации носитель асептически переносят в подходящую питательную среду и инкубируют в течение достаточного периода времени при соответствующей температуре.

Тип носителя (оболочка, если используется) может влиять на устойчивость бактериальных спор и должен быть совместим с выбранным процессом стерилизации (например, полоски фильтровальной бумаги в оболочке из подходящей бумаги часто используют для стерилизации паром и этиленоксидом, в то время как металлические диски, упакованные в нетканый материал, – для стерилизации парами водорода пероксида).

Автономные биологические индикаторы представляют собой, например:

- систему, состоящую из инокулированного тест-микроорганизмом носителя и контейнера (например, ампулы) с питательной средой, подходящей для используемого тест-микроорганизма. Система спроектирована таким образом, что стерилизующий агент вступает в контакт с носителем, содержащим инокулированные тест-микроорганизмы (например, через фильтр), а процесс стерилизации не оказывает неблагоприятного воздействия на ростовые свойства питательной среды. После стерилизации носитель приводят в контакт с питательной средой простыми манипуляциями. Данный тип биологических индикаторов может использоваться для оценки процессов стерилизации влажным паром, включая подтверждение проникновения пара в систему;

- контейнер (например, ампулу), содержащую популяцию тест-микроорганизма в подходящей питательной среде. После стерилизации контейнер инкубируют без дальнейших манипуляций. Данный тип биологического индикатора чувствителен только ко времени воздействия и температуре и может использоваться главным образом для контроля стерилизации водных жидкостей. Для удобства и упрощения обнаружения роста тест-микроорганизмов среда может содержать индикатор (например, pH-индикатор).

Автономные биологические индикаторы могут не подходить для валидации определенных процессов стерилизации.

Предметы или продукты, инокулированные тест-микроорганизмами представляют собой предметы (например, резиновые пробки) или продукты, на или в которые инокулированы подходящие тест-микроорганизмы (например,

родов *Bacillus* или *Clostridium*) в тех случаях, когда для оценки эффективности стерилизации отсутствуют биологические индикаторы промышленного производства. В этом случае пользователь может приготовить биологический индикатор, который представляет собой охарактеризованную надлежащим образом суспензию спор, инокулированную на предмет или в продукт, подлежащие стерилизации.

Как правило, тест-микробы инокулируют на или в предмет (продукт) в виде стандартизированной суспензии спор промышленного производства или в виде охарактеризованной суспензии спор, приготовленной из изолятов, полученных в процессе мониторинга окружающей среды или других микробиологических испытаний с четко определенной процедурой, обеспечивающей удовлетворительное спорообразование.

Для суспензий спор должны быть определены значение величины D (время для уменьшения количества тест-микробов в 10 раз (на 90 %) в указанных условиях) и при необходимости – значение величины z . Также значения величин D и z (если необходимо) спор должны определяться для тест-предметов или продуктов, инокулированных тест-микробами, поскольку они могут отличаться от значений для спор в суспензии (см. раздел 4.1 данной общей фармакопейной статьи).

По окончании цикла стерилизации биологический индикатор проверяют на наличие или отсутствие живых тест-микробов или проводят подсчет живых тест-микробов с использованием подходящего валидированного микробиологического метода.

3. ТРЕБОВАНИЯ К КАЧЕСТВУ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ

При поставке каждой серии биологического индикатора пользователю должна быть представлена следующая информация:

- род и виды тест-микробов (включая номер коллекции типовых культур, если применимо);
- уникальный номер, по которому может быть восстановлена история изготовления (например, номер серии);
- количество жизнеспособных спор, выраженное с точностью до одного десятичного знака десятичного логарифма;

- используемый метод восстановления;
- тип носителя;
- тип первичной упаковки (например, оболочка);
- состав среды для восстановления, при необходимости (например, в случае автономных биологических индикаторов);
- тип индикатора роста (например, индикатор pH), при необходимости;
- тип процесса стерилизации и условия, для которых был охарактеризован биологический индикатор;
- устойчивость (величина D) для серии готового биологического индикатора к указанным процессам стерилизации в течение всего отмеченного срока годности; значение величины D должно быть указано в применимых единицах (например, время или доза) и выражаться с точностью до одного десятичного знака и 95 % доверительным интервалом, по возможности;
- метод (метод кинетики летальности или метод фракционного негативного анализа), используемый для определения устойчивости (значения величины D);
- параметры для проверки, например, условия воздействия, количество повторных испытаний, среда и условия инкубации, используемые для восстановления после воздействия и др.;
- значение величины z (если применимо) для биологического индикатора, выраженное в единицах температуры с точностью до одного десятичного знака, включая диапазон температур, используемый для определения величины z ;
- условия хранения и дата истечения срока годности.

3.1. СПЕЦИФИКАЦИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

Выбор биологического индикатора зависит от особенностей процесса стерилизации (влажный пар, сухой жар, газ или ионизирующее излучение). Выбор заключается в подборе штамма тест-микробов, типа биологического индикатора, значения величины D и начального количества спор. Кроме того, испытываемый штамм должен быть более устойчив к конкретному методу стерилизации, чем микробы, потенциально контаминирующие продукт.

3.2. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества биологических индикаторов заключается в проверке на чистоту и подлинность и оценке количества жизне-

способных клеток. Биологический индикатор должен соответствовать спецификациям пользователя. Пользователи, применяющие биологические индикаторы вне рекомендаций производителя, должны тщательно подбирать их по параметрам для конкретного процесса стерилизации.

Чистота

Исследование тест-микроорганизмов на подходящей питательной среде, инкубированной в соответствующих условиях, не должно выявлять никаких признаков контаминации посторонними микроорганизмами.

Идентификация

При необходимости проверяют морфологию колоний и однородность популяции.

Количество жизнеспособных микроорганизмов

Подсчет жизнеспособных микроорганизмов производят в соответствии с инструкциями производителя или любым другим валидированным методом.

3.3. ПРИГОДНОСТЬ

Пользователь должен убедиться, что биологический индикатор инактивирован до ожидаемой степени выживаемости микроорганизмов в конкретном диапазоне условий стерилизации.

4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССОВ ТЕРМИЧЕСКОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

4.1. ПАРАМЕТРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ ТЕРМИЧЕСКОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

4.1.1. Величина z

Процессы стерилизации можно проводить при температурах ниже стандартной 121 °С (при более длительном времени воздействия) или более высоких температурах (при более коротком времени воздействия). Величина z (разность температур, которая приводит к 10-кратному изменению значения величины D биологического индикатора) используется при сравнении эффективности двух циклов, работающих при разных температурах. Для определения величины z значение величины D должно быть определено при трех или более значениях температуры. Предполагаемая температура процесса должна быть в пределах диапазона трех значений температур. Строят

кривую зависимости десятичного логарифма значения величины D от температуры, выраженной в градусах Цельсия. Величина z равна отрицательной обратной величине наклона кривой, построенной с помощью регрессионного анализа.

4.1.2. Установление параметров цикла стерилизации при валидации

Характеристики процесса стерилизации (например, комбинация времени и температуры, требуемый уровень обеспечения стерильности или требуемая величина F_0) являются основой для выбора биологического индикатора (тип биологического индикатора, тест-микроорганизм и начальное количество жизнеспособных тест-микроорганизмов).

Инактивация тест-микроорганизмов в условиях стерилизации может быть описана кинетикой летальности с учетом статистических вероятностей. Для ряда единиц биологических индикаторов с исходной популяцией тест-микроорганизмов на единицу N_0 и заданным значением величины D рассчитывают время выживания и время гибели. Время выживания (t_s) – время воздействия в минутах, по истечении которого во всех единицах биологического индикатора ожидается присутствие выживших тест-микроорганизмов (в среднем 100 выживших спор на единицу биологического индикатора), которое рассчитывают по формуле (1):

$$t_s = D \cdot (\lg N_0 - 2) \quad (1)$$

Время гибели (t_k) – время воздействия в минутах, в течение которого все единицы биологического индикатора ожидается должны быть инактивированы (в среднем 10^{-4} выживших спор на единицу биологического индикатора), которое рассчитывают по формуле (2):

$$t_k = D \cdot (\lg N_0 + 4) \quad (2)$$

Целью валидации является подтверждение эффективности стерилизации, ожидаемой на основании физических параметров процесса, эквивалентной биологической эффективности стерилизации. С этой целью время экспозиции при валидации (t_{vl}) не должно превышать значение t_k . Если выбрано слишком высокое значение t_{vl} , даже относительно большое увеличение значения величины D приводит к появлению еди-

ниц биологического индикатора без выживших тест-микроорганизмов. В данном случае неоптимальные условия стерилизации не будут обнаружены. Считается целесообразным выбрать значение t_{vl} не выше требуемого, чтобы ожидать 1 из 1000 единиц биологических индикаторов с выжившими тест-микроорганизмами. Однако не должно быть выбрано слишком малое значение t_{vl} . Если выбрать t_{vl} таким образом, что 50 % единиц биологического индикатора будут содержать выжившие тест-микроорганизмы, изменения в условиях стерилизации (например, время, температура) все еще могут привести к тому, что 100 % единиц биологического индикатора будут содержать выжившие тест-микроорганизмы, и испытание будет недействительным. По этим причинам значение t_{vl} выбирают таким образом, чтобы ожидаемая теоретическая выживаемость тест-микроорганизмов находилась между 10^{-1} и 10^{-3} , и рассчитывают по формуле (3):

$$D \cdot (\lg N_0 + 1) \leq t_{vl} \leq D \cdot (\lg N_0 + 3) \quad (3)$$

В целом, биологические индикаторы подвергаются предполагаемому процессу стерилизации, но для процессов стерилизации с избыточно высокой эффективностью расчетная эффективность цикла может быть такой, что значение t_k окажется превышено с большим запасом. В таких случаях валидация проводится с сокращенными циклами стерилизации. Сокращенные циклы могут быть короче во времени (например, полупериод) или проводиться при более низкой температуре. В последнем случае значения величины z для тест-микроорганизма при фактических условиях стерилизации должны быть известны. Сокращенный цикл выбирают так, чтобы температура была не более чем на одно значение величины z ниже контрольной температуры процесса стерилизации. Биологические индикаторы соответствующей устойчивости для этого цикла показывают ожидаемую выживаемость тест-микроорганизмов в диапазоне между нижним значением t_{vl} и значением t_k (см. формулу (3)). Решение не проводить данное испытание должно быть обоснованным.

В зависимости от значения величины D тест-микроорганизма и выбранного значения t_{vl} в биологических индикаторах содержание выживших тест-микроорганизмов можно ожидать с низкой частотой (не более 1 из 10). Если

подтверждается, что частота биологических индикаторов, содержащих выжившие тест-микроорганизмы, находится в пределах ожидаемого диапазона и не связана с неподходящими условиями стерилизации, процесс может быть одобрен.

При валидации полного цикла стерилизации все биологические индикаторы должны быть инактивированы, что доказывает снижение количества тест-микроорганизмов не менее чем в 10^6 раз. В этом случае, исходя из устойчивости используемых спор, можно сделать вывод, что процесс обеспечил достаточную летальность для достижения требуемого уровня стерильности.

4.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССА ПАРОВОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ (АВТОКЛАВИРОВАНИЯ)

Для оценки процесса паровой стерилизации наиболее широко используемыми биологическими индикаторными тест-микроорганизмами являются *Geobacillus stearothermophilus*. Указанные значения величины $D_{121^\circ\text{C}}$ для спор в зависимости от условий споруляции, материала носителя, на который инокулированы споры, первичной упаковки, окружающей носитель с инокулированными спорами, и окружающей среды во время стерилизации находятся, как правило, в диапазоне от 1,5 мин до 4,5 мин.

Подходящими штаммами микроорганизмов являются ATCC 7953, NCTC 10007, CIP 52.81, NCIMB 8157 и ATCC 12980 (эквивалент NRRL В-4419). Могут быть использованы другие штаммы, если подтверждена эквивалентность их характеристик. Доказано, что популяция *Geobacillus stearothermophilus* в количестве 10^5 или 10^6 может не подходить для процессов стерилизации при значении F_0 между 8 и 15, поэтому может быть использовано меньшее число спор (10^3 или 10^4) или другие тест-микроорганизмы. Если используют тест-микроорганизмы, отличные от *Geobacillus stearothermophilus* (например, *Bacillus subtilis* ATCC 35021), для гарантии пригодности для процесса оценивают их устойчивость.

4.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССА СУХОЖАРОВОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Для оценки процессов стерилизации сухим жаром, проводимых при температурах от 160°C

до 180 °С подходят споры *Bacillus atrophaeus* (например, ATCC 9372, NCIMB 8058, NRRL В-4418 или СІР 77.18). Если используют тест-микроорганизмы, отличные от *Bacillus atrophaeus*, для подтверждения пригодности оценивают их устойчивость к процессу стерилизации, как описано в разделе 4.1.2 данной общей фармакопейной статьи.

Как правило, биологические индикаторы, пригодные для стерилизации сухим жаром, имеют значение величины D_{160} в диапазоне от 1 мин до 5 мин. При воздействии стандартного цикла продолжительностью 2 ч при температуре 160 °С биологический индикатор со значением величины D_{160} , равным 2,5 мин, будет инактивирован на 48 по шкале десятичного логарифма. Для процессов стерилизации сухим жаром при расчетах эквивалентности эффективности цикла (F_H -расчеты) обычно значение величины z принимается около 20 °С. F_H представляет собой эквивалентное время в минутах при температуре 160 °С, достигаемой в продукте при его стерилизации в первичной упаковке. Для биологического индикатора со значением величины D_{160} , равным 5 мин, значение величины D_{150} составит около 16 мин, инактивация в контрольном цикле – 7,5 единиц по шкале десятичного логарифма. Использование процесса стерилизации при температуре, сниженной на 10 °С по сравнению с заданной температурой, может выдать ожидаемую 1 из 30 единиц биологических индикаторов, имеющих выжившие тест-микроорганизмы.

5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССА СТЕРИЛИЗАЦИИ ГАЗОМ (ПАРОФАЗНОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ)

Использование биологических индикаторов необходимо для разработки, валидации и мониторинга всех процессов газовой стерилизации. Газовая стерилизация является многофакторным процессом, где концентрация газа, влажность, температура, время и характеристики поверхности взаимодействуют сложным образом. В настоящее время в процессе газовой стерилизации используют этиленоксид, водорода пероксид и надуксусную кислоту или их комбинации.

Обеззараживание поверхности газом широко используют для медицинских приборов, изоляторов, камер и др. Использование биоло-

гических индикаторов для данных целей не рассматривается в рамках Фармакопеи Союза, при этом приведенная информация общей фармакопейной статьи может пригодиться при валидации процессов дезинфекции.

Для стерилизации этиленоксидом рекомендуется использование спор *Bacillus atrophaeus* (например, ATCC 9372, NCIMB 8058, NRRL В-4418 или СІР 77.18). Могут быть использованы другие штаммы, если подтверждена эквивалентность их характеристик. Количество жизнеспособных спор должно быть не менее 10^6 на носитель. Тест-микроорганизмы должны иметь величину D , соответствующую процессу валидации. Данные биологические индикаторы обычно используют в рутинной практике в каждом цикле стерилизации, что позволяет контролировать эффективность процесса.

Для процессов с испарением водорода пероксида подходит *Geobacillus stearothermophilus*.

Пользователь несет ответственность за установленные условия цикла стерилизации и пригодности любого используемого биологического индикатора.

6. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССА РАДИАЦИОННОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Для проверки стерилизующей дозы при радиационной стерилизации нет необходимости использования биологических индикаторов, если не указано иное. Однако использование биологических индикаторов может потребоваться для разработки и валидации процесса стерилизации ионизирующим излучением некоторых продуктов, например, содержащих клетки или ткани, или продуктов, потенциально способных обеспечить защиту для спор. Рекомендуются к использованию споры *Bacillus pumilus* (например, ATCC 27142, NCTC 10327, NCIMB 10692 или СІР 77.25). Допускается использование других штаммов, если подтверждена эквивалентность их характеристик.

7. ВЫБОР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ ПРОЦЕССА СТЕРИЛИЗАЦИИ

Кроме физических параметров стерилизации, описанных в общей фармакопейной статье 2.3.1.5. *Методы обеспечения стерильности*

продуктов, эффективность процесса стерилизации зависит от большого числа переменных, например, от количества и устойчивости контаминирующих микроорганизмов, проникновения стерилизующего агента, времени, температуры, концентрации, pH, содержания влаги и химического состава стерилизуемого продукта.

Для валидации процесса стерилизации выбирают физические условия, при которых ожидают достижения уровня обеспечения стерильности не более 10^{-6} содержания жизнеспособных микроорганизмов (2.3.1.5). В процессе проверки физических условий подтверждают их однородность для всех частей и положений загрузки. Целью валидации является подтверждение корреляции между прогнозируемым влиянием физических условий, применяемых в ходе процесса, и наблюдаемым биологическим воздействием (эффектом) на биологические индикаторы. Использование параметров процесса, подтвердивших требуемый биологический эффект, обеспечит стерильность полученного продукта при рутинном процессе.

Выбор используемого биологического индикатора зависит от:

- природы стерилизующего агента (например, тепла, газа или излучения);
- ожидаемой эффективности обработки (например, от значения величины F_{phys} , рассчитанной по параметрам процесса);
- условий процесса (например, температуры, времени, относительной влажности, концентрации газа, дозы облучения);
- характеристик продукта или предметов, подлежащих стерилизации (например, продукт в первичной упаковке, упаковочный материал, другие объекты: посуда, трубки или насосы).

При разработке процесса стерилизации оценивают продукт и его загрузку для определения наиболее труднодоступных для стерилизующего агента мест (например, холодные участки загрузки, система упаковка – укупорка, труднопроходимые участки). При выборе оптимальной схемы биологической проверки для процесса стерилизации, условия стерилизации, положения в загрузке и продукт должны быть подобраны по возможности ближе к наихудшему случаю.

2.3.1.8. ЗАМЕНА МЕТОДОВ *IN VIVO* НА МЕТОДЫ *IN VITRO* ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИН

В общей фармакопейной статье приведены рекомендации по внедрению методов *in vitro* вместо существующих методов *in vivo* в случаях, когда непосредственное сравнение испытаний не применимо по причинам, не имеющим отношения к пригодности одного или более методов *in vitro*, но не приведены детали валидации методик испытаний. Общая фармакопейная статья в первую очередь, применима к вакцинам, но представленные принципы замены подходят и для других биологических препаратов, таких как иммунные сыворотки.

ВВЕДЕНИЕ

Методы испытаний, используемые для рутинного контроля качества вакцин, предназначены для мониторинга постоянства процесса производства и обеспечения сопоставимости характеристик качества между промышленными сериями и сериями, которые были признаны безопасными и эффективными в клинических исследованиях.

Испытания безопасности и активности вакцин *in vivo* исторически играли центральную роль в обеспечении качества вакцин, но присущая результатам испытаний *in vivo* вариабельность может делать их менее подходящими для мониторинга стабильности процесса производства и для оценки потенциального влияния изменений в производстве на качество, чем надлежащим образом разработанные испытания *in vitro*. Методы для испытаний *in vitro* (включая иммунологические, молекулярные, биохимические) вместо испытаний *in vivo* разрабатывают в случае, когда проведение испытаний *in vivo* должно быть ограничено по этическим соображениям или не обеспечивает получение значимых результатов. Использование соответствующих методов *in vitro* не только сокращает использование животных, сохраняя или даже улучшая научную значимость испытаний, но также существенно снижает вариабельность испытаний, время и необходимые ресурсы, а также повышает прогнозируемость выпуска безопасных и эффективных вакцин.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Одной из проблем замены методов *in vivo*, связанной с их вариабельностью, на более стабильные методы *in vitro* является требование обеспечения сопоставимости испытаний. В некоторых случаях это может вызвать трудности, так как результаты повторных испытаний в рамках многоцентровых международных исследований могут быть несопоставимы из-за изменчивости, присущей методам *in vivo*. Многие из давно применяемых методов испытаний безопасности и активности вакцин *in vivo*, как правило, доказали свою пригодность и необходимость в обеспечении безопасности и эффективности вакцин. Так как требования к валидации методов появились позднее многих методов испытаний, формальное сравнение испытаний один-к-одному затруднительно, а, в некоторых случаях, даже невозможно. Поскольку прецизионность, воспроизводимость, пределы обнаружения и количественного определения не устанавливались для метода *in vivo*, становится трудно оценить сопоставимость одного метода с другим. Так как в соответствии с разделом 1. Общие сведения Фармакопеи Союза фармакопейные методики считаются валидированными, в настоящее время ввиду необходимости использования большого количества лабораторных животных, не только непрактично и чрезмерно дорого, а также неэтично проводить их ретроспективную валидацию.

При рассмотрении перехода от системы контроля качества на основе *in vivo* к системе контроля качества на основе *in vitro* важно понимать возможности испытания *in vivo*. Надлежащим образом проведенные испытания активности *in vivo* на лабораторных животных дают возможность измерить сложные функциональные реакции, но не обязательно предсказывают фактические ответы в целевой группе. Кроме того, испытания *in vitro* могут имитировать определенные элементы функциональных реакций *in vivo* с более низкой вариабельностью и более высокой чувствительностью.

Другая проблема состоит в том, что, когда испытание *in vivo* для данного лекарственного препарата должно быть заменено испытанием *in vitro*, параметры качества лекарственного препарата, вероятно, будут оцениваться по-другому. Например: определение содержания антигена или функциональный ответ (нейтрализация ви-

руса или токсина) в биологическом испытании *in vitro* вместо оценки эффективности *in vivo*; определение нуклеотидной или аминокислотной последовательности вместо нейровирулентности *in vivo* или ослабленного фенотипа; определение отсутствия геномов посторонних агентов методами молекулярной биологии вместо определения отсутствия микроорганизмов в тестах *in vivo*; определение связывания токсина и ферментативной активности вместо определения специфической токсичности *in vivo*. Как правило, доказательство соответствия между двумя методами испытаний не является научно обоснованным и не всегда прогнозируемо. Даже, если результаты двух испытаний по критерию «годен – не годен» совпадают, корреляция между двумя количественными методами в диапазоне испытания все еще может быть низкой. Методы или стратегия испытания *in vitro* должны гарантировать, что ключевые параметры качества, необходимые для уверенности в постоянстве безопасности и эффективности лекарственного препарата, должным образом контролируются.

Несмотря на то, что общая фармакопейная статья приводит подходы по замене существующих методов испытаний зарегистрированных лекарственных препаратов, важно при разработке лекарственного препарата учитывать возможность использования для контроля качества методов *in vitro*, и что использование испытаний *in vivo* не является обязательным.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ЗАМЕНЫ МЕТОДОВ *IN VIVO*

Основное внимание при внедрении любых предложенных методов *in vitro* в рамках системы контроля качества должно быть уделено научной значимости испытаний *in vitro* для контроля соответствующих характеристик качества. Кроме того, любые методы *in vitro* должны соответствовать современным требованиям валидации. Испытания *in vivo* для вакцин обычно заменяют испытаниями *in vitro* после многоцентровых совместных исследований, но для отдельных лекарственных препаратов это не является обязательным условием. Также не является обязательным требованием иметь одни и те же испытания, широко применимые к определенной группе лекарственных препаратов. В некоторых случаях, для оценки ключевых качественных

и количественных характеристик, измеряемых существующим методом, может потребоваться заменить его более чем одним испытанием *in vitro*.

ИСПЫТАНИЕ АКТИВНОСТИ

В случае, когда невозможно установить соответствие между результатами методов *in vitro* и *in vivo* из-за низкой разрешающей способности и (или) высокой вариабельности испытания *in vivo*, можно использовать следующий подход. Предполагают, что испытуемый лекарственный препарат имеет надлежащим образом установленный профиль безопасности и эффективности при промышленном производстве.

Испытания *in vitro* должны позволять обнаруживать различия, при соответствующем научно обоснованном контроле производственного процесса. Это должно быть подтверждено данными о способности предлагаемых испытаний контролировать ключевые характеристики качества вакцины и отражать соответствие между качеством серий, подлежащих выпуску, и сериями, признанными безопасными и эффективными в ходе клинических исследований или рутинных испытаний. Разработка соответствующих спецификаций с использованием методов *in vitro* позволит обеспечивать постоянство процесса производства. При разработке испытаний для контроля качества вакцины необходимо учитывать, что они должны отражать как содержание антигена, так и его функциональность. Если используется один метод, он должен предпочтительно измерять содержание и целостность антигена путем таргетного связывания эпитопов, относящихся к защите, обеспечиваемой вакциной. Например, моноклональное антитело или моноклональные антитела против эпитопа или эпитопов как основные мишени для создания нейтрализующих антител. Эпитоп или эпитопы предпочтительно должны быть конформационными, чтобы можно было провести испытание, указывающее на стабильность (например, вакцина для профилактики бешенства). В некоторых случаях единственный метод *in vitro* не может адекватно отражать и содержание, и функциональность. В таком случае используют несколько испытаний, как, например, для конъюгированных полисахаридных вакцин, где используют соответствующие измерения размера молекул, целостности конъюгата, общих и свободных полисахаридов.

Для проведения количественных измерений методом *in vitro* необходимы образцы, которые

различаются по величине ответа. В большинстве случаев образцы, активность которых ниже минимальной утвержденной в спецификации при использовании метода *in vivo*, не доступны для использования, потому что постоянство состава лекарственного препарата, как правило, хорошо поддерживается, а активность между сериями существенно не отличается и (или) точность испытания *in vivo* такова, что он не может дифференцировать серии, если разница не очень велика. Первоначальную оценку испытания проводят с образцами различных концентраций, после чего можно проводить испытание образцов, подвергавшихся воздействию различных типов стрессовых условий, чтобы дополнительно установить возможность новым методом оценивать стабильность лекарственного препарата. Невозможность подтвердить соответствие между методами *in vitro* и *in vivo* не обязательно означает, что метод *in vitro* не пригоден. Во многих случаях метод *in vitro* позволяет обнаруживать изменения в лекарственном препарате, которые не могут быть обнаружены методом *in vivo*. В таких случаях метод *in vitro* может считаться лучшим для мониторинга стабильности процесса производства и может быть более подходящим для оценки влияния изменений в производстве на качество вакцины.

ИСПЫТАНИЯ НА БЕЗОПАСНОСТЬ

Специфическая токсичность

Метод обнаружения остаточных токсичных компонентов *in vitro* должен быть специфичным и более чувствительным, чем существующий метод *in vivo*. По возможности следует использовать полнофункциональную систему *in vitro* (например, линию токсин-чувствительных клеток). Если функциональная система *in vitro* недоступна, стратегия испытания *in vitro* может быть основана на последовательном определении (измерении) более одного параметра, где это необходимо, так, чтобы они отражали способ воздействия рассматриваемых токсичных компонентов. Например, использование испытаний на основе иммунологических и биохимических методов для определения связывания рецептора и (или) активности фермента. В большинстве случаев, когда необходимо заменить испытание *in vivo*, будут доступны данные о чувствительности этой модели для обнаружения рассматриваемого токсина. Новые методы *in vitro* могут быть охарактеризованы с использованием метода

добавок и использованием архивных сведений об испытаниях *in vivo* для подтверждения их достаточной чувствительности. Такие испытания в сочетании с соответствующими временными и температурными условиями также могут быть использованы для подтверждения отсутствия реверсии специфического токсина.

Метод массового параллельного секвенирования молекулы взамен испытания на нейровирулентность

Существующее испытание на нейровирулентность *in vivo* может быть заменено генотипическим методом оценки нуклеотидной или аминокислотной последовательности вирусной вакцины *in vitro*. Для любого метода генотипирования *in vitro* необходимы глубокие знания о молекулярных маркерах, ответственных за ослабление живой вирусной вакцины (например, пероральная вакцина для профилактики полиомиелита живая). И тогда для мониторинга соответствия серий вакцины можно использовать определение наличия требуемых маркеров молекулярной аттенуации и процентного содержания мутантов с помощью таких методов, как массовое параллельное секвенирование.

Новые методы молекулярной биологии для обнаружения посторонних вирусных агентов

Обнаружение посторонних вирусных агентов в банках клеток, посевном материале (посевной культуре вируса), биомассе вируса в настоящее время проводят с использованием ряда методов *in vivo* и *in vitro* на разных этапах производственного процесса. Доступны новые чувствительные методы молекулярной биологии с широкими возможностями обнаружения, в том числе: методы массового параллельного секвенирования или высокопроизводительного секвенирования, полимеразная цепная реакция с вырожденными праймерами для семейств вирусов или методы случайного праймирования

(связанные или не связанные с секвенированием), гибридизация с множеством олигонуклеотидов, масс-спектрометрия. Использование этих новых методов молекулярной биологии позволило установить пробелы в существующей стратегии испытаний, так как были выявлены ранее необнаруживаемые вирусные контаминанты в готовом нерасфасованном продукте, банках клеток, из которых он был произведен, и на промежуточных стадиях производства. Новые методы молекулярной биологии (например, массовое параллельное секвенирование или высокопроизводительное секвенирование) обнаруживают геномы вирусов, в то время как существующие методы *in vivo* основаны на наблюдениях за эффектами вирусов на экспериментальных животных. При замене методов *in vivo* новыми методами молекулярной биологии необходимо сравнение специфичности и чувствительности новых и существующих методов. Для этого создают соответствующую группу репрезентативных хорошо охарактеризованных модельных вирусов для оценки способности нового метода обнаруживать вирусы, которые обнаруживаются (или не обнаруживаются) методами *in vivo*, и для определения того, что их чувствительность не хуже чувствительности методов *in vivo*. Этот последний аспект является особенно сложным, так как новые методы молекулярной биологии обнаруживают характеристики вирусного контаминанта, отличные от обнаруживаемых методом *in vivo* (геном для методов молекулярной биологии по сравнению с инфекционным вирусом для методов *in vivo*), а также отсутствуют данные по валидации для методов *in vivo* или имеются в ограниченном объеме. Результат новых методов молекулярной биологии не является окончательным, так как обнаружение генома или фрагментов генома не обязательно указывает на присутствие инфекционного вируса.

2.3.19. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

203190002-2023

203190003-2023

2.3.19.2. ПРОДУКТЫ С РИСКОМ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГУБЧАТОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ЖИВОТНЫХ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Продукты с риском передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных представляют собой продукты, полученные из тканей или секретов животных, восприимчивых к губчатой энцефалопатии, за исключением экспериментально вызванных заболеваний.

Требования общей фармакопейной статьи распространяются на все субстанции для фармацевтического применения и лекарственные препараты:

- полученные от таких животных;
- содержащие активные фармацевтические субстанции или вспомогательные вещества, полученные от таких животных;
- произведенные с использованием продуктов (например, сырья, исходных материалов или реактивов, включая питательные среды), полученных от таких животных.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство должно осуществляться в соответствии с требованиями общей статьи 2.3.19.3. *Минимизация риска контаминации лекарственных средств инфекционными агентами прионных заболеваний.*

2.3.19.3. МИНИМИЗАЦИЯ РИСКА КОНТАМИНАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИНФЕКЦИОННЫМИ АГЕНТАМИ ПРИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Настоящая общая фармакопейная статья приводится для информации.

Трансмиссивные губчатые энцефалопатии (*transmissible spongiform encephalopathies, TSE*, далее – ТГЭ) представляют собой группу хронических нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся накоплением аномальных изоформ клеточного гликопротеина (приона). Прион или белковая инфекционная частица (*proteinacious infectious particle, prion*), или прионный белок (*prion protein, PrP*) представляет собой измененную изоформу белка (за счет аномальной трехмерной структуры). Инфекционная изоформа *PrP^{TSE}* способна превращать нормальный белок *PrP_c* в инфекционную изоформу, изменяя его конформацию (третичную структуру). Аномальная изоформа *PrP* (*PrP^{TSE}*) отличается от нормальной *PrP* (*PrP_c*) устойчивостью к протеазе и денатурации высокой температурой. Именно *PrP^{TSE}* является инфекционным агентом, вызывающим развитие ТГЭ.

К заболеваниям ТГЭ относят:

- губчатую энцефалопатию (ГЭ) крупного рогатого скота (КРС);
- скрейпи овец и коз;
- хроническую изнуряющую болезнь у семейства оленьих (олени и лоси);
- трансмиссивную энцефалопатию норок, выращиваемых на фермах;
- губчатую энцефалопатию кошачьих (особенно у домашних кошек и больших животных семейства кошачьих, содержащихся в неволе);
- губчатую энцефалопатию экзотических копытных в зоопарках.

Виды животных, естественно восприимчивые к заражению агентами ГЭ или восприимчивые к заражению путем введения внутрь, за исключением человека и приматов, определя-

ют как ТГЭ-релевантные виды животных. К ним относят КРС, овец, коз.

У человека ГЭ включают различные формы болезни Крейтцфельда-Якоба, Куру, болезнь (синдром) Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, фатальную семейную бессонницу.

В настоящее время известно три варианта возникновения прионных заболеваний: прямое заражение, наследственные и спорадические (возникающие спонтанно) формы. Способность к трансмиссии зависит от происхождения (вида животных), штамма приона, дозы, путей введения и, у некоторых видов, принимающей аллели *PRNP* гена в результате мутаций в гене *PRNP*, обуславливающих образование *PrP^{TSE}* из *PrP^c* (наследственные формы). Определенный комплекс естественных барьеров ограничивает межвидовое распространение ТГЭ, но при соответствующих условиях видовые барьеры могут быть преодолены.

Прионная форма белка чрезвычайно стабильна и накапливается в пораженной ткани, вызывая ее повреждение и в конечном счете гибель. Стабильность прионной формы белка означает, что прионы устойчивы к денатурации под действием химических и физических агентов. Возбудитель ГЭ КРС исключительно резистентен ко всем мерам борьбы, обычно инактивирующим такие инфицирующие агенты, как бактерии, вирусы, включая термическую обработку. Обычные меры инактивации неэффективны в отношении ГЭ КРС. В настоящее время наиболее эффективным способом борьбы с ГЭ является исключение из использования материалов, полученных из ТГЭ-релевантных видов животных. Однако использование продуктов животного происхождения необходимо для производства некоторых лекарственных препаратов, что делает полное исключение риска невозможным. В связи с этим меры, принимаемые для управления риском передачи ГЭ КРС, сводятся к минимизации риска, а не его исключению.

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Общая фармакопейная статья распространяется на все сырье и материалы, имеющие животное или человеческое происхождение, используемые в процессе производства лекарственных средств и (или) входящие в состав лекарственных средств. Рекомендации общей фармакопейной статьи также применимы к ма-

териалам, непосредственно контактирующим с лекарственным средством или оборудованием, применяемым в производстве лекарственного средства, что обуславливает риск контаминации.

Требования к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных устанавливаются уполномоченным органом в соответствии с правом Союза и критериями оценки статуса страны, установленными Всемирной организацией здоровья животных (*World Organisation for Animal Health, WOAH*).

2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2.1. ИСХОДНОЕ СЫРЬЕ И ИСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Материалы, получаемые от ТГЭ-релевантных видов животных, используемые для получения активных фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ и адьювантов, исходного сырья, исходных материалов и реактивов, и применяемые в производстве лекарственных средств должны оцениваться на риск передачи ГЭ.

В качестве источника материалов рекомендуется использовать молодых животных.

Материалы, такие как чистящие агенты, смягчители и смазывающие вещества, с которыми контактирует лекарственное средство при стандартном технологическом процессе, или на последней стадии, или в первичной упаковке, должны быть получены из производных твердых жиров при строгом соблюдении физико-химических процессов, описанных в разделе 5 данной общей фармакопейной статьи.

Сырье и материалы животного происхождения, используемые в производстве лекарственных средств, в том числе при получении посевного материала и банков клеток, должны иметь подтверждающие документы о минимизации риска передачи ГЭ или документы о результатах оценки риска передачи ГЭ.

2.2. ПОСЕВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, БАНКИ КЛЕТОК И ПРОДУКТЫ ФЕРМЕНТАЦИИ

Посевные материалы и банки клеток, используемые для производства лекарственных препаратов, должны оцениваться на риск передачи ГЭ.

Риск передачи ГЭ возможен для посевных материалов и банков клеток, используемых в производстве:

- вакцинных антигенов;
- лекарственных препаратов, полученных

с использованием биотехнологических процессов;
– других лекарственных препаратов, в процессе производства которых используются системы посевных материалов или банков клеток, уже утвержденных для производства компонентов зарегистрированного лекарственного препарата.

Если материалы, полученные от ТГЭ-релевантных видов животных, используют в процессах получения продуктов ферментации или посевных материалов и банков клеток, они должны полностью соответствовать требованиям права Союза.

2.3. ПРИНЦИПЫ МИНИМИЗАЦИИ РИСКА

При наличии у производителя выбора предпочтительным является использование материалов, полученных не от ТГЭ-релевантных видов животных или источника неживотного происхождения. Использование материалов, полученных от ТГЭ-релевантных видов животных, вместо материалов не от ТГЭ-релевантных видов животных или материалов неживотного происхождения, должно быть обосновано. Если необходимо использование материалов от ТГЭ-релевантных видов животных, должны быть приняты все необходимые меры по минимизации риска передачи ГЭ.

В настоящее время доступные диагностические наборы для выявления ГЭ-инфекции *in vivo* отсутствуют. Диагноз основывается на посмертном подтверждении характерных мозговых повреждений при помощи гистологических данных и (или) обнаружением PrP^{TSE} методом Вестерн-блоттинга или иммунологических анализов. Также для подтверждения наличия инфекционного агента ГЭ используют введение подозрительной ткани чувствительным видам лабораторных животных. Однако вследствие длительных инкубационных периодов всех агентов ГЭ результаты испытаний *in vivo* получают только по истечении месяцев или лет.

Способность иммунохимических испытаний к обнаружению PrP^{TSE} в посмертных образцах выявлять зараженных животных зависит от времени забора образца по отношению к сроку заражения, типа собранной ткани, полученной инфекционной дозы в сопоставлении со сроками наступления клинических проявлений заболеваний.

Хотя скрининг источников среди животных при помощи *in vitro* испытаний может предот-

вратить использование животных на поздних стадиях инкубационного периода заболевания и обеспечить информацией об эпидемиологическом статусе данной страны или региона, испытания, пригодные для однозначного подтверждения незараженности животного, отсутствуют.

Минимизация риска передачи ГЭ базируется на следующих взаимодополняющих параметрах:

- источники заражения животного происхождения и их географическое происхождение;
- природа материала животного происхождения, используемого в производстве, и выполнение процедур по предупреждению перекрестной контаминации продуктами с более высоким уровнем риска;
- процессы производства, включая наличие системы качества, гарантирующие однородность и контролируемость продукта.

2.4. ИСТОЧНИКИ ЗАРАЖЕНИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ГЭ КРС представляет собой одну из группы заболеваний, которые поражают целый ряд млекопитающих. Заболевания, известные как ГЭ или прионные болезни, являются следствием накопления аномальных прионных протеинов в головном мозге и нервной системе.

В качестве источника сырья и (или) материалов, используемых при получении продуктов для производства лекарственных препаратов, должны быть животные, пригодные для применения в качестве продуктов питания человека и выдержавшие до и после убоя проверку на соответствие требованиям права Союза или аналогичным требованиям третьих стран, за исключением материалов, полученных от живых животных, которые должны быть признаны здоровыми по результатам клинического обследования.

2.4.1. География источников заражения

2.4.1.1. Материалы от крупного рогатого скота

Всемирная организация здоровья животных устанавливает критерии для оценки состояния стран в отношении ГЭ КРС в Международном кодексе здоровья животных. Страны или регионы классифицируют следующим образом:

Категория А – страны или регионы с незначительным риском ГЭ КРС;

Категория В – страны или регионы с контролируемым риском ГЭ КРС;

Категория С – страны или регионы с неопределенным риском ГЭ КРС.

В общей фармакопейной статье используют классификацию ГЭ КРС, основанную на правилах Всемирной организации здоровья животных.

Животные, при наличии выбора производителя, должны быть получены из стран с незначительным риском ГЭ КРС (категория А), если использование продуктов из стран с более высоким риском ГЭ КРС не является оправданным. При использовании животных из стран с неопределенным риском ГЭ КРС всегда должно быть представлено обоснование.

2.4.1.2. Овцы и козы (*мелкий рогатый скот*)

Во многих странах мира в природе зарегистрированы клинические случаи заболевания мелких жвачных животных скрейпи. В связи с тем, что ГЭ у овец и коз может быть ошибочно принята за скрейпи, в качестве меры предосторожности при анализе источников продуктов, полученных от мелкого рогатого скота, учитывается масштаб распространения в стране как ГЭ КРС, так и скрейпи, а также тип тканей, из которых получены материалы.

Для овец вследствие опасений, касающихся возможности их заражения ГЭ при создании стад, свободных от ГЭ, можно рассматривать возможность использования генотипов, показывающих устойчивость к инфекции ГЭ и (или) скрейпи. Однако возможность того, что генотипы, устойчивые к скрейпи, окажутся подвержены ГЭ (экспериментальное введение внутрь) или атипичной скрейпи (случаи в природе), также должна быть принята во внимание. Козы являются недостаточно изученными в отношении генотип-специфической чувствительности.

Материал от мелкого рогатого скота предпочтительно получать из стран с длительной историей отсутствия скрейпи. Если материал получен из других источников, необходимо соответствующее обоснование.

2.4.2. Стада КРС с незначительным риском ГЭ КРС (скрытый риск)

Наиболее безопасным источником являются страны с незначительным риском (страны категории А).

В настоящее время невозможно измерить степень снижения географического риска ГЭ для коров из стад КРС с незначительным риском (скрытый риск). Однако предполагается, что снижение такого риска представляется существенное.

Получение материалов от изолированных стад КРС при оценке риска необходимо рассматривать с учетом категории страны по классификации Всемирной организации здоровья животных.

2.5. ЧАСТИ ТЕЛА ЖИВОТНЫХ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЖИДКОСТИ И СЕКРЕТЫ КАК ИСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

У инфицированных ГЭ животных органы и секреты имеют разный уровень инфекционности. Если необходимо использовать материалы от ТГЭ-ревалентных видов животных, выбирают материалы с наиболее низкой категорией риска.

Независимо от стадии заболевания ткани группируют в 3 основные категории в отношении их инфекционности, представленные в таблице 2.3.19.3.-1.

Ткани категории IA и материалы, полученные из них, не должны использоваться в производстве лекарственных препаратов, за исключением случаев, когда возможность их использования обоснована (см. раздел 4 данной общей фармакопейной статьи).

Несмотря на то, что в группе тканей с низкой инфекционностью (категория IB) почти всегда имеются некоторые ткани с более низким уровнем риска (например, кровь) по сравнению с другими (например, лимфоретикулярные ткани), данные об уровнях инфекционности этих

Таблица 2.3.19.3.-1. – Категории тканей животных в отношении их инфекционности

Категория IA	Ткани с высокой инфекционностью ткани центральной нервной системы (ЦНС), достигающих высоких титров инфекционности на поздних стадиях ГЭ, и некоторые ткани, анатомически связанные с ЦНС
Категория IB	Ткани с низкой инфекционностью периферические ткани с положительными тестами на инфекционность и (или) PrP^{TSE} по меньшей мере на одну форму ГЭ
Категория IC	Ткани с неопределяемой инфекционностью ткани, при исследовании которых на инфекционность отсутствовала какая-либо определяемая инфекционность и (или) были получены отрицательные результаты на PrP^{TSE}

тканей слишком ограничены, чтобы выделить в этой категории подкатегории с различным уровнем риска. Также очевидно, что отнесение определенной ткани к той или иной категории может зависеть от заболевания или вида животных и подлежит пересмотру по мере появления новых данных.

Категории в таблице 2.3.19.3.-1 являются ориентировочными, поэтому важно отметить следующее:

– в определенных ситуациях может произойти перекрестная контаминация тканей с различной категорией инфекционности. На вероятность риска будут влиять условия получения тканей, в частности, наличие контакта тканей с низкой инфекционностью или тканей с неопределяемой инфекционностью (категории IB и IC) с тканями с высокой инфекционностью (категория IA). Степень перекрестной контаминации некоторых тканей может быть увеличена, если в процессе убоя зараженных животных используют проникающие или непроникающие процедуры разрушения головного мозга и (или) распиливания головного или спинного мозга. Риск перекрестной контаминации будет меньше при заборе биологических жидкостей организма с минимальным повреждением ткани и удалении клеточных компонентов, и при сборе эмбриональной крови без контаминации другими материнскими или эмбриональными тканями, включая плаценту, амниотическую и аллантоисную жидкости. Перекрестную контаминацию определенных тканей с тканью категории IA предотвратить очень трудно или невозможно (например, череп), что требует учета при оценке риска;

– для определенных классов материалов используемая техника убоя с разрушением (распиливанием) может быть критична для снижения потенциального риска вследствие вероятности попадания частиц мозга в периферические органы, в частности, в легкие. Техника разрушения (распиливания) должна быть описана, так же как и процедуры удаления тканей с высокой инфекционной активностью. Должны быть подробно описаны процедуры сбора тканей и (или) органов животных, подлежащих использованию, и принимаемые меры по предупреждению перекрестной контаминации материалом более высокого риска;

– риск контаминации органов и тканей потенциально опасными в отношении ГЭ материа-

лами центральной нервной системы (ЦНС) при использовании для убоя КРС техники оглушения зависит от следующих факторов:

- содержание инфекционных возбудителей ГЭ КРС в мозгу умерщвленного животного;
- степень повреждения головного мозга;
- диссеминация (уровень контаминации) кусочками головного мозга тела животного.

Указанные факторы следует оценивать во взаимосвязи с источником происхождения животных по классификации, возрастом животных в случае использования КРС и посмертными исследованиями их с помощью валидированных методик.

Основные принципы, описанные выше, также применимы к овцам и козам.

Риск возникновения перекрестной контаминации будет зависеть от некоторых дополнительных факторов, включая:

- меры, принятые для предупреждения контаминации во время сбора тканей;
- уровень контаминации (количество контаминирующих тканей);
- количество и тип материалов, собираемых одновременно.

Производители должны оценивать риск с учетом вероятности перекрестной контаминации.

Обобщенные современные данные о распределении инфекционности и PrP^{TSE} у коров с ГЭ и у овец и коз со скрепьи представлены в таблицах, приведенных в приложении к данной общей фармакопейной статье. Информация в таблицах основана исключительно на наблюдениях за случаями заболеваний в природе или экспериментальном инфицировании при заражении во внутрь (у КРС), и не содержит в себе данных о моделях со штаммами, вызывающими ГЭ и адаптированными к экспериментальным животным (пассажи могут значительно и непредсказуемо изменить их фенотип в сравнении с имеющимися в природе возбудителями заболевания).

При оценке риска необходимо учитывать классификацию тканей, приведенную в таблицах приложения к данной общей фармакопейной статье.

2.6. ВОЗРАСТ ЖИВОТНЫХ

В качестве источника материалов рекомендуется использовать молодых животных, поскольку инфекционная активность при ГЭ

у КРС нарастает в инкубационный период, длящийся нескольких лет.

Дополнительно следует отметить, что возрастные критерии зависят также от географического происхождения. Возраст является более важным показателем для материалов из стран с более высоким риском (страны категорий В и С).

2.7. ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ПРОЦЕСС

Оценка общего снижения возможного риска в лекарственных препаратах в отношении ГЭ должна проводиться с учетом мер по контролю:

- источника сырья и исходных материалов;
- производственного процесса.

Контроль источников материалов является очень важным критерием по обеспечению приемлемой безопасности продукта вследствие имеющихся данных о резистентности возбудителей ГЭ к большинству инактивирующих процедур.

Контроль производственного процесса и его серийности (то есть формирование серий, разделение партий, процедуры очистки между производством разных серий) должен осуществляться в рамках соответствующей системы качества.

Необходимо выполнять процедуры, обеспечивающие прослеживаемость материалов, проведение внутренних аудитов и аудитов поставщиков сырья и исходных материалов.

Определенные технологические процедуры могут значительно снизить риск контаминации ГЭ, например, процедуры, используемые при производстве материалов из жиров (см. раздел 5 данной общей фармакопейной статьи). Так как жесткая обработка не может быть применена ко многим материалам, процессы физического удаления материала, обогащенного прионами, такие как осаждение и фильтрация, более приемлемы, чем химическая обработка. Должно быть представлено описание производственного процесса, включая внутривыпускной контроль, а также обсуждены меры, позволяющие снизить или исключить контаминацию ГЭ. В случае участия в производственном процессе нескольких производственных площадок должны быть четко указаны стадии, выполняемые на каждой площадке. Должны быть описаны все принимаемые меры по обеспечению мониторинга исходного материала каждой производственной серии.

Процесс очистки

Процедура очистки технологического оборудования может быть трудновалидируемой

на способность удаления агентов ГЭ. Имеются сообщения о том, что после работы с препаратами с высоким титром возбудителей ГЭ количество возбудителей инфекции, поддающееся обнаружению, может быть адсорбировано на поверхности нержавеющей стали. Удаление всех адсорбированных белков при помощи 1 М раствора натрия гидроксида или хлорсодержащих дезинфектантов (например, 20 000 ppm хлора в течение 1 ч) считается приемлемым методом в случаях, когда оборудование, подвергнутое воздействию потенциально контаминированного материала, не может быть заменено. Мягкая обработка щелочью предельной концентрации или стабилизированной хлорной известью в комбинации с моющими средствами, проводимая при заданных температурах, показывает способность удаления прионов, как и в классических процедурах очистки с использованием натрия гидроксида и хлора. Система, основанная на обработке парами водорода пероксида, также применима для инактивации возбудителей ГЭ. Такие новые процедуры более совместимы с деликатными материалами и могут быть пригодны для практического использования.

Если при производстве продукции используют материалы с риском ГЭ, должны быть введены в действие процедуры очистки, в том числе меры контроля, для минимизации риска перекрестной контаминации между производственными сериями. Это особенно важно, если материалы из разных категорий риска обрабатывают на той же производственной площадке и том же оборудовании. Если при производстве продукта используют материалы категории IА, должно быть применено специальное оборудование, при отсутствии других указаний.

Для разработки и утверждения новых процедур дезактивации необходимы дальнейшие исследования с целью снижения риска перекрестной контаминации материалов и оборудования, которые несовместимы с процедурами, рекомендованными Всемирной организацией здравоохранения.

Валидация процедур удаления и (или) инактивации

Исследования по валидации процедур удаления и (или) инактивации ГЭ трудно поддаются оценке. Необходимо принимать во внимание природу материала и его применимость в естественном состоянии, дизайн исследования

(включая уменьшение масштаба технологических процессов) и методики обнаружения возбудителя (*in vitro* или *in vivo*). В настоящее время проведение работ по валидации не требуется. Однако, если имеются утверждения о безопасности продукта в отношении ГЭ, основанные на способности производственных процессов удалять или инактивировать возбудителей ГЭ, они должны быть подтверждены соответствующими экспериментальными исследованиями.

Процесс производства по возможности должен быть разработан с учетом имеющейся информации о методах, считающихся пригодными для инактивации или удаления возбудителей ГЭ. Для некоторых видов продукции (см. раздел 5.3 данной общей фармакопейной статьи), у которых валидированный процесс удаления и (или) инактивации затруднен в применении, может потребоваться оценка, которую следует основывать на исходном материале и любых опубликованных данных о риске ГЭ.

3. ОЦЕНКА РИСКА МАТЕРИАЛОВ ИЛИ СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ И ИЗГОТОВЛЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Всесторонняя оценка риска для лекарственного препарата должна содержать оценку риска для всех материалов, полученных от ТГЭ-релевантных видов животных, и по возможности оценку снижения содержания возбудителей ГЭ или их инактивации на технологических стадиях производства субстанции для фармацевтического применения или готового продукта и должна показать, что все факторы риска ГЭ были учтены и риск был минимизирован.

Выбор и обоснование порядка контроля материала, полученного от ТГЭ-релевантных животных, осуществляется производителем с учетом последних данных научно-технического прогресса. Окончательное решение о соответствии установленным требованиям принимает уполномоченный орган.

4. ОЦЕНКА СООТНОШЕНИЯ «ПОЛЬЗА – РИСК»

Для решения вопроса о приемлемости лекарственного средства, содержащего материа-

лы от ТГЭ-релевантных животных, или в производстве которого используют материалы животного происхождения, необходимо учитывать следующие факторы:

- путь введения лекарственного препарата;
- количество материала животного происхождения, входящего в состав лекарственного средства;
- максимальная терапевтическая доза (суточная доза и продолжительность лечения);
- показания к применению лекарственного препарата и его клиническая эффективность;
- наличие видовой барьеры.

Ткани с высокой инфекционностью (ткани категории IA) и продукты, полученные из них, не должны использоваться в производстве лекарственных средств, исходных материалов и полупродуктов (включая активные фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества и реактивы) при отсутствии другого обоснования. Их применение в производстве активных фармацевтических субстанций допускается в исключительных обстоятельствах, если представлены:

- надежное обоснование необходимости их использования;
- положительная оценка соотношения «польза – риск» согласно предполагаемому применению.

Субстанции для фармацевтического применения, производимые из материалов категории IA, если их использование обосновано, должны быть получены от животных из стран с незначительным риском (категория A).

5. ПОЛОЖЕНИЯ ПО ОТДЕЛЬНЫМ МАТЕРИАЛАМ

5.1. КОЛЛАГЕН

Коллаген представляет собой фибриллярный белковый компонент соединительной ткани млекопитающих, который получают из костей, шкур и кожи, спилок шкур, связок и сухожилий.

Документация для коллагена, подтверждающая соответствие требованиям данного раздела, должна быть представлена с учетом положений разделов 2 – 4 данной общей фармакопейной статьи. Кроме того, должно быть рассмотрено следующее:

- для коллагена, полученного из костей, применяют требования, установленные для желатина (см. ниже). Однако в процессе производства коллагена в отличие от производства желатина

вероятна более низкая возможность инактивации прионов, поэтому источник получения материала является более критичным по риску передачи ГЭ;

– коллаген, произведенный из таких тканей, как шкура, кожа, связки и сухожилия, обычно не обладает существенным риском в отношении ГЭ, если возможность контаминации потенциально зараженными материалами, например попадание крови и (или) тканей ЦНС, при их заготовке исключена. Поэтому шкуры представляют более безопасное сырье для имплантатов человека, полученных из коллагена. Вместе с тем перекрестное загрязнение мозговой тканью, произошедшее во время убоя и высушенное у поверхности кожи, является трудноустраняемым, что представляет дополнительный аспект, требующий учета при оценке безопасности данного исходного материала.

Процесс производства коллагена может включать несколько общих стадий с получением желатина, например, обработка щелочью, натрия сульфатом, кальция гидроксидом и натрия гидроксидом или ферментативная обработка. Тем не менее, даже эти общие стадии могут различаться по продолжительности и значениям pH, что может привести к существенным различиям в их инактивирующей способности. Для поддержания безопасности продукта в процессе производства коллагена должен присутствовать этап оценки риска, базирующийся на сходстве этапов обработки коллагена и инактивации желатина. Кроме этапов обработки существуют также различия в конечном использовании материала и, следовательно, в их оценке риска (желатин широко используется для приема внутрь, коллаген же часто применяется в форме хирургических имплантатов). Данный аспект также следует учитывать при окончательной оценке риска.

5.2. ЖЕЛАТИН

Желатин представляет собой природный растворимый белок, гелеобразующий или негелеобразующий, полученный частичным гидролизом коллагена, производимого из костей, шкур и кожи животных.

Документация, подтверждающая соответствие желатина данному разделу, должна быть представлена с учетом положений разделов 2 – 4 данной общей фармакопейной статьи.

Источники материала

Желатин, входящий в состав лекарственных средств, может быть произведен из костей или

шкур. Шкуры, при условии предупреждения во время заготовки перекрестной контаминации потенциально зараженными материалами, представляют собой более безопасный исходный материал, чем кости.

Шкуры как исходный материал. Шкуры, используемые для производства желатина, представляют собой более безопасный источник материала, чем кости. При этом настоятельно рекомендуется обеспечить условия, предупреждающие перекрестную контаминацию потенциально зараженными материалами во время заготовки.

Кости как исходный материал. При использовании костей для производства желатина для обеспечения безопасности конечного продукта необходим контроль по дополнительным параметрам. При получении желатина из костей КРС необходимо контролировать качество исходных материалов и выполнять следующие условия:

– череп и позвоночник, содержащий спинной мозг, должны быть исключены из состава сырья (исходное сырье и исходный материал) независимо от возраста и страны происхождения КРС;

– позвонки должны быть удалены из исходного сырья и исходного материала от КРС с возрастом старше 30 мес (страны категории В или С);

– желатин для парентерального использования должен быть произведен из костей, полученных из стран категории А и В. Желатин для приема внутрь может быть произведен из костей, полученных из стран категории А, В и С;

– желатин должен быть произведен одним из способов, описанных ниже.

Способы производства

Шкуры. При производстве желатина из шкур не требуется особых конкретных способов и условий переработки, если выполняются все процедуры для предупреждения перекрестной контаминации как при заготовке шкур, так и в ходе производственного процесса.

Кости. Если в качестве исходного материала используют кости, способ производства будет являться вторым параметром, обеспечивающим безопасность желатина:

– желатин может быть произведен из костей КРС от источников в странах категории А, В или С в соответствии с условиями, описанными в разделе 5.2 данной общей фармакопейной статьи, с использованием кислот и щелочей, или нагревания, или давления;

– при проведении оценки риска должен быть

принят во внимание производственный процесс в соответствии с описанием в разделе 3 данной общей фармакопейной статьи. В валидационных экспериментах показано, что использование в производстве желатина как кислот, так и щелочей позволяет инактивировать и (или) удалять агенты ГЭ. Исследования показали, что дополнительная обработка костей и (или) оссеина щелочью (рН 13) в течение 2 ч значительно повышает способность процесса производства инактивировать и (или) удалять ГЭ. Введение в технологический процесс стадий фильтрации, ионообменной хроматографии и ультразвуковой стерилизации также повышает степень безопасности желатина;

- при стандартном щелочном способе производства для получения костной ткани (оссеина) кости мелко измельчают, обезжиривают горячей водой и деминерализуют раствором хлороводородной кислоты (не менее 4 % при рН не более 1,5) в течение не менее 2 сут. Затем проводят щелочную обработку насыщенным раствором кальция гидроксида (рН не менее 12,5) в течение 20 сут;

- кости КРС могут быть переработаны с помощью кислотного способа (предварительная обработка кислотой), при котором оссеин вымачивается при рН не более 3,5 в течение не менее 10 ч;

- как к кислотному, так и щелочному способам производства желатина применима высокотемпературная обработка (стерилизация) при температуре не менее 138 °С в течение не менее 4 с;

- при производственном процессе с использованием нагревания и давления, высушенные, измельченные и обезжиренные кости автоклавировать с помощью насыщенного пара при давлении более 3 бар и температуре не менее 133 °С в течение не менее 20 мин с последующей экстракцией белков горячей водой.

Заключительные стадии при использовании процессов кислотной, щелочной или температурной обработки под давлением практически одинаковы и включают экстракцию желатина, промывание, фильтрацию и концентрирование.

5.3. МАТЕРИАЛЫ ИЗ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ЕЕ КОМПОНЕНТЫ

Эмбриональная (фетальная) сыворотка КРС широко используется при работе с клеточными культурами. Фетальная сыворотка КРС должна быть получена из плодов, извлеченных на скотобойнях у здоровых коров, пригодных

для употребления в пищу человеком. Матка должна быть полностью удалена, эмбриональная кровь собирается в закрытую систему для сбора крови в специально предназначенном для этого месте или зоне в асептических условиях путем сердечной пункции.

Сыворотку новорожденных телят получают у телят в возрасте до 20 сут; сыворотку телят – у животных в возрасте менее 12 мес. Донорскую сыворотку КРС получают у животных в возрасте не более 36 мес, при этом наличие отрицательного статуса стада в отношении ГЭ должно быть четко определено и задокументировано.

Во всех случаях для предупреждения перекрестной контаминации тканями с более высоким риском, сыворотка должна быть собрана обученным персоналом согласно определенным процедурам, регламентируемым соответствующими нормативными документами.

С целью подтверждения соответствия материалов из крови КРС и ее компонентов требованиям общей фармакопейной статьи документация на них должна быть представлена с учетом положений разделов 2 – 4 данной общей фармакопейной статьи (таблица 2.3.19.3.-2). Кроме того, следует учитывать следующее.

Прослеживаемость

Должна быть обеспечена прослеживаемость каждой серии сыворотки или плазмы до скотобойни. Скотобойни должны иметь и хранить списки ферм, откуда поступили животные. Если сыворотка получена у живых животных, для каждой серии сыворотки должны вестись записи, обеспечивающие прослеживаемость ее происхождения с соответствующей фермы.

Географическое происхождение

В связи с тем, что уровень инфекционности ГЭ тканей КРС более высокий, чем в отношении скрейпи, в качестве меры предосторожности кровь КРС должна быть получена из стран категории А. Кровь КРС из стран категории В также является приемлемой при условии, что нет риска перекрестной контаминации крови тканями мозга при убое животных в возрасте более 21 мес.

Методы оглушения

Если образцы получают от убитых животных, метод убоя играет важную роль в обеспечении безопасности материала. Было установлено, что оглушение пистолетом с выдвигающимся ударным стержнем с прокалыванием или без прокалывания спинного мозга, так же как пневматическим ударным аппаратом, осо-

Таблица 2.3.19.3.-2. – Концепция для определения соответствия требованиям крови (сыворотки) крупного рогатого скота и ее компонентов

Продукт	Фетальная сыворотка	Донорская телячья сыворотка	Донорская сыворотка взрослого животного	Телячья сыворотка	Взрослая сыворотка	Сыворотка/плазма/компоненты сыворотки взрослого животного	Компоненты сыворотки взрослого животного	Компоненты сыворотки взрослого животного
географическое происхождение КРС	категории А и В	категории А и В	категории А и В ¹	категории А и В	категория А	категория В	категория А	категория В
возраст КРС	нерожденный	< 1 год	< 36 мес	< 1 год	не ограничен	< 21 мес ²	не ограничен	< 30 мес
убой/перекрестная контаминация крови материалами ЦНС	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
доказательство снижения содержания прионов в процессе производства	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Примечание.	нет риска перекрестной контаминации							

Примечание.

¹ Если источник из стран категории В, КРС должен быть из четко определенных и документированных стад.

² Более старший возраст может быть разрешен, если перекрестное загрязнение крови материалами ЦНС исключено (например, халяльный убой).

³ Доказательство снижения содержания прионов может не требоваться, если перекрестное загрязнение крови материалами ЦНС исключено (например, халяльный убой).

бенно с введением воздуха, может разрушить мозг и привести к распространению тканей мозга через кровоток. Непроницающее оглушение (без пенетрации) больше не рассматривают в качестве альтернативы оглушению с проникновением (с пенетрацией). Незначительный риск можно ожидать от электронаркоза, но даже это не обеспечивает полную безопасность, потому что, в случае неудачи, животные, возможно, будут подвергнуты дополнительному оглушению. Методы оглушения должны быть описаны в процессе сбора крови КРС.

Если при убое скота в странах категории В возможен риск перекрестного заражения крови КРС тканью мозга, должны применяться такие меры безопасности как ограничение возраста скота и (или) уменьшение содержания инфекционных агентов в процессе производства.

Возраст

Для стран категории В в качестве меры безопасности для крови КРС и ее компонентов применяют ограничение возраста до 21 мес, если производство не предполагает существенного снижения содержания агентов ГЭ. Возрастное ограничение до 30 мес считается достаточным для компонентов крови, если значительное снижение содержания агентов ГЭ можно подтвердить, как описано ниже.

Снижение содержания ГЭ агентов в процессе производства

Возможность производственного процесса уменьшать и (или) устранять агенты ГЭ для компонентов крови должна быть оценена в экспериментальных исследованиях. Оценка может быть основана на собственных или литературных данных в случаях, когда можно показать их актуальность для конкретного производственного процесса. Если невозможно сделать вывод о сопоставимости способностей к снижению, производителям рекомендуется провести исследования по конкретным продуктам. Исследования с использованием биохимических анализов могут быть достаточными при наличии научных доказательств о корреляции анализов с данными об инфекционности. В исследованиях рисков, связанных с использованием крови, загрязненной тканями мозга, могут применяться препараты, полученные из головного мозга.

5.4. МАТЕРИАЛЫ ИЗ ТВЕРДОГО ЖИРА

Твердый жир получают из тканей подкожных, брюшных и межмышечных областей

и костей. В качестве исходного материала для изготовления производных жира используют твердый жир, соответствующий санитарным правилам, касающихся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для употребления человеком.

Безопасным в странах с неопределенным риском ГЭ КРС является жир с максимальным количеством нерастворимых примесей 0,15 % и продукты из такого жира. Материалы, полученные из такого твердого жира, глицерин и жирные кислоты, не представляют риск в отношении передачи ГЭ в случае использования в производственном процессе жестких условий обработки.

Материалы, произведенные при использовании следующих технологических процессов, будут соответствовать требованиям данного раздела, независимо от географического происхождения и природы тканей, из которых они получены:

- трансэтерификация или гидролиз при температуре не менее 200 °С в течение не менее 20 мин под давлением (производство глицерина, жирных кислот и сложных эфиров жирных кислот);
- омыление с помощью 12 М раствора натрия гидроксида (производство глицерина и мыла):
 - серийный процесс: при температуре не ниже 95 °С в течение не менее 3 ч;
 - непрерывный процесс: при температуре не ниже 140 °С под давлением в течение не менее 8 мин или эквивалентная обработка;
- перегонка при температуре 200 °С.

Производные твердых жиров, произведенные в соответствии с такими условиями, не представляют какого-либо риска в отношении передачи ГЭ и следовательно соответствуют требованиям данного раздела.

Производные твердых жиров, произведенные в других условиях, должны соответствовать требованиям данного раздела.

5.5. УГОЛЬ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Уголь животного происхождения получают путем обугливания тканей животных, таких как кости, при температуре выше 800 °С.

Исходный материал для производства угля животного происхождения должен соответствовать санитарным правилам, касающимся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для употребления человеком, при

отсутствии другого обоснования. Независимо от географического происхождения и природы ткани нормативные требования к углю животного происхождения должны быть рассмотрены в соответствии с данным разделом.

Уголь, произведенный в соответствии с описанными условиями, не представляет какого-либо риска в отношении передачи ГЭ и следовательно будет соответствовать требованиям данного раздела.

Уголь, произведенный в других условиях, должен соответствовать требованиям данного раздела.

5.6. МОЛОКО И МАТЕРИАЛЫ ИЗ МОЛОКА

В свете современных научных знаний и независимо от географического происхождения, молоко КРС не представляет никакого риска по заражению ГЭ.

Некоторые материалы, включая лактозу, экстрагируют из молочной сыворотки или остаточной жидкости при производстве сыра после свертывания (коагуляции). При коагуляции может использоваться сычужный фермент телят (экстракт сычуга) или сычужный фермент, полученный от других жвачных животных.

Производные коровьего молока, произведенные в описанных ниже условиях, не представляют риска ГЭ и следовательно соответствуют требованиям:

- молоко должно быть получено от здоровых животных в тех же условиях, что и молоко, пригодное для употребления человеком;

- никакие другие материалы от жвачных животных, за исключением сычужного фермента телят, не используют при получении таких производных (например, гидролизатов казеина с использованием панкреатических ферментов).

Производные молока, полученные другим способом или с использованием производных сычужного фермента от других видов жвачных животных, должны соответствовать требованиям данного раздела.

5.7. МАТЕРИАЛЫ ИЗ ШЕРСТИ

Материалы из шерсти и волос жвачных животных, такие как ланолин и ланолиновые спирты (спирты шерстяного воска), полученные из волос, должны соответствовать требованиям данного раздела при условии, что шерсть и волосы получены от живых животных.

Материалы из шерсти и волос умерщвленных жвачных животных, предназначенных для

употребления в пищу, не представляют какого-либо риска ГЭ, если получены с использованием в производственном процессе параметров рН, температуры и продолжительной обработки, соответствующих как минимум одному из указанных ниже условий:

- обработка при рН не менее 13 (первоначальная, соответствует концентрации натрия гидроксида не менее 0,1 М) при 60 °С в течение не менее 1 ч. Это происходит обычно на стадии щелочной обработки органического материала;

- молекулярная дистилляция при высокой температуре более 220 °С при пониженном давлении.

Материалы из шерсти, полученные в других условиях, должны соответствовать требованиям данного раздела.

5.8. АМИНОКИСЛОТЫ

Аминокислоты могут быть получены путем гидролиза материалов из различных источников.

Исходный материал для производства аминокислот должен отвечать санитарным правилам, касающимся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для потребления человеком, при отсутствии другого обоснования.

Аминокислоты не представляют риска ГЭ, если их производство включает следующие стадии технологического процесса:

- обработку материала при рН от 1 до 2, далее при рН не менее 11 с последующей термообработкой при 140 °С в течение 30 мин при давлении 3 бар;

- фильтрование полученных аминокислот после обработки;

- анализ чистоты проводится с помощью валидированной и чувствительной методики, позволяющей оценить содержание всех остаточных негидролизированных макромолекул в установленных допустимых пределах.

Аминокислоты, полученные в других условиях, должны соответствовать требованиям данной общей фармакопейной статьи.

5.9. ПЕПТОНЫ

Пептоны представляют собой частичные гидролизаты белка, полученные в результате ферментативного или кислотного расщепления.

Пептоны используют в микробиологических питательных средах для полноценного питания микроорганизмов, используемых в качестве посевного материала или в ферментерах промышленного масштаба для производства

лекарственных препаратов, в том числе вакцин для медицинского и ветеринарного применения. Существует значительный интерес в использовании растительного белка как альтернативы животного белка. Тем не менее:

– если в качестве источника белка используется желатин, он должен отвечать требованиям раздела 5.2 данной общей фармакопейной статьи;

– если в качестве источника белка используется казеин, он должен отвечать требованиям раздела 5.6 данной общей фармакопейной статьи;

– если в качестве источника белка используются ткани видов животных, подверженных ГЭ, их получают от животных, пригодных для употребления в пищу (см. раздел 2.4 данной общей фармакопейной статьи) с максимальным возрастом 30 мес для КРС из стран категории В. Для животных из стран категории А возраст животных практически не влияет на оценку риска.

ПРИЛОЖЕНИЕ. ОСНОВНЫЕ КАТЕГОРИИ ИНФЕКЦИОННОСТИ

Приведенная ниже таблица взята из документа Всемирной организации здравоохранения WHO Guidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies (2010).

Данные в таблице соответствуют следующему:

- + — наличие инфекционности или PrP^{TSE} ;
- — отсутствие определяемой инфекционности или PrP^{TSE} ;
- НИ — не исследовалось;
- НП — не применимо;
- ? — неопределенная интерпретация;
- () — ограниченные или предварительные данные;
- [] — данные об инфекционности или PrP^{TSE} основаны исключительно на биопробах на трансгенных (Tg) мышцах, экспрессирующих дополнительно ген PrP -кодирования, или методах амплификации PrP^{TSE} .

Таблица 2.3.19.3.-3. – Основные категории инфекционности тканей

Ткань	Крупный рогатый скот ГЭ КРС		Овцы и козы Скрейпи	
	инфекционность	PrP^{TSE}	инфекционность	PrP^{TSE}

Категория IA: Ткани с высокой инфекционностью

мозг	+	+	+	+
спинной мозг	+	+	+	+
сетчатка	+	НИ	НИ	+
зрительный нерв	+	НИ	НИ	+
спинальный ганглий	+	+	+	+
ганглий тройничного нерва	+	+	НИ	+
гипофиз	–	НИ	+	+
твердая мозговая оболочка	НИ	НИ	НИ	НИ

Категория IB: Ткани с низкой инфекционностью

периферические нервы	[+]	+	+	+
вегетативные ганглии	НИ	+	НИ	+

Таблица 2.3.19.3.-3. – Продолжение

Ткань	Крупный рогатый скот ГЭ КРС		Овцы и козы Скрейпи	
	инфекционность	<i>PrP^{TSE}</i>	инфекционность	<i>PrP^{TSE}</i>
лимфоретикулярные ткани				
селезенка	–	–	+	+
лимфатические узлы	–	–	+	+
миндалевидная железа	+	–	+	+
мигательная перепонка	+	–	[+]	+
тимус	–	НИ	+	+
пищеварительный тракт				
пищевод	–	НИ	[+]	+
рубец (только для жвачных животных)	–	НИ	[+]	+
желудок/сычуг	–	НИ	[+]	+
12-перстная кишка	–	–	[+]	+
тощая кишка	–	+	[+]	+
подвздошная кишка	+	+	+	+
аппендикс	НП	НП	НП	НП
толстая кишка/слепая кишка	–	–	+	+
прямая кишка	НИ	НИ	НИ	+
репродуктивные ткани				
плацента	–	НИ	+	+
яичник	–	НИ	–	–
матка	–	НИ	–	–
другие ткани				
молочная железа/вымя	–	НИ	–	+
кожа	–	НИ	–	+
жировая ткань	–	НИ	НИ	НИ
сердце/перикард	–	НИ	–	НИ
легкие	–	НИ	–	–
печень	–	НИ	+	–
почки	–	–	[+]	+
надпочечники	[+]	+	+	–
поджелудочная железа	–	НИ	+	НИ

Таблица 2.3.19.3.-3. – Продолжение

Ткань	Крупный рогатый скот ГЭ КРС		Овцы и козы Скрейпи	
	инфекционность	<i>PrP^{TSE}</i>	инфекционность	<i>PrP^{TSE}</i>
костный мозг	[+]	НИ	+	НИ
скелетные мышцы	[+]	НИ	[+]	+
язык	–	НИ	[+]	+
кровеносные сосуды	–	НИ	НИ	+
слизистая оболочка носа	–	НИ	+	+
слюнная железа	–	НИ	+	НИ
роговица	НИ	НИ	НИ	НИ
жидкости организма, секреты и выделения				
цереброспинальная жидкость	–	НИ	+	–
кровь	–	?	+	?
слюна	НИ	НИ	–	НИ
молоко	–	–	+	[+]
моча	–	НИ	–	–
фекалии	–	НИ	–	НИ
Категория IC: Ткани с неопределяемой инфекционностью				
репродуктивные ткани				
яички	–	НИ	–	–
предстательная железа/ придатки семенника/семенные канатики	–	НИ	–	–
сперма	–	НИ	–	–
плацентарная жидкость	–	НИ	НИ	НИ
плод	–	НИ	–	–
эмбрион	–	НИ	?	НИ
скелетно-мышечные ткани				
кость	–	НИ	НИ	НИ
сухожилие	–	НИ	НИ	НИ
другие ткани				
ткани десны	НИ	НИ	НИ	НИ
зубная пульпа	НИ	НИ	НИ	НИ
трахея	–	НИ	НИ	НИ
щитовидная железа	НИ	НИ	–	НИ

Таблица 2.3.19.3.-3. – Продолжение

Ткань	Крупный рогатый скот ГЭ КРС		Овцы и козы Скрейпи	
	инфекционность	<i>PrP^{TSE}</i>	инфекционность	<i>PrP^{TSE}</i>
жидкости организма, секреты и выделения				
молозиво	(–)	–	(?)	НИ
пуповинная кровь	–	НИ	НИ	НИ
пот	НИ	НИ	НИ	НИ
слезы	НИ	НИ	НИ	НИ
назальная слизь	НИ	НИ	НИ	НИ
желчь	НИ	НИ	НИ	НИ

203190004-2023

2.3.19.4. СТАДА КУР ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИН, НЕ СОДЕРЖАЩИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ПАТОГЕНОВ

Общая фармакопейная статья описывает требования к стадам кур, не содержащим определенных патогенов, и включает перечень патогенов, подлежащих контролю.

Цыплята, эмбрионы или культуры клеток, используемые при производстве или контроле качества вакцин, получают из яиц кур, не содержащих определенных патогенов (*specified pathogens free, SPF*) (далее – категория СПФ). Для подтверждения соответствия стада кур категории СПФ используют систему контроля, представленную в данной общей фармакопейной статье. Перечень определенных патогенов, подлежащих контролю, составлен с учетом современных знаний и при необходимости может обновляться.

Стадо кур категории СПФ содержат в одинаковых условиях с минимальным риском контаминации. Технический персонал не должен иметь контактов со стадами кур без категории. После присвоения стаду кур категории СПФ к нему не добавляют птиц, не имеющих соответствующей категории.

Стада кур категории СПФ нельзя размещать вблизи стад птиц без нее. Исключение составляют стада в процессе присвоения категории

или содержащиеся в помещениях и условиях, соответствующих категории СПФ. Стадо кур категории СПФ должно содержаться в изоляторе или в помещениях с фильтруемым воздухом и поддержанием разницы давления. В помещения не допускаются лица без соответствующего разрешения. Принимаются необходимые меры для предотвращения проникновения грызунов, диких птиц, насекомых.

Персонал, имеющий разрешение на вход в помещение, не должен иметь контактов с другими птицами или носителями инфекции, потенциально способными инфицировать стадо. Перед входом в помещения персоналу рекомендуют принять душ и переодеться или надеть защитную одежду.

По возможности предметы, которые вносят в помещение, стерилизуют. В частности, рекомендуется обрабатывать корм соответствующим образом для предотвращения контаминации нежелательными микроорганизмами. Используемая вода должна соответствовать требованиям к питьевой воде. У птиц из стада категории СПФ не применяют лекарственные препараты, которые могут препятствовать выявлению заболевания.

Сведения о здоровье стада постоянно регистрируют и любые отклонения расследуют. Основные параметры наблюдения включают заболеваемость, смертность, общее физическое состояние, потребление корма, ежедневная яйценоскость, выводимость цыплят и качество яиц. Записи сохраняют в течение 5 лет. О любых отклонениях или при обнаружении какой-либо инфекции сообщают потребителям яиц в возможно короткие сроки.

Таблица 2.3.19.4.-1. – Перечень патогенов, подлежащих контролю

Возбудитель	Методы исследования*	Вертикальный путь передачи	Распространение
Аденовирусы птиц, группа 1 (<i>Avian adenoviruses, group 1</i>)	РДП, ИФА	да	медленное
Вирус энцефаломиелита птиц (<i>Avian encephalomyelitis virus</i>)	РДП, ИФА	да	быстрое
Вирус инфекционного бронхита птиц (<i>Avian infectious bronchitis virus</i>)	РТГА, ИФА	нет	быстрое
Вирус инфекционного ларинготрахеита птиц (<i>Avian infectious laryngotracheitis virus</i>)	реакция нейтрализации вируса, ИФА	нет	медленное
Вирус лейкоза птиц (<i>Avian leucosis viruses</i>)	ИФА для вируса, реакция нейтрализации вируса, ИФА для антитела	да	медленное
Вирус нефрита птиц (<i>Avian nephritis virus</i>)	ИО	нет	медленное
Ортореовирусы птиц (<i>Avian orthoreoviruses</i>)	ИО, ИФА	да	медленное
Вирус ретикулоэндотелиоза птиц (<i>Avian reticuloendotheliosis virus</i>)	РДП, ИФА	да	медленное
Вирус анемии цыплят (<i>Chicken anaemia virus</i>)	ИО, ИФА, реакция нейтрализации вируса	да	медленное
Вирус синдрома снижения яйценоскости (<i>Egg drop syndrome virus</i>)	РТГА, ИФА	да	медленное
Вирус инфекционного бурсита птиц (<i>Infectious bursal disease virus</i>)	Серовар 1: РДП, ИФА, реакция нейтрализации вируса Серовар 2: реакция нейтрализации вируса	нет	быстрое
Вирус гриппа А (<i>Influenza A virus</i>)	РДП, ИФА, РТГА	нет	быстрое
Вирус болезни Марека (<i>Marek`s disease virus</i>)	РДП	нет	быстрое
Вирус болезни Ньюкасла (<i>Newcastle disease virus</i>)	РТГА, ИФА	нет	быстрое
Вирус ринотрахеита индеек (птиц) (<i>Turkey rhinotracheitis virus</i>)	ИФА	нет	медленное
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	РА и РТГА для подтверждения положительного результата, ИФА, РТГА	да	медленное
<i>Mycoplasma synoviae</i>	РА и РТГА для подтверждения положительного результата, ИФА, РТГА	да	быстрое
<i>Salmonella pullorum</i>	РА	да	медленное

Примечание.

РА – реакция агглютинации

РДП – реакция диффузной преципитации в геле (метод применим для еженедельных исследований)

ИФА – иммуноферментный анализ

РТГА – реакция торможения геагглютинации

ИО – иммуноокрашивание

* По согласованию с уполномоченным органом возможно использование других методов испытаний при условии, что они не менее чувствительные и специфичные, чем представленные в данной общей фармакопейной статье

Испытания, представленные в данной общей фармакопейной статье, должны обладать соответствующей специфичностью и чувствительностью к определенным сероварам вирусов. Испытуемые образцы отбирают случайным образом.

Положительный результат испытания на наличие вируса анемии цыплят не обязывает исключать использование материала, полученного из данного стада, однако живые вакцины для применения у птиц в возрасте менее 7 сут должны производиться с использованием материала от птиц с отрицательным результатом на вирус анемии цыплят. Инактивированные вакцины для применения у птиц в возрасте менее 7 сут могут быть произведены из материала, полученного от стада без отрицательного результата на вирус анемии цыплят при условии подтверждения инаktivации вируса анемии цыплят в процессе инаktivации вакцины.

СОЗДАНИЕ СТАДА КАТЕГОРИИ СПФ

Стада категории СПФ создают из птиц, проверка которых подтверждает отсутствие вертикально передающихся инфекций (возбудители инфекций приведены в таблице 2.3.19.4.-1).

Испытания проводят на двух поколениях птиц, предшествующих формированию стада категории СПФ. Процедуры присвоения и поддержания категории СПФ у стад кур приведены в таблице 2.3.19.4.-2.

Для формирования нового стада категории СПФ проводят ряд испытаний на трех поколениях птиц.

Все птицы в первом поколении до достижения возраста 20 нед должны быть проверены один раз на наличие группового антигена лейкоза птиц и на отсутствие антител к вирусу лейкоза птиц подтипов А, В и J с помощью иммуноферментного анализа или реакции нейтрализации вируса. Всех птиц также проверяют на отсутствие антител к инфекционным возбудителям, передающимся вертикально, согласно таблице 2.3.19.4.-1. Начиная с возраста 8 нед формируемые стада проверяют на отсутствие *Salmonella* spp. С этого периода проводят регулярные клинические наблюдения, чтобы подтвердить отсутствие симптомов инфекционных заболеваний. Методы анализа, используемые для оценки формируемого стада, указаны в таблице 2.3.19.4.-1, дополнительные рекоменда-

ции приведены в разделе по рутинным испытаниям стада категории СПФ.

Начиная с возраста 20 нед стада проверяют в соответствии с разделом *Рутинные испытания стада категории СПФ* данной общей фармакопейной статьи. Все процедуры присвоения и поддержания категории применяют к последующим двум поколениям, за исключением испытания каждой птицы на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем.

Стада категории СПФ формируются из третьего поколения птиц при условии, что результаты испытаний во всех трех поколениях стада показали отсутствие патогенных микроорганизмов.

Допускается доукомплектование стада молодняком от стад кур категории СПФ, полученным из другого стада этой же категории, содержащимся в отдельных помещениях на одной птицеферме. Начиная с возраста 8 нед стада подвергают испытаниям в соответствии с процедурами присвоения и поддержания категории.

ИСХОДНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ИСПЫТАНИЯМ ПОСЛЕДУЮЩИХ ПОКОЛЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СТАД КАТЕГОРИИ СПФ

Новое поколение для присвоения категории СПФ предварительно проверяют на отсутствие определенных патогенов при условии, что стадо доукомплектовано исключительно птицами из стада той же категории. В дополнение к испытаниям на наличие *Salmonella* и контролю общего состояния здоровья, начиная с возраста 8 нед, проводят дополнительные испытания. Испытания выполняют дважды с интервалом не менее 4 нед у 5 % птиц из стада (не менее 10 птиц и не более 200 птиц); птиц отбирают в возрасте от 12 нед до 16 нед и от 16 нед до 20 нед.

Образцы крови для анализа на наличие антител и подходящие образцы для проведения испытания на наличие вируса лейкоза отбирают и исследуют индивидуально. Используемые методики контроля выполняют в соответствии с указаниями раздела *Рутинные испытания стада категории СПФ* данной общей фармакопейной статьи. При результатах испытаний, подтверждающих отсутствие каких-либо инфекций, новому поколению присваивают категорию СПФ.

РУТИННЫЕ ИСПЫТАНИЯ СТАДА КАТЕГОРИИ СПФ

ОБЩИЙ ОСМОТР, АУТОПСИЯ И ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Клинические исследования проводят не реже одного раза в неделю в течение всего периода существования стада для подтверждения отсутствия вируса оспы домашней птицы и признаков какой-либо инфекции. В случае превышения уровня смертности более чем на 0,2 % в течение недели проводят аутопсию по возможности всех погибших птиц. При не-

обходимости для установления диагноза проводят гистологические, микробиологические и вирусологические исследования. Также проводят специальное исследование на наличие признаков туберкулеза. Гистологические образцы из мест поражения специфически окрашивают для определения микобактерий *Mycobacterium avium*. Содержимое слепой кишки всех погибших птиц по возможности подвергают микробиологическому исследованию на наличие *Salmonella* spp. При необходимости могут быть объединены образцы содержимого слепой кишки от 5 птиц.

Таблица 2.3.19.4.-2. – Описание процедуры присвоения и поддержания категории СПФ у стад кур

НОВЫЕ ПТИЦЫ (ПЕРВОЕ ПОКОЛЕНИЕ)	Подтверждают отсутствие возбудителей, передающихся вертикальным путем
	Проверяют всех птиц в возрасте до 20 нед жизни на отсутствие вируса лейкоза птиц и антител к нему
	Проводят испытания на наличие <i>Salmonella</i> spp. и общие клинические исследования у всех птиц, начиная с возраста 8 нед
	Проводят рутинные испытания на наличие определенных возбудителей у всех птиц, начиная с возраста 20 нед
ВТОРОЕ ПОКОЛЕНИЕ	Проводят испытания на отсутствие вируса лейкоза птиц и антител к нему у всех птиц в возрасте до 20 нед
	Проводят испытания на наличие <i>Salmonella</i> spp. и общие клинические исследования у всех птиц возраста, начиная с 8 нед
	Проводят рутинные испытания на наличие определенных возбудителей у всех птиц, начиная с возраста 20 нед
ТРЕТЬЕ ПОКОЛЕНИЕ	Проверяют на отсутствие вируса лейкоза птиц и антител к нему у всех птиц в возрасте до 20 нед
	Проводят испытания на наличие <i>Salmonella</i> spp. и общие клинические исследования у всех птиц, начиная с возраста 8 нед
ЕСЛИ РЕЗУЛЬТАТЫ ВСЕХ ИСПЫТАНИЙ СООТВЕТСТВУЮТ ТРЕБОВАНИЯМ, СТАДУ ПРИСВАИВАЮТ КАТЕГОРИЮ СПФ	
ТРЕТЬЕ ПОКОЛЕНИЕ	Проводят рутинные испытания на наличие определенных возбудителей у всех птиц, начиная с возраста 20 нед
	Проводят испытания после яйцекладки на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем
ПОСЛЕДУЮЩИЕ ПОКОЛЕНИЯ	Проводят испытания на отсутствие вируса лейкоза птиц и антител к определенным инфекционным возбудителям у 5 % птиц в возрасте от 12 нед до 20 нед дважды
	Проводят испытания на наличие <i>Salmonella</i> spp. и общие клинические исследования у всех птиц, начиная с возраста 8 нед
	Проводят рутинные испытания на наличие определенных инфекционных возбудителей у всех птиц, начиная с возраста 20 нед
	Проводят испытания после яйцекладки на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем

ИСПЫТАНИЕ НА НАЛИЧИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ SALMONELLA SPP.

Испытание на наличие *Salmonella* spp. проводят с использованием культурального метода на смывах из прямой кишки или испражнениях птиц или мазках, полученных с помощью ректального тампона. При анализе испражнений или смывов каждые 4 нед исследуют 60 образцов в течение всей жизни стада. Для проведения испытаний можно объединить до 10 образцов. При анализе мазков отбирают не менее двух образцов, испытания проводят каждые 4 нед в течение всей жизни стада. Для обнаружения *Salmonella* spp. образцы предварительно обогащают, затем культивируют на питательных средах, селективных для *Salmonella*.

ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ АНТИГЕНА ВИРУСА ЛЕЙКОЗА ПТИЦ

До начала яйцекладки проводят исследование ректальных смывов или образцов крови (высеивают светлый слой кровяного сгустка) на наличие специфических групповых антигенов лейкоза. Каждые 4 нед отбирают из стада 5 % птиц (не менее 10 птиц и не более 200 птиц). Во время яйцекладки для образцов белка отбирают 5 % яиц (не менее 10 яиц и не более 200 яиц) и проводят испытания каждые 4 нед. Испытания на наличие групповых специфических антигенов вируса лейкоза птиц проводят методом иммуноферментного анализа, используя методики, обеспечивающие обнаружение антигена подгрупп А, В и J.

ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ АНТИТЕЛ К ДРУГИМ ИНФЕКЦИОННЫМ ВОЗБУДИТЕЛЯМ

Испытания на наличие антител ко всем инфекционным возбудителям, перечисленным в таблице 2.3.19.4.-1, проводят в течение всего периода яйцекладки стада. Каждые 4 нед отбирают образцы у 5 % птиц стада (не менее 10 птиц и не более 200 птиц). Каждую неделю отбирают образцы у 1,25 % птиц стада, так как некоторые испытания на наличие отдельных возбудителей должны проводиться еженедельно. В таблице 2.3.19.4.-1 приводится классификация определенных возбудителей с быстрым или медленным распространением. На наличие медленно распространяющихся инфекций образец проверяют индивидуально. Для проверки наличия быстро распространяющихся инфек-

ций отбирают не менее 20 % образцов каждые 4 нед и проверяют по отдельности. При использовании реакции нейтрализации сыворотки или твердофазного иммуноферментного анализа все образцы могут быть исследованы индивидуально или объединением по 5 образцов, отобранных одновременно. Методы исследования, пригодные для обнаружения определенных возбудителей, приводятся в таблице 2.3.19.4.-1. По согласованию с уполномоченным органом возможно использование других методов исследований при условии, что они не менее чувствительные и специфичные, чем представленные в данной общей фармакопейной статье.

ИСПЫТАНИЯ, ПРОВОДИМЫЕ В КОНЦЕ ПЕРИОДА ЯЙЦЕКЛАДКИ

После последнего сбора яиц проводят заключительные испытания для подтверждения отсутствия возбудителей, передающихся вертикальным путем (таблица 2.3.19.4.-1). Для проведения испытаний после последнего сбора яиц не менее 5 % птиц из стада (не менее 10 птиц и не более 200 птиц) оставляют на срок не менее 4 нед. Образцы крови отбирают у каждой птицы стада в течение четырех недель, при этом не менее чем у 1,25 % птиц (25 % образцов) отбирают не ранее чем через 4 нед после заключительного сбора яиц. Образцы сыворотки проверяют на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем (таблица 2.3.19.4.-1). Если отбор образцов осуществляют еженедельно, исследованию в данный период подвергают не менее 1,25 % птиц (25 % образцов). В качестве альтернативы в течение 4 нед и после заключительного сбора яиц кровь и (или) другие подходящие для испытаний материалы отбирают не менее чем у 5 % птиц из стада и проверяют на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем, с помощью валидированных методик на основе амплификации нуклеиновых кислот (2.1.6.17).

МЕРЫ, ПРИНИМАЕМЫЕ ПРИ ОБНАРУЖЕНИИ ОПРЕДЕЛЕННОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ

Если обнаружено заражение стада возбудителем, относящимся согласно таблице 2.3.19.4.-1 к медленно распространяющимся, все материалы, полученные из стада в течение 4 нед, предшествующих дате отбора образца с наличием

возбудителя, считаются неудовлетворительными. Аналогично, если обнаружено заражение стада возбудителем, относящимся согласно таблице 2.3.19.4.-1 к быстро распространяющимся, все материалы, полученные из стада в течение 2 нед, предшествующих дате отбора образца с наличием возбудителя, считаются неудовлетворительными. Любой продукт, произведенный с использованием таких материалов и для которого обязательно использование кур категории СПФ, считают непригодным и бракуют; все испытания по контролю качества, проведенные с использованием таких материалов, являются недействительными.

Производители обязаны уведомить потребителей всех яиц об обнаружении заражения по возможности быстрее после вспышки эпидемии.

Стадо, у которого подтверждено инфицирование любым определенным возбудителем, не может в последующем получить категорию СПФ. Любое потомство, полученное от данного стада в течение или после периода 4 нед, предшествующего отбору последней отрицательной пробы, не может быть отнесено к категории СПФ.

203190005-2023

2.3.19.5. ИСХОДНОЕ СЫРЬЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМОЕ В ПРОИЗВОДСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ КЛЕТОЧНОЙ И ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Настоящая общая фармакопейная статья приводится для информации.

Общая фармакопейная статья содержит общие указания к качеству сырья биологического происхождения, используемого в производстве лекарственных средств клеточной и генной терапии для медицинского применения. Положения общей фармакопейной статьи не исключают использования альтернативных способов производства и методов его контроля. Производитель исходного сырья несет ответственность за его квалификацию (подтверждение пригодности для применения по назначению) в соответствии с указаниями данной

общей фармакопейной статьи. Пользователь исходного сырья несет полную ответственность за обеспечение надлежащего качества исходного сырья для конкретного использования по назначению.

Учитывая изменения профиля качества лекарственного средства для клеточной и генной терапии в процессе его фармацевтической разработки и клинических исследований качество исходного сырья оценивают в зависимости от этапа разработки. Безопасность пациентов должна быть обеспечена на ранней стадии клинического исследования. Цель состоит в том, чтобы иметь соответствующую стратегию квалификации исходного сырья при использовании в производстве лекарственных средств для клеточной и генной терапии. Следует отметить, что изменения в исходном сырье в течение жизненного цикла лекарственного средства для клеточной и генной терапии могут повлиять на качество лекарственного средства и, следовательно, потребовать дополнительных исследований для подтверждения сопоставимости. Влияние исходного сырья на качество, безопасность и эффективность лекарственного средства для клеточной и генной терапии определяют с использованием подходов, основанных на оценке риска. Исходное сырье используют при последовательном получении действующего (активного) вещества, активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата определенного качества с точки зрения биологической активности, профиля примесей, риска контаминации (бактериями, вирусами и др.), стабильности и др. С точки зрения оценки риска предпочтительнее не использовать сырье животного и человеческого происхождения.

Биологическое происхождение исходного сырья, используемого для производства лекарственных средств для клеточной и генной терапии, обуславливает особые требования к его качеству. В общей фармакопейной статье представлены примеры важнейших показателей качества, характерных для различных классов сырья.

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Общая фармакопейная статья распространяется на исходное сырье биологического происхождения, используемое в производстве лекарственных средств для клеточной и генной терапии для медицинского применения. Понятие «исходное сырье» относится к сырью, не предназначенному для вхождения в состав активной фармацевтической субстанции или действующего (активного) вещества, но используемого при их получении. Исходное сырье может быть выделено из различных биологических источников или получено с использованием технологии рекомбинантной ДНК (рДНК).

Общая фармакопейная статья применима к следующим классам исходного сырья:

- сыворотки и заменители сыворотки;
- белки, полученные с использованием технологии рДНК (например, факторы роста, цитокины, гормоны, ферменты и моноклональные антитела);
- белки, выделенные из биологического материала, (например, ферменты и поликлональные антитела);
- векторы.

Общие указания данной общей фармакопейной статьи могут быть применены к другим классам биологического сырья, в случае приемлемости.

2. ОЦЕНКА РИСКА

Оценку влияния исходного сырья биологического происхождения на качество и безопасность лекарственных средств для клеточной и генной терапии должен проводить пользователь сырья. Применение одного отдельного метода или их комбинации не может полностью гарантировать качество, функциональность и безопасность сырья для использования по целевому назначению. Оценка риска должна учитывать происхождение и прослеживаемость исходного сырья, соответствующий этап процесса производства, в котором оно использовалось, а также возможность производственного процесса контролировать или удалять исходное сырье из лекарственного средства.

Любой фактор риска должен быть оценен по соотношению «польза – риск», в том числе обусловленный исходным сырьем биологического происхождения. При оценке риска следует учитывать воздействие на пациента остаточных

количеств исходного сырья в лекарственном препарате с потенциально опасными эффектами (например, неблагоприятные иммунные реакции).

3. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ

3.1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ

Происхождение исходного сырья и при необходимости любых биологических материалов, использованных для производства сырья, должно быть известно. Особое внимание должно быть уделено рискам, связанным с источником материалов (включая их объединение), используемых для производства исходного сырья.

Исходное сырье можно разделить на следующие категории в зависимости от источника сырья и материалов, используемых для его производства:

- сырье животного или человеческого происхождения;
- сырье, произведенное с использованием материалов животного или человеческого происхождения;
- сырье, не содержащее материалов животного или человеческого происхождения.

Должна быть задокументирована прослеживаемость всего исходного сырья, при этом особое внимание необходимо уделить материалам, безопасность которых является неотъемлемым фактором безопасности лекарственного препарата, то есть материалам животного или человеческого происхождения.

В связи с риском передачи агентов губчатой энцефалопатии животных рекомендуется минимизировать использование сырья животного или человеческого происхождения. Если такое сырье необходимо для производства лекарственных препаратов для клеточной и генной терапии, принимают соответствующие меры для снижения риска передачи агентов инфекционных заболеваний, таких как вирусы, прионы, бактерии и простейшие.

Для получения крови и материалов из тканей человека можно привлекать только тщательно проверенных доноров, которые были надлежащим образом протестированы на наличие патогенных агентов. Кровь и материалы, полученные из тканей человека, должны соответствовать законодательству государств – членом Союза в сфере трансплантации, донорства крови и ее компонентов. Меры по прослеживаемости должны позволить отследить каждую донацию

от забора крови и биологического материала до исходного сырья и конечного продукта и в обратном направлении.

Животные, используемые для получения сырья, должны отвечать определенным санитарным требованиям, быть пригодными для употребления в пищу человеком и выращиваться в контролируемых условиях, если приемлемо. Если происхождение животных не полностью прослеживается (например, дикие животные), следует учитывать информацию об их географическом местоположении на момент отлова.

Если в качестве сырья используются векторы или белки, полученные с использованием технологии рДНК, необходимо проследить их происхождение до главного банка клеток или вирусного посевного материала.

Для всего исходного сырья животного или человеческого происхождения или произведенного с использованием материалов животного или человеческого происхождения проводят оценку вирусной контаминации в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи

2.3.1.3. Вирусная безопасность.

Объем испытаний для обеспечения вирусной безопасности зависит от результатов первоначальной оценки риска. Кроме того, проводят оценку риска в отношении передачи агентов губчатой энцефалопатии и принимают соответствующие меры для минимизации таких рисков согласно указаниям общей фармакопейной статьи 2.3.19.3. *Минимизация риска контаминации лекарственных средств инфекционными агентами прионных заболеваний.*

3.2. ПРОИЗВОДСТВО

Исходное сырье должно производиться в рамках надлежащей системы качества производственного процесса. Для гарантии контроля производственного процесса и стабильного выпуска сырья заданного качества осуществляют соответствующий внутрипроизводственный контроль. Показатели качества исходного сырья включают идентификацию, чистоту и биологическую активность, если приемлемо. Должны быть установлены соответствующие спецификации в отношении идентификации, испытаний, чистоты и профиля примесей. Производственный процесс должен быть оптимизирован таким образом, чтобы постоянно обеспечивать удаление посторонних агентов и опасных примесей или минимизировать их содержание, сохраняя

при этом заданное качество сырья. Это может быть достигнуто с помощью:

- использования валидированных процедур инактивации или очистки (например, стерилизация гамма-облучением или поддержание низкого рН в процессе хроматографии, если применимо);
- подтверждения способности производственного процесса минимизировать, удалять или инактивировать посторонние агенты или опасные примеси;
- испытаний на наличие посторонних агентов или опасных примесей.

Исходное сырье должно быть стерильным и произведено в асептических условиях и (или) подвергнуто финишной стерилизации, при отсутствии другого обоснования. Если исходное сырье нестерильно, должен быть известен уровень его микробиологической чистоты.

В исходном сырье могут быть использованы добавки, например, стабилизаторы. Если антибиотики и стабилизаторы биологического происхождения используют при производстве исходного сырья, необходимо обосновать их присутствие. Следует описать выбор, применение, качество и концентрацию добавок в исходном сырье, а также их влияние на само исходное сырье.

3.3. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К КАЧЕСТВУ

Исходное сырье должно отвечать заранее установленным требованиям к качеству в отношении идентификации, чистоты и биологической активности. Для подтверждения пригодности исходного сырья его предполагаемому использованию проводят испытания с применением соответствующих валидированных методик.

Испытание на подлинность должно выявить уникальность исходного сырья и его отличия от родственных или подобных соединений. Примеси включают производственные примеси (остаточные белки клетки-хозяина, остаточную ДНК клетки-хозяина и вектор, в случае рекомбинантных белков, а также другие биологические или химические вещества) и родственные примеси (агрегаты и продукты деградации). Содержание исходного сырья представляют как в абсолютном, так и относительном выражении. Для количественного определения содержания можно использовать испытания на биологическую активность.

3.3.1. Идентификация

Испытания на подлинность должны быть специфичными для конкретного исходного сы-

рья и основаны на особенностях молекулярной структуры и состава или других соответствующих физико-химических, биологических или иммунохимических свойствах. Методы, используемые при определении биологической активности или чистоты исходного сырья, также можно применить для его идентификации. Идентификация может быть проведена путем сравнения с соответствующим стандартным образцом или репрезентативной серией сырья.

3.3.2. Испытания

К исходному сырью применяются следующие испытания (см. также разделы данной общей фармакопейной статьи для конкретного исходного сырья).

Прозрачность и цветность раствора. Жидкое или восстановленное лиофилизированное сырье должно соответствовать пределам, установленным для конкретного исходного сырья в отношении степени опалесценции (2.1.2.1) и интенсивности окрашивания (2.1.2.2).

Время растворения. Лиофилизированное сырье должно полностью растворяться в указанном объеме восстанавливающего раствора в течение определенного времени и при определенной температуре, установленных для конкретного исходного сырья.

Осмоляльность (2.1.2.32). Значение осмоляльности должно соответствовать пределам, установленным для конкретного исходного сырья.

pH (2.1.2.3). Значение pH должно соответствовать пределам, установленным для конкретного исходного сырья.

Примеси элементов. Содержание примесей элементов не должно превышать пределы, установленные для конкретного исходного сырья.

Общий белок (2.1.5.14). Содержание общего белка должно соответствовать пределам, установленным для конкретного исходного сырья.

Родственные примеси. Содержание примесей, связанных с продуктом, не должно превышать пределы, установленные для конкретного исходного сырья.

Микробиологический контроль. Используемое исходное сырье в зависимости от природы должно выдерживать требования испытания на стерильность (2.1.6.1) или микробиологическую чистоту (2.1.6.6).

Вирусная контаминация. В зависимости от природы исходного сырья определяют соответствующую вирусную контаминацию.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предел, установленный для конкретного исходного сырья.

Микоплазмы. Исходное сырье не должно содержать микоплазм.

Стабилизатор. Содержание стабилизатора должно соответствовать пределам, установленным для конкретного исходного сырья, если применимо.

Вода (2.1.5.12). Содержание воды в исходном сырье в виде лиофилизата должно соответствовать пределам, установленным для конкретного исходного сырья.

3.3.3. Количественное определение

Содержание (например, содержание белка) или состав исходного сырья определяют с использованием подходящей валидированной методики.

Биологическую активность определяют с использованием подходящей валидированной методики. Биологическую активность выражают в пересчете на миллиграмм общего белка (удельная активность), если применимо (например, для ферментов). Биологическую активность рекомбинантного белка определяют, например, с помощью клеточной пролиферации, клеточной дифференцировки или определения ферментативной активности. Для конкретного белка может существовать несколько приемлемых биологических методик. Для антител можно использовать иммунологические анализы на основе клеток и испытания, основанные на связывании лигандов и аффинности.

3.3.4. Стандартный образец или стандартная серия

Для идентификации, количественного определения и других испытаний используют соответствующий стандартный образец, в качестве которого может быть утверждена репрезентативная серия исходного сырья. По возможности рекомендуется использовать утвержденные стандартные образцы, такие как стандартные образцы Фармакопеи Союза или международные стандартные образцы Всемирной организации здравоохранения.

3.4. ХРАНЕНИЕ

Должны быть установлены срок годности (срок хранения) и условия хранения исходного сырья.

3.5. МАРКИРОВКА

На этикетке указывают срок годности (срок хранения), условия хранения и использования, а также код, который может потребоваться для отслеживания, включая происхождение исходного сырья.

4. СЫВОРОТКИ И ЗАМЕНИТЕЛИ СЫВОРОТКИ

4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Сыворотки животного или человеческого происхождения и заменители сыворотки (включая лизаты тромбоцитов и другие добавки для роста неопределенного состава, кондиционированные среды, кровь и другие клеточные компоненты) используют в качестве добавок (компонентов) для роста культуры клеток. Сыворотки и заменители сыворотки, используемые для стимулирования клеточного роста, обычно представляют собой сложные биологические смеси, точный состав которых не всегда возможно определить. В связи с их сложным составом особое внимание необходимо уделять проверке постоянства и стабильности производства каждой серии.

Сыворотка крови крупного рогатого скота. При использовании сыворотки крови крупного рогатого скота она должна отвечать требованиям соответствующей частной фармакопейной статьи.

Сыворотка крови человека и лизаты тромбоцитов. Сыворотка крови человека и лизаты тромбоцитов, используемые в качестве исходного сырья для производства лекарственных препаратов для клеточной и генной терапии, могут быть получены из крови реципиента (аутологичные) или от другого индивидуума (аллогенные).

Кондиционированная среда. Кондиционированные среды, выделенные и очищенные из супернатанта культивируемых клеток, также могут быть использованы для увеличения пролиферации клеток за счет различных факторов роста и цитокинов, секретируемых клетками в культуральную среду.

Другие компоненты для роста с неопределенным составом. Клеточные и (или) тканевые лизаты могут быть использованы в качестве добавок для роста.

Композитная среда. Композитные среды содержат компоненты для роста, такие как сы-

воротка крови крупного рогатого скота, факторы роста и др. Принципы, описанные в данном разделе общей фармакопейной статьи, применимы к отдельным ингредиентам биологического происхождения и (или) биологически активным ингредиентам композитных сред.

4.2. ПРОИЗВОДСТВО

Перед использованием серии в качестве исходного сырья вследствие потенциальных различий в качестве между сериями сыворотки, клеточного или тканевого лизата необходимо подтвердить подходящими методами стабильность каждой серии.

Ввиду присущего риска передачи инфекционных агентов из объединенной плазмы, сывороток или других производных, полученных из объединенной аллогенной крови или плазмы человека, как правило, ограничивают количество объединяемых донаций, если только при производстве не используют надлежащие методы для инактивации или удаления вирусов. Для кондиционированных сред предпочтительна система посевных материалов (банков клеток). Необходимо обеспечить удаление клеток из среды и по возможности определить потенциальные примеси, происходящие из этих клеток.

4.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Общепризнано, что точный качественный состав сывороток и заменителей сыворотки трудно определить. Тем не менее, приблизительный состав белков в обоих случаях может быть установлен, например, с помощью электрофореза. Проводят испытания для определения общего белка или любых химических компонентов, если применимо. Для сыворотки крови человека электрофореграмма должна соответствовать образцу контрольной серии сыворотки. В качестве альтернативы подлинность может быть подтверждена путем сравнения содержания альбумина с его содержанием в соответствующей контрольной серии сыворотки. В качестве замены сравнения содержания альбумина с контрольной сывороткой можно использовать электрофореграмму белков или маркеры, секретируемые клетками или тромбоцитами. Человеческое происхождение устанавливают подходящим иммунохимическим методом (2.1.6.15), при отсутствии других указаний.

4.4. ИСПЫТАНИЯ

См. раздел 3.3.2 данной общей фармакопейной статьи.

Гемоглобин. Содержание гемоглобина не должно превышать предел, установленный для конкретного исходного сырья, если применимо.

Примеси клеточного происхождения. Содержание примесей клеточного происхождения не должно превышать пределы, установленные для конкретного исходного сырья, если применимо.

Испытания на вирусную контаминацию. Для сыворотки крови крупного рогатого скота применяют испытания на вирусную контаминацию, указанные в соответствующей частной фармакопейной статье. Для сыворотки крови человека применяют испытания на вирусную безопасность, указанные в соответствующей частной фармакопейной статье.

4.5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Сыворотки или заменители сыворотки должны обладать свойствами, способствующими росту клеток, в пределах, установленных для конкретного исходного сырья. Для подтверждения пригодности использования по целевому назначению может потребоваться более одного вида испытаний.

5. БЕЛКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ рДНК

5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Белки и пептиды, полученные с использованием технологии рДНК, применяемые в качестве исходного сырья, включают факторы роста, цитокины, гормоны, ферменты и моноклональные антитела.

Факторы роста, цитокины и гормоны. Вещества, используемые для стимуляции, инактивации, стимулирования роста или дифференцировки клеток в системах культивирования клеток.

Другие белки. Ферменты (например, коллагеназы) в качестве исходного сырья могут быть использованы для извлечения (экстракции) действующих (активных) веществ из тканей или жидкостей. Другие белки (например, фибронектин) могут быть использованы в качестве компонентов культуральной среды.

Моноклональные антитела. В качестве исходного сырья используют иммуноглобулины и фрагменты иммуноглобулина с определенной специфичностью. Антитела могут быть конъюгированными (химически модифицированными) или неконъюгированными. Стандартные химические модификации включают введение флуоресцентной метки и конъюгацию с магнитными микросферами. Антитела в качестве исходного сырья могут быть использованы для отбора, активации и (или) стимуляции, выделения или очистки клеток в культуре клеток.

5.2. ПРОИЗВОДСТВО

Производство белковых продуктов с использованием технологии рДНК основано на валидированной системе посевных материалов с использованием подходящей системы вектор/клетка-хозяин. В системе посева материала обычно используют главный банк клеток и, если применимо, рабочий банк клеток.

Рекомбинантный белок экстрагируют и очищают с помощью различных методов, таких как экстракция, преципитация, центрифугирование, концентрация, фильтрация и (или) хроматография. В процессе производства рекомбинантного белка производственные примеси, включая остаточную ДНК клетки-хозяина или ДНК вектора, остаточные белки клетки-хозяина, должны быть снижены до приемлемого уровня. Особое внимание следует уделять родственным примесям (примесям, связанным с продуктом).

5.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность устанавливают с помощью подходящих методов, например, электрофореза (2.1.2.30), пептидного картирования (2.1.2.39), изоэлектрического фокусирования (2.1.2.38) или высокоэффективной жидкостной хроматографии (2.1.2.28). Для антител идентификация основана на определении класса иммуноглобулинов, изоформа и (или) специфичности. Подходящими для идентификации также считаются иммунохимические методы (2.1.6.15) и определение активности (в качестве дополнения к вышеуказанным методам).

5.4. ИСПЫТАНИЯ

См. раздел 3.3.2 данной общей фармакопейной статьи.

Остаточные белки клетки-хозяина и остаточная ДНК клетки-хозяина или вектора. В случаях, когда это применимо к конкретному исходному сырью, содержание остаточных ДНК клетки-хозяина или вектора и (или) белка определяют с использованием подходящего метода, если только производственный процесс не был валидирован для подходящей очистки и их содержание не превышает пределы, установленные для конкретного исходного сырья.

Родственные белки. Родственные белки (например, поликлональные антитела с неопределенной специфичностью, гликоформы, продукты распада и окисления, олигомеры и агрегаты) определяют с использованием жидкостной хроматографии, электрофоретических или иммунологических методов. Их содержание не должно превышать пределы, установленные для конкретного исходного сырья.

5.5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Содержание. Количественное определение белка проводят с помощью подходящих методов, например, жидкостной хроматографии (2.1.2.28) или спектрофотометрии в ультрафиолетовой области (2.1.2.24).

Биологическая активность. Биологическую активность рекомбинантного белка определяют, например, с помощью клеточной пролиферации, клеточной дифференцировки или определения ферментативной активности. Для конкретного белка могут существовать несколько приемлемых биологических методик. Для антител можно использовать иммунологические анализы на основе клеток и испытания, основанные на связывании лигандов и аффинности. Активность выражают в пересчете на миллиграмм общего белка (удельная активность), если применимо.

6. БЕЛКИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Белки, выделенные из биологического материала и используемые в качестве исходного сырья, включают ферменты (например, трипсин и эндонуклеазы свиного происхождения), поликлональные антитела, другие белки (например, альбумин и трансферрин) и пептиды. Белки могут быть человеческого, животного, растительного или микробиологического происхождения.

Белки, выделенные из биологического материала, используют для стимулирования роста, дифференцировки или очистки культивируемых клеток и извлечения действующих (активных) веществ из тканей и (или) жидкостей.

6.2. ПРОИЗВОДСТВО

Белки выделяют из крови, тканей животных или человека, растительных или микробиологических источников с использованием механических и (или) химических методов. Затем их подвергают процессам очистки с использованием различных методов, например, центрифугирования, фильтрации, хроматографии и концентрирования. Поликлональные антитела получают путем иммунизации специфическим антигеном с последующей очисткой. Очистка антител включает селективное обогащение или специфическое выделение антител из сыворотки на основе физико-химического фракционирования, класс-специфического средства и (или) антиген-специфической аффинности. В процессе производства белков производственные примеси, такие как компоненты крови, фрагменты тканей или контаминирующие белки, должны быть снижены до приемлемого уровня. Особое внимание необходимо уделять родственными примесям (примесям, связанным с продуктом).

6.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность устанавливают с помощью подходящих методов, например, электрофореза (2.1.2.30), изоэлектрического фокусирования (2.1.2.38), пептидного картирования (2.1.2.39), жидкостной хроматографии (2.1.2.28) и иммунохимических методов (2.1.6.15).

6.4. ИСПЫТАНИЯ

См. раздел 3.3.2 данной общей фармакопейной статьи.

Производственные примеси. Вещества, выделенные из исходного материала (например, компоненты крови, фрагменты тканей или неродственные белки), определяют с использованием подходящих методов, а их содержание не должно превышать пределы, установленные для конкретного исходного сырья.

Родственные белки. Родственные белки (например, антитела с неопределенной специфичностью, продукты деградации и окисления, олигомеры и агрегаты) определяют с использо-

ванием подходящих методов, а их содержание не должно превышать пределы, установленные для конкретного исходного сырья.

6.5. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Содержание белка определяют с помощью подходящих методов, например, жидкостной хроматографии (2.1.2.28) или спектрофотометрии в ультрафиолетовой области (2.1.2.24).

Биологическая активность. В соответствующих случаях биологическую активность белка устанавливают, например, с помощью определения ферментативной активности, иммунологических испытаний или в испытаниях, основанных на пролиферации или дифференцировке клеток. Для трипсина испытание может быть проведено согласно указаниям соответствующей частной фармакопейной статьи. Активность выражают в пересчете на миллиграмм общего белка (удельная активность), если применимо.

7. ВЕКТОРЫ

Векторы, которые могут быть использованы в качестве исходного сырья для производства лекарственных средств для клеточной и генной терапии, включают ДНК-векторы (например, плазмиды, векторы на основе транспозонов), а также вирусные и бактериальные векторы (например, модифицированные виды *Lactococcus*). Векторы обычно рассматривают как исходные материалы, входящие в состав конечного продукта, и поэтому указания данной общей фармакопейной статьи к ним не применяются. Если векторы не предназначены для включения в состав конечного продукта и не являются исходным материалом (например, плазмиды-помощники или вирусы-помощники), следует придерживаться рекомендаций данной общей фармакопейной статьи и принципов производства и контроля качества, изложенных в общей фармакопейной статье предназначенной для лекарственных средств для медицинского применения с использованием доставки генов.

2.3.19.6. БЕЛКИ-НОСИТЕЛИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОНЬЮГИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Использование альтернативных белков-носителей, методов производства и испытаний приемлемо при условии, что они были разрешены уполномоченным органом.

Бактериальные полисахариды не способны индуцировать зависимый от Т-клеток иммунный ответ В-клеток, необходимый для ответной реакции иммунологической памяти, и, как правило, имеют слабую иммуногенность у детей в возрасте до двух лет. Данное ограничение преодолевается конъюгированием полисахаридов с белками-носителями. Высоко иммуногенные белки-носители, конъюгированные с бактериальными полисахаридами, увеличивают способность полисахаридов вызывать защитную ответную реакцию у иммунизированных.

В качестве белков-носителей в полисахаридных вакцинах используют: анатоксины, нетоксичные мутантные токсины, поверхностные или другие мембранные белки, выделенные из микроорганизмов. Микроорганизмы, используемые при их производстве, могут иметь генетически модифицированное происхождение.

Метод производства, используемый для белков-носителей, должен обеспечивать постоянство получаемых серий белков-носителей, подходящих для конъюгации с полисахаридными антигенами.

Перед конъюгацией с полисахаридом могут быть установлены соответствующие критерии приемлемости низкой бионагрузки. Обязательным условием является фильтрация белка-носителя перед хранением через фильтр, задерживающий бактерии, и принятие соответствующих мер для предотвращения контаминации и роста микроорганизмов во время хранения.

Производство белков-носителей основывается на системе посевного материала. Должно быть подтверждено отсутствие контаминации посевного материала с использованием подходящего метода с соответствующей чувствительностью. При необходимости культуру микроорганизмов инактивируют, белки-носители очищают подходящим методом.

Белки-носители характеризуют одним или более подходящими методами (например, электрофорез в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом, изоэлектрическое фокусирование, высокоэффективная жидкостная хроматография, эксклюзионная хроматография с детекцией многоугольного лазерного рассеивания, аминокислотный анализ, аминокислотное секвенирование, круговой дихроизм, флуоресцентная спектрометрия, пептидное картирование, масс-спектрометрия). Чистоту белков подтверждают подходящим методом. Для подтверждения, что продукт не содержит специфических токсинов, где это применимо, выполняют соответствующее испытание в процессе валидации или рутинного анализа. В случае необходимости этапа очистки проводят мониторинг удаления отдельных производственных примесей для подтверждения постоянства процесса очистки. В случае использования рекомбинантных белков-носителей выполняют испытания, как минимум, для следующих примесей:

- остаточные белки клетки-хозяина, включая белковые остатки экспрессионного вектора;
- остаточная ДНК клетки-хозяина.

Для приготовления конъюгатов могут быть использованы только белки-носители, выдерживающие следующие испытания.

Идентификация. Для подтверждения подлинности белка-носителя используют подходящий метод.

pH (2.1.2.3). Если применимо, проводят испытание белка-носителя до конъюгирования на соответствие пределам, одобренным уполномоченным органом.

Содержание белка. Содержание белка-носителя определяют с использованием подходящего метода на соответствие пределам одобренным, уполномоченным органом.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов определяют на соответствие пределам, одобренным уполномоченным органом.

Кроме того, к белкам-носителям применяют следующие требования.

Дифтерийный анатоксин. Дифтерийный анатоксин, произведенный как описано в частной фармакопейной статье на вакцину для профилактики дифтерии адсорбированную, должен выдерживать требования указанной частной фармакопейной статьи для нерасфасованного очищенного анатоксина, за исключением испытания на стерильность.

Столбнячный анатоксин. Столбнячный анатоксин, произведенный как описано в частной фармакопейной статье на вакцину для профилактики столбняка адсорбированную, должен выдерживать требования указанной частной фармакопейной статьи для нерасфасованного очищенного анатоксина, за исключением того, что антигенная чистота допускается не менее 1500 Lf на миллиграмм белкового азота, и испытание на стерильность не требуется.

Дифтерийный белок CRM 197. Дифтерийный белок CRM 197 производят при культивировании генетически модифицированных (C7/β197) или немодифицированных (mCRM) микроорганизмов *Corynebacterium diphtheriae*, или получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК, используя в качестве продуцентов, например, генетически модифицированные штаммы *Escherichia coli*. Супернатант культуры клеток может быть сконцентрирован ультрафильтрацией и очищен путем последовательных стадий осаждения, фильтрации и хроматографирования. В случае, когда дифтерийный белок CRM 197 производится на той же производственной площадке, что и дифтерийный токсин, он должен иметь отличия от активного токсина, четко определяемые подходящим методом. Чистота дифтерийного белка CRM 197 должна быть не менее 90 %.

Поверхностный мембранный белковый комплекс *Neisseria meningitidis* группы В. Поверхностный мембранный белковый комплекс *Neisseria meningitidis* группы В выделяют из бактериальной клеточной культуры с использованием буферного раствора, содержащего детергент. Первым удаляют клеточный дебрис. Мембранный белковый комплекс может быть сконцентрирован и очищен последовательно фильтрацией и дополнительными подходящими стадиями очистки. Содержание липополисахаридов не должно превышать 8 %. Относительное количество основных поверхностных мембранных белков должно быть утверждено уполномоченным органом. Поверхностный мембранный белковый комплекс должен выдерживать испытание на пирогенность (2.1.6.2): каждому кролику вводят по 0,25 мкг поверхностных мембранных белков на килограмм массы тела.

Рекомбинантный белок D. Белок D – поверхностный белок нетипичной *Haemophilus influenzae*. Его получают, используя генетиче-

ски модифицированный штамм *E. coli*, несущий плазмиду с последовательностью, кодирующей белок D. Для активации экспрессии белка D, модифицированный штамм культивируют

в подходящей жидкой питательной среде. В конце культивирования выполняют стадию очистки. Чистота белка D должна быть не менее 95 %.

2.3.20. РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ

203200001-2023

Вирусная безопасность.

2.3.20.1. ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕКУРСОРЫ ДЛЯ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Общая фармакопейная статья устанавливает общие требования к химическим прекурсорам, предназначенным для производства или изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Химические прекурсоры для радиофармацевтических лекарственных препаратов (химические прекурсоры) представляют собой нерадиоактивные вещества, полученные путем химического синтеза и предназначенные для химического связывания с радионуклидом в процессе производства или изготовления радиофармацевтического лекарственного препарата.

Если химический прекурсор, не описанный в частной фармакопейной статье, используют для радиофармацевтического лекарственного препарата, изготовленного для особых потребностей отдельных пациентов, необходимость соответствия его требованиям данной общей фармакопейной статьи должна решаться, исходя из оценки риска.

Такая оценка риска включает:

- качество химического прекурсора и информацию, необходимую для оценки его качества;
- любые процедуры последующей обработки после введения радиоактивной метки (которая может включать или не включать очистку перед применением);
- количество, использованное для приготовления дозы (главным образом, для диагностического или терапевтического применения), и частоту введения пациенту.

Если химические прекурсоры производят с использованием веществ, полученных от человека или животных, должны применяться требования общей фармакопейной статьи 2.3.1.3.

Если химические прекурсоры получают от животных, восприимчивых к возбудителям губчатой энцефалопатии, за исключением экспериментальных целей, они должны соответствовать, если применимо, требованиям общей фармакопейной статьи 2.3.19.2. *Продукты с риском передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных.*

ПРОИЗВОДСТВО

Химические прекурсоры получают с помощью разработанных процедур, обеспечивающих постоянство качества продукции и ее выпуск в соответствии с требованиями частной фармакопейной статьи или утвержденных спецификаций. Химические прекурсоры должны производиться в рамках соответствующей системы качества.

СВОЙСТВА

Положения данного раздела частной фармакопейной статьи (например, относящиеся к растворимости или температуре плавления) не могут рассматриваться в качестве аналитических требований и носят информационный характер.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Для подтверждения подлинности химических прекурсоров применяют подходящие аналитические методы, например, спектрометрию ядерного магнитного резонанса, инфракрасную спектrophотометрию, масс-спектрометрию и хроматографические методы.

ИСПЫТАНИЯ

Родственные примеси. При отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье или обоснования и разрешения уполномоченного органа органические примеси, присутствующие в химических прекурсорах, и неорганические примеси, присутствующие в неорганических химических прекурсорах, должны подлежать информированию, иденти-

фикации и контролю в соответствии с нижеприведенными значениями:

- порог информирования 0,2 %;
- порог идентификации 2,0 %;
- общее содержание неспецифицированных примесей не более 3,0 %.

Для сильнодействующих примесей или примесей, способных вызывать токсическое или недопустимое фармакологическое действие, могут устанавливаться особые пороговые значения.

Если в частной фармакопейной статье не предусмотрен соответствующий контроль новой примеси, должно быть разработано и включено в спецификацию качества химического прекурсора подходящее испытание для ее контроля.

Остаточные органические растворители.

Содержание остаточных органических растворителей ограничивают в соответствии с указаниями общей фармакопейной статьи 2.3.2.0. *Остаточные органические растворители* с использованием метода, приведенного в общей фармакопейной статье 2.1.4.19. *Идентификация и контроль остаточных растворителей*, или другого подходящего метода.

Растворители класса 1 не должны применяться на последней стадии процесса производства химических прекурсоров. Если их использования на более ранней стадии процесса производства избежать не удастся, применяют пределы, указанные в таблице 2.3.2.0.-3 общей фармакопейной статьи 2.3.2.0. *Остаточные органические растворители*.

Предельное содержание растворителей классов 2 и 3, основанное на значениях допустимого суточного воздействия, не должно превышать 0,5 %.

Для растворителей классов 2 и 3 допускается определение потери в массе при высушивании или определение отдельного растворителя. Если для растворителей указанных классов обоснованный и разрешенный уполномоченным органом предел содержания составляет более 0,5 %, требуется определение каждого растворителя по отдельности.

Примеси элементов. Если известно или предполагается, что при производстве химических прекурсоров применение металлических катализаторов или металлосодержащих реактивов приводит к присутствию остаточных металлов, содержание каждого из них (Pt, Pd,

Ir, Rh, Ru, Os, Mo, Ni, Cr, V, Pb, Hg, Cd и Tl) в химических прекурсорах должно соответствовать пределу 0,01 % при отсутствии более жестких пределов, установленных в частной фармакопейной статье.

По возможности применяют методологию, описанную в общей фармакопейной статье 2.1.4.23. *Определение примесей элементов*.

Микробиологическая чистота. Общее число аэробных микроорганизмов должно быть не более 10^3 КОЕ на грамм нерасфасованной продукции или не более 10^2 КОЕ в расчете на однодозовую и (или) многодозовую упаковку химического прекурсора (2.1.6.6).

Общее число дрожжей и грибов должно быть не более 10^2 КОЕ на грамм нерасфасованной продукции или не более 10^1 КОЕ в расчете на однодозовую и (или) многодозовую упаковку химического прекурсора (2.1.6.6).

Бактериальные эндотоксины. При отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа предельное содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать 100 МЕ на грамм нерасфасованной продукции или не более 10 МЕ в расчете на однодозовую и (или) многодозовую упаковку химического прекурсора (2.1.6.8. *Бактериальные эндотоксины*)

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

При отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа содержание химических прекурсоров определяют с использованием подходящего метода.

ХРАНЕНИЕ

Химические прекурсоры хранят в воздухо- непроницаемой упаковке в условиях, обеспечивающих надлежащую стабильность.

МАРКИРОВКА

Маркировка химических прекурсоров должна соответствовать требованиям права Союза и содержать необходимую информацию. На этикетке указывают назначение в качестве химического прекурсора для радиофармацевтических лекарственных препаратов. В сопроводительной информации может быть рекомендовано испытание промышленных серий химического

прекурсора перед использованием в производстве или изготовлении радиофармацевтических лекарственных препаратов, обеспечивающее получение из них в указанных условиях радиофармацевтического лекарственного препарата в необходимом количестве и требуемого качества.

203200002-2023

2.3.20.2. РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Радиофармацевтические лекарственные препараты представляют собой лекарственные препараты, содержащие в готовой для применения лекарственной форме один или несколько радионуклидов (радиоактивных изотопов) в качестве действующего вещества или в составе действующего вещества.

Общая фармакопейная статья включает также следующие понятия.

Радионуклидный генератор – любая система, включающая фиксированный первичный (материнский) радионуклид, из которого образуется вторичный (дочерний) радионуклид, извлекаемый путем элюирования или другим способом и используемый для получения радиофармацевтического лекарственного препарата.

Радиофармацевтический набор – лекарственный препарат, который подлежит восстановлению или химическому связыванию с радионуклидами для получения радиофармацевтического лекарственного препарата, как правило, перед его применением. Радиофармацевтический набор содержит необходимые компоненты для приготовления радиофармацевтического лекарственного препарата за исключением радионуклида.

Радионуклидный (радиофармацевтический) прекурсор – любой радионуклид, предназначенный для введения радиоактивной метки в другое вещество перед его применением. Радионуклидные прекурсоры могут выпускаться в виде растворов для радиоактивной метки.

Нуклид является видом атома, характеризующегося числом протонов и нейтронов в ядре (т.е. его атомным номером Z и массовым чис-

лом A), а также в ряде случаев энергетическим состоянием ядра. Изотопы элемента представляют собой нуклиды с одинаковым числом протонов, но различным количеством нейтронов, т.е. имеют одинаковый атомный номер, но различные массовые числа. Нуклиды, содержащие нестабильные комбинации протонов и нейтронов, с постоянной статистической вероятностью самопроизвольно превращаются в стабильные или другие нестабильные комбинации протонов и нейтронов. Такие нуклиды являются радиоактивными и называются радионуклидами. Первичный нестабильный нуклид называют материнским радионуклидом, а образующийся нуклид (вторичный нуклид) – дочерним.

Распад или превращение радионуклидов может вызывать испускание заряженных частиц, электронный захват или изомерный переход. Заряженные частицы, испускаемые ядром, могут представлять собой альфа-частицы (ядра ${}^4\text{He}$) или бета-частицы (отрицательно заряженные, обычно называемые электронами, или положительно заряженные, обычно называемые позитронами). Альфа-распаду обычно подвергаются тяжелые ядра ($Z > 82$). Радионуклиды с дефицитом протонов обычно распадаются с испусканием электронов. Радионуклиды с дефицитом нейтронов обычно распадаются путем электронного захвата или с испусканием позитронов. В последнем случае радионуклиды называют позитрон-излучателями. Позитроны аннигилируются при взаимодействии с электронами в окружающем материале. Аннигиляция приводит к испусканию двух гамма-квантов с энергией 0,511 МэВ каждый, обычно разлетающихся под углом 180° друг к другу (аннигиляционное излучение). Все пути распада могут сопровождаться гамма-излучением. Гамма-излучение может частично или полностью замещаться выходом электронов, известных как внутренние конверсионные электроны. Данное явление, подобное процессу электронного захвата, приводит к возникновению вторичного рентгеновского излучения (вследствие перегруппировки электронов в атоме). Вторичное излучение может частично замещаться выходом электронов, называемых электронами Оже.

Радиоактивность (активность) – термин, обычно используемый для описания явления радиоактивного распада и количественного выражения данного процесса.

Радиоактивность лекарственного препарата определяют количеством ядерных распадов или превращений в единицу времени.

В Международной системе единиц (СИ) радиоактивность выражают в единицах «беккерель» (Бк): 1 Бк равен одному ядерному распаду в секунду.

Обнаружение и измерение радиоактивности проводят в соответствии с указаниями общей фармакопейной статьи 2.1.2.43. *Обнаружение и измерение радиоактивности.*

Измерение абсолютной радиоактивности выполняют только в специализированных лабораториях, однако идентификация и количественное измерение радиоактивности могут проводиться относительным способом путем сравнения со стандартизированными препаратами, которые предоставляются лабораториями, признанными уполномоченным органом, или с использованием поверенного или калиброванного оборудования.

Радиоактивный распад – изменение состава или внутреннего строения нестабильных атомных ядер путем испускания элементарных частиц, гамма-квантов и (или) ядерных фрагментов, протекающее по экспоненциальному закону.

Кривая экспоненциального распада (кривая распада) описывается следующим выражением:

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t}$$

где: A_t — радиоактивность при времени t ;
 A_0 — радиоактивность при времени $t = 0$;
 λ — постоянная радиоактивного распада, характерная для каждого радионуклида;
 e — основание натурального логарифма.

Период полураспада ($T_{1/2}$) – промежуток времени, в течение которого радиоактивность радионуклида уменьшается вдвое от ее первоначального значения.

Период полураспада связан с постоянной радиоактивного распада (λ) следующим уравнением:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

Уравнение экспоненциального распада может также выражаться в следующем виде, при-

годном для быстрой оценки радиоактивности, оставшейся после истечения времени t :

$$A_t = A_0 \left(\frac{1}{2} \right)^{\frac{t}{T_{1/2}}}$$

Проникающая способность каждого вида излучения существенно зависит от его природы и энергии. Альфа-частицы полностью поглощаются слоем материала от нескольких микрометров до нескольких десятков микрометров. Бета-частицы полностью поглощаются слоем материала от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров. Гамма-излучение полностью не поглощается, а лишь ослабевает. Например, для ослабления интенсивности излучения в 10 раз может потребоваться пластина свинца толщиной несколько сантиметров. С увеличением плотности материала уменьшается область проникновения альфа- и бета-частиц и больше ослабляется гамма-излучение.

Каждый радионуклид характеризуется неизменным периодом полураспада, выраженным в единицах времени, природой и энергией излучения (излучений). Энергию выражают в электронвольтах (эВ), килоэлектронвольтах (кэВ) или мегаэлектронвольтах (МэВ).

Радионуклидная чистота – отношение радиоактивности основного радионуклида к общей радиоактивности радиофармацевтического лекарственного препарата, выраженное в процентах. Возможные радионуклидные примеси и их допустимые пределы содержания указываются в частных фармакопейных статьях.

Радиохимическая чистота – отношение радиоактивности радионуклида, присутствующего в радиофармацевтическом лекарственном препарате в заявленной химической форме, к общей радиоактивности радионуклида в радиофармацевтическом лекарственном препарате, выраженное в процентах. Возможные радиохимические примеси и их допустимые пределы содержания указываются в частных фармакопейных статьях.

Химическая чистота контролируется путем установления допустимых пределов содержания химических примесей, указанных в частных фармакопейных статьях, и (или) нормативных документах по качеству, и (или) спецификациях.

Изотопный носитель – стабильный изотоп данного элемента, присутствующий или до-

бавленный в радиофармацевтический лекарственный препарат в той же химической форме, что и сам радионуклид.

Лекарственный препарат без носителя – лекарственный препарат, не содержащий стабильных изотопов того же элемента, что и радионуклид, присутствующий в лекарственном препарате в заявленной химической форме или положении в данной молекуле.

Лекарственный препарат без добавления носителя – лекарственный препарат, в который преднамеренно не добавлены стабильные изотопы того же элемента, что и радионуклид в заявленной химической форме или положении в данной молекуле.

Удельная радиоактивность – радиоактивность радионуклида, выраженная на единицу массы элемента или его химической формы. Удельную радиоактивность выражают в единицах «беккерель на грамм» (Бк/г).

Молярная радиоактивность – радиоактивность радионуклида, выраженная на единицу количества вещества элемента или его химической формы. Молярную радиоактивность выражают в единицах «беккерель на моль» (Бк/моль).

Радиоактивная концентрация – радиоактивность радионуклида, выраженная на единицу объема или массы радиофармацевтического лекарственного препарата. Для радиофармацевтических лекарственных препаратов в виде растворов радиоактивную концентрацию выражают величиной радиоактивности на единицу объема радиофармацевтического лекарственного препарата, т.е. в виде объемной радиоактивности.

Общая радиоактивность – радиоактивность радионуклида, выраженная на единицу формы выпуска радиофармацевтического лекарственного препарата (флакон, капсула, ампула, генератор и др.).

ПОЛУЧЕНИЕ РАДИОНУКЛИДОВ

Радиофармацевтический лекарственный препарат содержит радионуклид в виде:

- элемента в атомной или молекулярной форме, например, ^{133}Xe , ^{15}O О₂;
- иона, например, ^{131}I йодид, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ пертехнетат;

- структурной единицы, включенной в состав вещества, адсорбированной на нем или связанной с органическими молекулами путем образования хелатного комплекса, например,

^{111}In индия оксина или ковалентного соединения, например, 2- ^{18}F фтор-2-дезоксид-Д-глюкозы.

Радионуклиды могут быть получены следующими основными способами:

- в реакциях с нейтронами (облучение мишеней в ядерных реакторах);

- в реакциях с заряженными частицами (облучение мишеней в ускорителях, в частности, циклотронах);

- путем выделения из радионуклидных генераторов.

Вероятность возникновения ядерной реакции зависит от природы и энергии бомбардирующих частиц (протонов, нейтронов, дейтронов и др.) и от природы облучаемых ими ядер. Скорость образования (выход) данного радионуклида в результате облучения зависит, кроме того, от изотопного состава материала-мишени и его химической чистоты, а в случае нейтронов – от их потока, в случае заряженных частиц – от тока пучка.

Помимо описываемой ядерной реакции обычно могут происходить побочные превращения. Вероятность их протекания определяется факторами, изложенными выше. Такие побочные превращения могут приводить к увеличению радионуклидных примесей.

Ядерная реакция (превращение) может быть указана в следующей форме: «ядро-мишень (бомбардирующая частица, испускаемая частица или излучение) полученные ядра». Например: $^{58}\text{Fe}(n, \gamma)^{59}\text{Fe}$, $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$.

ОБЛУЧЕНИЕ НЕЙТРОНАМИ

Облучение стабильных радионуклидов в ядерных реакторах обычно приводит к возникновению ядер с дефицитом протонов, т.е. электрон-излучателей, которые образуются в (n, γ)-реакциях (реакциях радиационного захвата). Продукт реакции представляет собой изотоп элемента мишени и поэтому может содержать значительное количество носителя.

Некоторые нуклиды с высоким атомным номером обладают свойством деления ядра под действием нейтронов. Ядерное деление, обозначаемое как (n, f)-реакция, приводит к образованию большого количества радионуклидов с разной массой и периодом полураспада. Наиболее часто используемой реакцией является реакция деления ^{235}U . Путем облучения ^{235}U

в ядерных реакторах и выделения из смеси более 200 образующихся в данном процессе радионуклидов могут быть получены йод-131, молибден-99 и ксенон-133.

ОБЛУЧЕНИЕ ЗАРЯЖЕННЫМИ ЧАСТИЦАМИ

Облучение стабильных радионуклидов заряженными частицами обычно приводит к возникновению ядер с дефицитом нейтронов, которые распадаются или путем электронного захвата, или за счет испускания позитронов. Они образуются, в частности, в (p, xn) -реакциях, где x – число испускаемых нейтронов. Продукт не является изотопом элемента мишени, а его удельная радиоактивность может быть близкой удельной радиоактивности лекарственного препарата без носителя.

РАДИОНУКЛИДНЫЕ ГЕНЕРАТОРЫ

В системах радионуклидных генераторов используют первичный (материнский) нестабильный радионуклид, который распадается с образованием вторичного (дочернего) радионуклида обычно с более коротким периодом полураспада.

Отделяя вторичный радионуклид от первичного нестабильного с помощью химических или физических процессов, можно использовать вторичный радионуклид на значительном расстоянии от места производства радионуклидного генератора, несмотря на его короткий период полураспада.

МАТЕРИАЛЫ МИШЕНЕЙ

Изотопный состав и чистота материала мишени в совокупности с другими факторами, например, природой и энергией бомбардирующих частиц, определяют соотношение в процентах основного радионуклида и радионуклидных примесей. Использование искусственно обогащенного изотопами материала мишени со значительным избытком необходимого нуклида-мишени, позволяет повысить выход реакции и чистоту целевого радионуклида.

Химическая форма, чистота, физическое состояние материала мишени и химические добавки, а также условия облучения, физическая и химическая среда определяют химическое состояние и химическую чистоту получаемых

радионуклидов. При получении радионуклидов и, в частности, радионуклидов с коротким периодом полураспада, перед дальнейшей их обработкой и производством радиофармацевтических лекарственных препаратов не всегда возможно определить какой-либо из показателей качества. Поэтому качество каждой серии материала мишени оценивают перед ее использованием в серийном процессе получения радионуклида и производстве радиофармацевтических лекарственных препаратов.

Материал мишени помещают в держатель в газообразном, жидком или твердом состоянии для облучения пучком частиц. Для облучения нейтронами материал мишени обычно помещают в кварцевые ампулы или контейнеры из алюминия или титана высокой чистоты. Необходимо установить, что взаимодействие между контейнером и его содержимым не происходит в условиях облучения.

Для облучения заряженными частицами держатель материала мишени изготавливают из подходящего металла, по возможности, с входом и выходом, окруженным охлаждающей системой и, как правило, с окном-мишенью из тонкой металлической фольги.

Для оценки влияния всех условий на эффективность получения радионуклида по качеству и количеству в процессе получения должны быть точно описаны и учтены следующие факторы:

- материал мишени;
- конструкция держателя материала мишени;
- метод облучения;
- метод выделения требуемого радионуклида.

СВОЙСТВА

Наиболее общие физические характеристики радионуклидов, входящих в состав радиофармацевтических лекарственных препаратов и описываемых в частных фармакопейных статьях, приводятся в Приложении 4.2. *Физические характеристики радионуклидов, указанных в Фармакопее Евразийского экономического союза*. Кроме того, в Приложении указываются физические характеристики основных радионуклидных примесей, возможных в радионуклидах, описываемых в частных фармакопейных статьях.

Под вероятностью перехода (распространенность) подразумевают вероятность превра-

щения ядра в данном энергетическом состоянии посредством соответствующего перехода.

Под вероятностью излучения подразумевают вероятность испускания атомом радионуклида соответствующих частиц или лучей.

Независимо от значения используемых терминов вероятность обычно выражают в процентах.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Радионуклид, как правило, идентифицируют по его периоду полураспада, или природе и энергии его излучения (излучений), или обоими способами в соответствии с указаниями частной фармакопейной статьи.

Приблизительный период полураспада – период полураспада, определяемый в течение относительно короткого промежутка времени, предназначенный для подтверждения подлинности радиофармацевтического лекарственного препарата и позволяющий получить разрешение на его выпуск в обращение.

Рассчитанное значение приблизительного периода полураспада должно находиться в диапазоне значений, указанном в частной фармакопейной статье.

Определение природы и энергии излучения. Природу и энергию излучения определяют методом спектрометрии. Для позитрон-излучателей природу и энергию излучения обычно не определяют; их идентификацию проводят путем определения периода полураспада и по спектру гамма-излучения.

ИСПЫТАНИЯ

Для радиофармацевтических лекарственных препаратов, содержащих радионуклид с коротким периодом полураспада, проведение некоторых из указанных ниже испытаний до выпуска лекарственных препаратов в обращение не представляется возможным. Испытания, выполнение которых не завершается до выпуска в обращение, приводятся в частной фармакопейной статье. Указанные испытания используют в последующем для контроля производственного процесса.

Нерадиоактивные вещества и родственные примеси. Данный раздел частной фармакопейной статьи регламентирует определение нерадиоактивных веществ и родственных примесей, которые могут присутствовать

в радиофармацевтическом лекарственном препарате.

Остаточные органические растворители. Содержание остаточных органических растворителей ограничивают в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи 2.3.2.0. *Остаточные органические растворители с использованием методов, приведенных в общей фармакопейной статье 2.1.4.19. Идентификация и контроль остаточных растворителей, или других подходящих методов.*

РАДИОНУКЛИДНАЯ ЧИСТОТА

Радионуклидные примеси могут образовываться в процессе получения и распада радионуклида. Возможные радионуклидные примеси могут указываться в частных фармакопейных статьях, а их характеристики приводятся в Приложении 4.2. *Физические характеристики радионуклидов, указанных в Фармакопее Евразийского экономического союза.*

В большинстве случаев для установления радионуклидной чистоты радиофармацевтического лекарственного препарата необходимо определить подлинность каждого присутствующего радионуклида и его радиоактивность. Как правило, наиболее подходящим методом оценки радионуклидной чистоты гамма- и рентгеновских излучателей является гамма-спектрометрия. Использование натрий-йодидных детекторов может вызывать проблемы: пики примесей гамма-излучателей могут быть скрыты в спектре основного радионуклида или оставаться неразделенными от пиков других радионуклидных примесей в радиофармацевтическом лекарственном препарате. Примеси альфа- и бета-излучателей, которые не излучают гамма- и рентгеновские лучи, не могут обнаруживаться данным методом. Для альфа- и бета-излучателей должны применяться другие методы.

Требования к радионуклидной чистоте и допустимое предельное содержание определенных радионуклидных примесей (например, молибден-99 в технеции-99m) указываются в частных фармакопейных статьях. Хотя данные требования являются необходимыми, сами по себе они недостаточны для обеспечения того уровня радионуклидной чистоты, который соответствует медицинскому применению радиофармацевтического лекарственного препарата. В связи с этим производитель должен проводить после

соответствующего периода распада тщательную оценку лекарственных препаратов, особенно включающих радионуклиды с коротким периодом полураспада, на содержание примесей с длительным периодом полураспада. Подобный подход позволяет получить информацию о пригодности производственных процессов и методик испытания. При необходимости идентифицировать и (или) дифференцировать 2 или несколько позитрон-излучающих радионуклидов, например, примеси ^{18}F в ^{13}N -содержащих лекарственных препаратах, дополнительно к гамма-спектрометрии должно быть выполнено определение периода полураспада.

Вследствие различий в периодах полураспада различных радионуклидов, присутствующих в радиофармацевтическом лекарственном препарате, радионуклидная чистота изменяется со временем.

РАДИОХИМИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА

Радиохимические примеси могут образовываться при следующих процессах:

- получении радионуклида;
- последующих химических процессах;
- неполном препаративном разделении;
- химических изменениях в процессе хранения.

Установление радиохимической чистоты требует разделения различных химических веществ, содержащих радионуклид, и определения радионуклида в заявленной химической форме. В данном разделе частной фармакопейной статьи могут указываться допустимые пределы содержания специфицированных радиохимических примесей, в том числе изомеров.

В целом, для определения радиохимической чистоты допускается использование любого метода аналитического разделения. Например, частные фармакопейные статьи на радиофармацевтические лекарственные препараты могут включать бумажную хроматографию (2.1.2.25), тонкослойную хроматографию (2.1.2.26), электрофорез (2.1.2.30), эксклюзионную хроматографию (2.1.2.29), газовую хроматографию (2.1.2.27) и жидкостную хроматографию (2.1.2.28). Соответствующие аналитические методики описываются в частных фармакопейных статьях. Кроме того, при работе с радиофармацевтическими лекарственными препаратами должны быть приняты особые меры предосторожности,

например, радиационная защита, геометрия измерения, линейность детектора, использование носителей, разведение лекарственного препарата.

Удельная, молярная и объемная радиоактивность. Обычно рассчитывают с учетом радиоактивной концентрации и концентрации испытуемого химического вещества после подтверждения принадлежности радиоактивности только радионуклиду (радионуклидная чистота) и соответствующим химическим веществам (радиохимическая чистота).

Удельная, молярная и объемная радиоактивность изменяются со временем, в связи с чем их значения приводят на определенную дату, а при необходимости – на определенное время.

Физиологическое (биологическое) распределение. По возможности следует избегать проведения испытаний на животных. Если испытания на подлинность и радиохимическую чистоту недостаточны для полного определения и контроля радиохимических примесей в радиофармацевтическом лекарственном препарате, может потребоваться проведение испытания на физиологическое (биологическое) распределение. Характер распределения радиоактивности, установленный в указанных органах, тканях или других частях тела соответствующего вида животных, может быть достоверным показателем пригодности радиофармацевтического лекарственного препарата для предполагаемой цели.

Кроме того, испытание на физиологическое (биологическое) распределение может служить для установления биоэквивалентности испытуемого лекарственного препарата аналогичным лекарственным препаратам с известной клинической эффективностью.

Подробное описание выполнения испытания и требования к физиологическому (биологическому) распределению, которым должен соответствовать радиофармацевтический лекарственный препарат, приводится в частных фармакопейных статьях.

Испытание, как правило, проводят следующим образом. Лекарственный препарат вводят внутривенно каждому из трех животных. В некоторых случаях может потребоваться разведение лекарственного препарата непосредственно перед применением. Сразу после введения лекарственного препарата каждое животное помещают в отдельную клетку, условия содержа-

ния в которой позволяют собирать экскременты и предупреждают загрязнение поверхности тела животного. По истечении указанного времени после введения лекарственного препарата животных умерщвляют соответствующим способом и проводят вскрытие. В выделенных органах и тканях определяют радиоактивность. Затем рассчитывают физиологическое (биологическое) распределение, выражая его значением радиоактивности, обнаруженной в каждом из выделенных органов или тканей, в процентах от введенной радиоактивности с учетом поправок на радиоактивный распад. Для некоторых радиофармацевтических лекарственных препаратов необходимо определение отношения радиоактивности во взвешенных образцах выделенных тканей, т.е. в виде «радиоактивность/масса».

Радиофармацевтический лекарственный препарат выдерживает испытание, если распределение радиоактивности не менее чем у двух из трех животных соответствует установленным критериям.

Результаты испытаний на животных с признаками экстравазальной инъекции (наблюдаемыми во время введения или обнаруживаемыми при последующем определении радиоактивности тканей) не учитывают. В указанном случае допускается повторное проведение испытания.

Стерильность. Радиофармацевтические лекарственные препараты для парентерального применения должны выдерживать испытание на стерильность.

Лекарственные препараты должны производиться в условиях, предотвращающих микробную контаминацию и обеспечивающих их стерильность. Испытание на стерильность выполняют в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи 2.1.6.1. *Стерильность*. Особые сложности возникают в случае радиофармацевтических лекарственных препаратов в связи с коротким периодом полураспада содержащихся в них радионуклидов, малыми размерами серий и радиационной опасностью. Если в частной фармакопейной статье указано, что в связи с излучением допускается выпуск радиофармацевтического лекарственного препарата в обращение до завершения испытания на стерильность, испытание должно быть начато, по возможности, быстрее. Если испытание не начато сразу же, образцы хранят в условиях, которые считают подходящими для предотвращения ложноотрицательных результатов.

В таких случаях методом выбора является параметрический выпуск продукции, произведенной по полностью валидированному технологическому процессу. В асептических условиях производства испытание на стерильность должно выполняться в виде контроля производственного процесса.

Если размер серии радиофармацевтического лекарственного препарата ограничен одним или несколькими образцами, допускается не применять требования общей фармакопейной статьи 2.1.6.1. *Стерильность* к отбору серии на испытание стерильности.

При периоде полураспада радионуклида менее 5 мин введение радиофармацевтического лекарственного препарата пациенту, как правило, осуществляют непосредственно на месте его получения в условиях валидированной системы изготовления.

Из соображений безопасности (высокий уровень радиоактивности) использование радиофармацевтических лекарственных препаратов в количестве, предусмотренном испытанием на стерильность (2.1.6.1), является невозможным. Для уменьшения облучения персонала предпочтительным представляется метод мембранной фильтрации.

Для рутинного контроля процесса фильтрации при асептическом производстве стерильных радиофармацевтических лекарственных препаратов, а также в случаях, когда это обосновано и разрешено уполномоченным органом на основании оценки риска, допускается не проводить испытание на целостность фильтра перед фильтрацией, выполнив это испытание только после фильтрации.

Несмотря на требования по использованию антимикробных консервантов в общей фармакопейной статье 2.5.3.4. *Лекарственные препараты для парентерального применения* их добавление в радиофармацевтические лекарственные препараты, выпускаемые в многодозовой упаковке, не является обязательным при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.

Бактериальные эндотоксины или **Пирогенность.** Радиофармацевтические лекарственные препараты для парентерального применения должны выдерживать испытание на бактериальные эндотоксины (2.1.6.8) или испытание на пирогенность (2.1.6.2).

В случае радионуклидов с периодом полураспада менее 90 мин и в случаях, когда это

обосновано и разрешено уполномоченным органом на основании оценки риска, допускается выпуск радиофармацевтического лекарственного препарата в обращение до завершения испытания.

Элюаты радионуклидных генераторов, растворы для радиоактивных меток и радиофармацевтические наборы также должны выдерживать испытание на бактериальные эндотоксины, если они предназначены для получения радиофармацевтических лекарственных препаратов для парентерального применения без последующих мер по их удалению.

Радионуклидные (радиофармацевтические) прекурсоры должны выдерживать испытание на бактериальные эндотоксины, если они предназначены для использования в производстве лекарственных препаратов для парентерального применения без последующих мер по их удалению.

Испытание на бактериальные эндотоксины выполняют в соответствии с указаниями общей фармакопейной статьи 2.1.6.8. *Бактериальные эндотоксины*, принимая необходимые меры предосторожности по радиационной безопасности персонала, выполняющего испытание. Допустимое предельное содержание бактериальных эндотоксинов указывается в частной фармакопейной статье или рассчитывается в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи 2.1.6.21. *Применение испытания на бактериальные эндотоксины*.

Если природа радиофармацевтического лекарственного препарата приводит к появлению мешающих факторов в испытании на бактериальные эндотоксины в виде ингибирования или активации реакции, а устранение данных факторов не представляется возможным, может потребоваться испытание на пирогенность (2.1.6.2).

ХРАНЕНИЕ

Лекарственные препараты, содержащие радиоактивные вещества, хранят в воздухонепроницаемом контейнере, обеспечивающем достаточную защиту персонала от первичного или вторичного излучений в соответствии с требованиями законодательства государств – членов Союза по хранению радиоактивных веществ. В процессе хранения контейнеры могут темнеть вследствие облучения, что необязательно означает ухудшение качества лекарственных препаратов.

МАРКИРОВКА

Маркировка произведенных радиофармацевтических лекарственных препаратов должна отвечать требованиям права Союза, а радиофармацевтических лекарственных препаратов, изготовленных в медицинских организациях, – требованиям законодательства государств – членов Союза.

Помимо вышеуказанного, на этикетке контейнера, вторичной упаковке, в общей характеристике лекарственного препарата (листок-вкладыш) или сертификате анализа серии (партии) радиофармацевтического лекарственного препарата дополнительно указывают, если применимо:

- максимальную рекомендуемую дозу (объем) в миллилитрах;
- особые условия хранения.

203200003-2023

2.3.20.3. ИЗГОТОВЛЕНИЕ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЯХ

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Многие радиофармацевтические лекарственные препараты изготавливают на постоянной основе на месте их применения, обычно в дозах для небольшого числа пациентов в соответствии с индивидуальными клиническими потребностями. Фармацевтическую деятельность по получению радиофармацевтических лекарственных препаратов, осуществляемую в медицинских организациях для собственных нужд, называют изготовлением радиофармацевтических лекарственных препаратов.

В общей фармакопейной статье рассматриваются радиофармацевтические лекарственные препараты, изготовленные в медицинских организациях. В отличие от радиофармацевтических лекарственных препаратов, производство которых осуществляется в соответствии с правом Союза, изготовление радиофармацевтических лекарственных препаратов в медицинских организациях должно отвечать требованиям законодательства государств – членов Союза. К радиофармацевтическим лекарственным препаратам

применяются положения и требования общей фармакопейной статьи 2.5.3.1. *Лекарственные препараты.*

Радиофармацевтические лекарственные препараты изготавливают либо по утвержденным технологическим рецептурам (инструкциям) для отдельных пациентов, либо в соответствии с требованиями частной фармакопейной статьи и применяют для пациентов непосредственно в этой медицинской организации. Такие радиофармацевтические лекарственные препараты применяются в течение установленного срока годности и включают в себя лекарственные препараты, как изготовленные на основе радиофармацевтических наборов, так и лекарственные препараты, содержащие радионуклиды для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) или терапевтических целей.

Изготовление радиофармацевтических лекарственных препаратов рассматривается как процесс, включающий отдельные стадии или все стадии из следующих:

- приобретение материалов и продуктов;
- получение радионуклидов для мечения;
- введение радиоактивной метки (радиомечение);
- химическую модификацию и (или) очистку;
- получение лекарственной формы;
- дозирование лекарственного препарата (наполнение флаконов);
- стерилизацию;
- аналитический контроль;
- упаковку;
- маркировку;
- отпуск.

Отбор дозы (например, из многодозового флакона) и немедленное применение радиофармацевтического лекарственного препарата пациентом считают частью клинической практики, но не частью процесса изготовления радиофармацевтического лекарственного препарата.

Для обеспечения требуемого качества радиофармацевтических лекарственных препаратов их изготовление должно осуществляться в рамках соответствующей системы качества. Уровень системы качества определяется рисками для пациента, такими как микробная контаминация, неоптимальное протекание химических реакций и его последствия, неисправность оборудования, используемого в процессе изготов-

ления, и несоответствующие условия хранения исходных материалов и готовой продукции. Определение уровня риска и требуемого уровня обеспечения качества, необходимых для достижения надлежащего качества продукции и обеспечения радиационной безопасности, должно проводиться на основе оценки рисков. Выбор систем качества для изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов осуществляют на основе установленных правил и рекомендаций.

Особое внимание при этом следует уделять следующим вопросам:

- наличие квалифицированного персонала, имеющего необходимую подготовку;
- наличие соответствующих помещений;
- квалификация подходящего оборудования для изготовления и анализа;
- валидация всех критических стадий изготовления и методик проведения испытаний;
- мониторинг окружающей среды;
- наличие и ведение соответствующей документации;
- закупка материалов и услуг, используемых при изготовлении;
- наличие аналитических методик и контроль качества.

Все стадии изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов разрабатывают в соответствии с требованиями радиационной безопасности участвующего персонала и окружающей среды, установленными законодательством государств – членом Союза.

2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В общей фармакопейной статье используются следующие понятия:

автоматизированный модуль для синтеза и (или) дозирования – электромеханическое устройство, управляемое программным обеспечением, для автоматического выполнения последовательности операций, необходимых для радиомечения, очистки, получения лекарственной формы, дозирования и (или) стерилизации радиофармацевтического лекарственного препарата;

дозирование (наполнение) в закрытые флаконы – процесс, при котором раствор, предназначенный для наполнения после стерилизующей фильтрации, не находится в непосредственном контакте с окружающей средой, а асептические

операции по соединению компонентов системы во время дозирования после стерилизующего фильтра не производятся;

закрытый метод радиосинтеза – метод, при котором раствор содержится в системе синтеза и не подвергается непосредственному воздействию окружающей среды в процессе радиосинтеза (например, с использованием радиофармацевтической кассеты);

исходный материал – материал, используемый для изготовления радиофармацевтического лекарственного препарата. В качестве исходных материалов могут рассматриваться радионуклидные генераторы для радиофармацевтических лекарственных препаратов, радионуклидные и химические прекурсоры, вспомогательные вещества для синтеза, ионообменные смолы, компоненты упаковки и расходные материалы;

набор исходных материалов – набор реактивов, растворителей и прекурсоров в виде, пригодном для изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов. Как правило, пригодными для изготовления исходными материалами являются образец твердого вещества точно установленного (путем взвешивания) количества или образец раствора определенного объема. Твердые и жидкие исходные материалы, как правило, расфасовывают во флаконы и укупоривают для хранения до использования. Наборы исходных материалов могут быть приобретены в готовом виде или получены на месте с использованием упаковочных материалов и химических веществ, приобретенных или синтезированных на месте;

открытый метод радиосинтеза или дозирования (наполнения) в открытые флаконы – метод, при котором в определенной точке процесса раствор подвергается непосредственному воздействию окружающей среды (при дозировании контакт с окружающей средой через стерилизующий воздушный фильтр не считают непосредственным воздействием);

радиофармацевтическая кассета (кассета) – устройство одноразового использования, состоящее из предварительно собранной цепи контейнеров, клапанов и шприцев, в том числе набора исходных материалов или без него, и предназначенное для установки на модуле синтеза в процессе изготовления радиофармацевтического лекарственного препарата.

3. ПОМЕЩЕНИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ

Помещения и оборудование проектируются, строятся, обслуживаются, очищаются и дезинфицируются таким образом, чтобы обеспечить надлежащее качество радиофармацевтического лекарственного препарата, низкий уровень содержания частиц и микробной контаминации, а также защитить персонал и окружающую среду от воздействия радиации.

Обычно радиофармацевтические лекарственные препараты изготавливают в широком разнообразии, часто в одно и то же время и в одном месте. Помещения, оборудование и рабочий процесс должны выстраиваться так, чтобы свести к минимуму риск перекрестной контаминации и перепутывания. Оборудование и вспомогательные средства проектируют и контролируют с учетом особого риска для всех изготавливаемых лекарственных препаратов и возможности их микробной контаминации. При работе с биологическими материалами должны соблюдаться дополнительные требования.

Подробное описание параметров и последовательности процесса, условий окружающей среды и микробиологических аспектов изготовления позволяет избежать возможного химического, радиохимического, радионуклидного и микробного загрязнения. В частном случае радиомечения клеток крови перемещение операторов внутри лаборатории между зоной для радиомечения и зоной для изготовления других радиофармацевтических лекарственных препаратов предотвращают соответствующей конструкцией и планировкой помещений. Любой опасный биологический материал должен храниться и подвергаться обработке отдельно от других субстанций для фармацевтического применения, лекарственных препаратов или исходных материалов.

Измерение радиоактивности проводят, как описано в общей фармакопейной статье 2.1.2.43. *Обнаружение и измерение радиоактивности*. Измерительное оборудование должным образом экранируют, особенно при работе с высокими уровнями радиоактивности в смежных зонах. Для обеспечения надлежащей работы оборудования должна быть внедрена система, предусматривающая его ежедневную проверку и периодическую поверку или калибровку.

Все отклонения, такие как изменения диапазона линейности, калибровка по энергии и эффективности и непредвиденные изменения фоновых показаний, должны подлежать исследованию.

4. ПРОЦЕСС ИЗГОТОВЛЕНИЯ

В случае зарегистрированного радиофармацевтического лекарственного препарата, используемого в качестве компонента в процессе изготовления, ответственность за его соответствие требованиям, заявленным в регистрационном досье, несет владелец регистрационного удостоверения. Специалисты, занятые изготовлением радиофармацевтических лекарственных препаратов в соответствии с инструкциями по медицинскому применению, несут ответственность за качество изготовления и обращение этих радиофармацевтических лекарственных препаратов на своем участке. Подтверждение соответствия качества готового к применению радиофармацевтического лекарственного препарата предполагаемому назначению осуществляет ответственное лицо, назначенное руководителем медицинской организации.

Если один или несколько компонентов, используемых для изготовления, не зарегистрированы, должна проводиться оценка риска (включая обоснование и фармацевтическую эквивалентность, если применимо) и ее документальное оформление.

Как правило, соответствие исходных материалов требованиям биологических испытаний (бионагрузка) является важным фактором в достижении низкого содержания бактериальных эндотоксинов и обеспечении стерильности радиофармацевтических лекарственных препаратов при последующих операциях изготовления. Вскрытые или частично использованные упаковки исходных материалов, предназначенные для последующего применения, следует должным образом маркировать и хранить в условиях ограниченного доступа. Для открытых, неоткрытых и растворенных исходных материалов должны быть определены сроки годности, особенно с точки зрения микробиологического фона в конкретных условиях работы. Рекомендуется использование одноразовой упаковки. Для наборов исходных материалов срок годности устанавливают, исходя из возможности деградации ингредиентов, микробной контаминации и стабильности упаковочных материалов

с учетом проницаемости полимерной и эластомерной упаковок. Срок годности указывают и обосновывают исследованиями стабильности, отражающими способ применения.

Мониторинг окружающей производственной среды и персонала во время изготовления радиофармацевтического лекарственного препарата имеет важное значение для обеспечения качества лекарственного препарата независимо от происхождения исходного материала, использованного при изготовлении. Частота мониторинга определяется на основании установленных правил и рекомендаций. Отклонения от рекомендованной частоты осуществляются на основе оценки риска и должны быть обоснованы. При необходимости получения стерильного лекарственного препарата и невозможности финишной стерилизующей фильтрации должны использоваться стерильные исходные материалы. Компоненты оборудования, непосредственно контактирующие с лекарственным препаратом в процессе изготовления, должны быть стерильными, одноразового использования или могут повторно использоваться только после выполнения валидированной процедуры очистки и стерилизации.

4.1. ПОЛУЧЕНИЕ РАДИОНУКЛИДОВ

Методика получения радионуклида должна описывать следующие основные параметры:

- материал мишени;
- ядерная реакция;
- конструкция держателя для материала мишени;
- техническое обслуживание держателя для материала мишени и линий передачи;
- данные об облучении, например, энергия и интенсивность пучка излучения;
- типичные радионуклидные загрязнители для принятых условий (функция возбуждения);
- процесс разделения и очистки целевого радионуклида.

Методика должна оценивать все воздействия на эффективность получения с точки зрения качества и количества целевого радионуклида.

Радионуклидные прекурсоры и молекулы с радиоактивной меткой должны отвечать требованиям общей фармакопейной статьи 2.3.20.2. *Радиофармацевтические лекарственные препараты* и соответствующих частных фармакопейных статей (при наличии).

4.2. ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕКУРСОРЫ

Химические прекурсоры обычно получают химическим синтезом. Они могут химически связываться с радионуклидом или смешиваться с другими веществами в виде наборов, предварительно изготовленных для процедур радиомечения, и (или) использоваться в качестве исходных материалов в кассетах или наборах.

Химические прекурсоры как в изолированном виде, так и в виде наборов исходных материалов, должны иметь допустимо низкий уровень микробной контаминации независимо от того, подвергается ли продукт финишной стерилизации или стерилизующей фильтрации. Стерилизацию следует рассматривать с точки зрения существования риска того, что химические прекурсоры могут способствовать росту микроорганизмов.

Требования к качеству химических прекурсоров приводятся в общей фармакопейной статье 2.3.20.1. *Химические прекурсоры для радиофармацевтических лекарственных препаратов* и соответствующих частных фармакопейных статьях. При отсутствии частных фармакопейных статей применяются требования и положения общей фармакопейной статьи 2.3.18.0. *Субстанции для фармацевтического применения*, а также осуществляется программа испытаний для проверки качества химических прекурсоров. Однако некоторые положения указанной общей фармакопейной статьи не применимы для радиофармацевтических лекарственных препаратов и химических прекурсоров. Такие положения приводятся в общей фармакопейной статье 2.3.20.2. *Радиофармацевтические лекарственные препараты*.

4.3. РАДИОМЕЧЕНИЕ

Стадия радиомечения представляет собой реакцию радионуклида с химическим прекурсором. Субстратами для прямого радиомечения также могут быть биологические материалы, такие как белки или клетки.

Радиомечение включает смешивание исходных материалов в контролируемых условиях (например, температура или давление). После радиомечения могут осуществляться последующие стадии, предназначенные для удаления защитных групп или связывания меченого соединения с другой молекулой, которая может представлять собой органический фрагмент или

более сложную структуру, такую как белок или антитело.

Риски для эффективности радиомечения, качества, безопасности и эффективности радиофармацевтического лекарственного препарата, связанные с химическим и физическим составом набора, компонентами или исходными материалами, должны оцениваться и документально оформляться. Тщательному изучению подлежат химическая и физическая стабильность и риски микробной контаминации.

При разработке метода синтеза учитывают источники получения и качество исходных материалов (например, загрязнение металлами), их количественный и качественный состав (например, концентрация, рН, стерильность, осмолярность, вязкость, растворимость, стабильность) и условия проведения синтеза (например, использование инертного газа, температура, давление). Особое внимание также уделяют возможным побочным продуктам синтеза. Для повышения надежности процессов синтеза, снижения риска микробной контаминации и повышения радиационной безопасности предпочтительны автоматизация и (или) использование кассет.

Перед внедрением в клиническую практику радиофармацевтического лекарственного препарата, полученного в соответствии с новым методом синтеза, процесс синтеза валидируют, используя подходящие виды контроля в процессе изготовления (промежуточный контроль) и выполняя полный контроль качества не менее трех серий готового к применению радиофармацевтического лекарственного препарата. После выполнения валидации процесса возможен рутинный контроль качества, который должен проводиться до введения радиофармацевтического лекарственного препарата пациенту и должен быть основан на оценке риска с учетом химической сложности синтеза, факторов, влияющих на эффективность радиофармацевтического лекарственного препарата, дозы облучения для пациента, например, посредством контроля радиохимических и радионуклидных примесей.

4.3.1. Радиофармацевтические лекарственные препараты, не требующие очистки

Данный тип синтеза характеризуется комбинированием радионуклида со смесью исходных материалов. Такое однократное добавление

исходных материалов сопровождается почти количественной реакцией радионуклида с химическим прекурсором, так что процесс изготовления не требует стадии очистки. Ввиду повышенного риска микробной контаминации следует избегать открытых методов радиосинтеза. Все компоненты радиофармацевтического лекарственного препарата вводят совместно с полученным радиофармацевтическим активным ингредиентом. Необходимая оценка риска должна быть сосредоточена на химическом, радиохимическом и микробиологическом качестве всех исходных материалов, включая радионуклид. При многократном добавлении исходных материалов оценка риска также должна фокусироваться на условиях введения и реакции с участием различных исходных материалов, особенно реакционного контейнера (реактора).

4.3.2. Радиофармацевтические лекарственные препараты, требующие очистки

Данный тип синтеза характеризуется однократным добавлением раствора радионуклида к смеси исходных материалов или многократным добавлением различных исходных материалов, что требует последующей очистки (см. также раздел 4.5 данной общей фармакопейной статьи). Эффективная очистка целевого радиоактивного соединения от реакционной смеси необходима для обеспечения низкого содержания радионуклидных, химических и (или) радиохимических примесей. Физико-химическое и химическое выделение промежуточных продуктов или готового продукта имеет существенное значение для получения радиофармацевтического лекарственного препарата, соответствующего требованиям спецификации. По возможности процесс изготовления, включая критические стадии разделения, контролируют с помощью подходящих детекторов, при этом контроль проводят в отношении радиационной безопасности. Необходимая оценка риска должна быть сосредоточена на аспектах, указанных в разделе 4.3.1 данной общей фармакопейной статьи, а также на условиях очистки, особенно эффективности разделения и влиянии хроматографической среды на последующее микробиологическое качество (содержание бактериальных эндотоксинов продукта).

4.3.3. Радиомечение клеток

К особым аспектам оценки риска при радиомечении клеток относятся перекрестная

контаминация, перекрестное инфицирование, перепутывание образцов крови и ее компонентов, а также сохранение целостности и (или) жизнеспособности клеток после радиомечения. Указанный тип радиомечения более подробно рассматривается в разделе 4.14 данной общей фармакопейной статьи.

4.4. АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ

Некоторые из описанных выше стадий могут быть автоматизированы. Автоматизированный модуль (синтезатор) обычно состоит из комбинации источников питания, приводных механизмов, насосов, нагревателей и датчиков, которые используются в сочетании с взаимосвязанной сетью контейнеров, реакторов, трубок, шприцев, твердофазных картриджей и (или) препаративных систем жидкостной хроматографии. Автоматизированный модуль может быть готовой единицей оборудования, доступной в продаже, или изготавливаться на заказ. Обычно для разных радиофармацевтических лекарственных препаратов применяют один и тот же автоматизированный модуль.

В процессе синтеза автоматизированный модуль контролирует параметры процесса вплоть до получения раствора радиофармацевтического лекарственного препарата. Контейнеры и система очистки, используемые с автоматизированным модулем, могут быть одноразовыми (радиофармацевтическая кассета) или использоваться в многочисленных циклах получения лекарственного препарата.

При использовании последовательных циклов получения учитывают риск перекрестной контаминации. Для ее предотвращения принимают соответствующие меры с использованием предназначенных для этого компонентов или оборудования или путем оценки эффективности процедуры очистки.

Контейнеры и системы очистки (например, колонка системы препаративной жидкостной хроматографии) считают частью синтезатора.

Электронные компоненты синтезатора должны быть устойчивы к высоким уровням излучения.

Компоненты автоматизированного модуля, непосредственно соприкасающиеся с исходными материалами, растворителями и (или) радиофармацевтическим лекарственным препаратом, должны быть химически инертными. Особое внимание следует уделять компонентам, находящимся в контакте с исходными материалами

и (или) радиофармацевтическим лекарственным препаратом, которые способны под воздействием излучения подвергаться деградации и со временем выделять примеси.

Автоматизированные модули могут также контролировать получение лекарственной формы и дозирование радиофармацевтического лекарственного препарата, как правило, с использованием устройств для измерения объема или массы и детекторов радиоактивности для отмеривания точных количеств лекарственного препарата. Для дозирования используют одноразовые системы трубок. Измерительная система должна быть откалибрована.

Для автоматизированного модуля синтеза и (или) дозирования требуется два уровня квалификации (валидации). Сам автоматизированный модуль проходит квалификацию у поставщика и (или) пользователя. После такой квалификации осуществляется валидация процесса изготовления и дозирования.

Процесс синтеза на синтезаторе обычно управляется программным обеспечением и валидируется. Пользователь автоматизированной системы должен иметь перечень последовательных стадий синтеза и историю внесенных в них изменений. Программное обеспечение должно находиться под контролем доступа, и любые изменения в нем должны контролироваться и документально оформляться.

Случаи «ручного» вмешательства или корректировки параметров (например, «ручное» управление клапанами) документально оформляют и исследуют как отклонение процесса, если оно выходит за пределы допустимых диапазонов. Версию программного обеспечения, используемую для получения серии радиофармацевтического лекарственного препарата, указывают как параметр серии. При внесении изменений в программное обеспечение его прежнюю версию архивируют на тот же период, что и документацию для серий, полученных с данной версией.

Автоматизированные системы могут включать в себя применение радиофармацевтических кассет и других одноразовых устройств. Кассеты используются с набором исходных материалов (таких как прекурсоры, растворители, катализаторы и др.), которые могут содержаться в кассете (предварительно заполненная кассета) или предоставляться отдельно (пустая кассета).

Кассеты могут производиться в готовом виде или собираться собственными силами. В обоих

случаях должны соблюдаться требования сопроводительной документации, предназначенной для пользователей.

Все материалы в системе, контактирующие с реактивами или радиофармацевтическим лекарственным препаратом, должны обладать соответствующей стабильностью при хранении и использовании. Совместимость материалов (например, полимерных материалов) с химическим процессом должна быть оценена, а результаты оценки – документально оформлены. Стекло, используемое для изготовления компонентов системы, должно быть по крайней мере типа I (см. общую фармакопейную статью 2.4.2.2. *Упаковка для фармацевтического применения из стекла*).

Перед применением радиофармацевтического лекарственного препарата, полученного с помощью кассет, процесс валидируют для подтверждения того, что комбинация кассеты и автоматизированной системы позволяет постоянно получать радиофармацевтический лекарственный препарат требуемого качества.

Качество используемых химических реактивов должно соответствовать требованиям, указанным в разделе 4.2 данной общей фармакопейной статьи.

Кассета должна быть способна синтезировать радиофармацевтический лекарственный препарат в соответствии с утвержденной спецификацией в течение всего срока годности кассеты.

Для поддержания низкого содержания бактериальных эндотоксинов и достижения стерильности радиофармацевтического лекарственного препарата, полученного с использованием кассеты, кассета должна иметь низкую исходную бионагрузку.

Пригодность процесса для получения радиофармацевтического лекарственного препарата должна быть обеспечена, а его качество подтверждено соответствующими аналитическими испытаниями.

Пользователь автоматизированной системы должен иметь необходимую информацию о химических реактивах и реакционных процессах, применяемых в системе, чтобы оценить возможные отклонения, которые могут возникнуть в процессе получения радиофармацевтических лекарственных препаратов. Неоптимальное протекание реакции или сбой в системе могут привести к снижению выхода готовой продукции

и (или) появлению дополнительных примесей. Предоставляемая информация о возможных сбоях в системе должна быть достаточна для установления соответствующих показателей качества получаемого радиофармацевтического лекарственного препарата.

4.5. ОЧИСТКА

Часто, особенно при проведении органических химических реакций, требуется выделение продукта реакции. Поскольку стадия очистки обеспечивает качество радиофармацевтического лекарственного препарата, эффективность разделения должна быть оценена с точки зрения радиохимической, радионуклидной и химической чистоты. Особое внимание уделяют остаточным органическим растворителям (2.3.2.0). Все процедуры очистки должны быть валидированы.

При использовании хроматографических сред существует риск микробной контаминации, особенно в случае многократного использования колонок для жидкостной хроматографии. Оценка риска должна быть сосредоточена на процедурах очистки и условиях хранения хроматографических сред. Их бионагрузку и содержание бактериальных эндотоксинов поддерживают ниже допустимых пределов, чтобы обеспечить стерилизацию лекарственных препаратов для парентеральных применений.

Процесс радиомечения биологических материалов, например, клеток крови, разрабатывают таким образом, чтобы стадия очистки, обычно центрифугирование, обеспечивала воспроизводимое качество продукта.

4.6. ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

После очистки получают лекарственную форму радиомеченного соединения, подходящую для введения пациентам.

Источники получения и качество вспомогательных веществ и добавок должны быть документально описаны.

При использовании набора исходных материалов собственного изготовления рекомендуется использовать компоненты без микробной контаминации (или с допустимо низким уровнем) независимо от того, будет ли радиофармацевтический лекарственный препарат подвергнут финишной стерилизации или стерилизующей фильтрации.

В случае получения различных типов радиофармацевтических лекарственных препаратов из наборов для предотвращения перекрестной контаминации одновременно используют отдельные флаконы с разбавителем.

Большинство радиофармацевтических лекарственных препаратов предназначено для парентерального введения. В связи с этим при разработке радиофармацевтических лекарственных препаратов и наборов исходных материалов собственному изготовлению особое внимание уделяют определению рН, осмолярности, вязкости, ионной силы и растворимости.

4.7. ДОЗИРОВАНИЕ (НАПОЛНЕНИЕ)

Дозирование представляет собой процесс розлива раствора радиофармацевтического лекарственного препарата с получением его дозированной формы, предназначенной для отпуска перед применением (см. раздел 4.12 данной общей фармакопейной статьи). Процесс сводится к изготовлению серии, состоящей из одного или нескольких флаконов или шприцев с готовым к применению радиофармацевтическим лекарственным препаратом. Для сведения бионагрузки до минимального уровня компоненты, необходимые в процессе дозирования, используют стерильными. Если это невозможно, компоненты стерилизуют по валидированной процедуре. Если компоненты используют повторно, отсутствие перекрестной контаминации при переходе от одного продукта к другому обеспечивают с помощью валидированной процедуры очистки.

4.8. СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Радиофармацевтические лекарственные препараты для парентерального применения должны быть стерильными. Наиболее высокий уровень обеспечения стерильности лекарственного препарата достигается с помощью финишной стерилизации. В большинстве случаев могут выполняться только стадии стерилизующей фильтрации, но в некоторых других случаях стерилизация представляется невозможной (например, при радиомечении аутологичных клеток). Такие радиофармацевтические лекарственные препараты следует рассматривать как асептически изготавливаемые лекарственные препараты. Применяемые методы стерилизации описаны в общей фармакопейной статье

2.3.1.5. Методы обеспечения стерильности продуктов.

Асептические операции осуществляются в помещении (зоне) класса А. Класс окружающей производственной среды будет зависеть от используемой системы герметизации, риска контаминации радиофармацевтического лекарственного препарата, его срока годности и количества единиц продукции, полученного в течение одного цикла изготовления. В отношении чистоты воздуха обычно приемлемыми являются помещения класса С для открытых производственных (рабочих) зон или помещения класса D для изоляторов.

Сложность операций и срок годности радиофармацевтического лекарственного препарата определяют меры, которые необходимо предпринять для обеспечения стерильности продукции, например:

- для простых операций в закрытой системе, требующей небольшого вмешательства (например, изготовление радиофармацевтических лекарственных препаратов из наборов и генераторов), соответствующий контроль окружающей производственной среды, непосредственно прилегающей к производственной (рабочей) зоне может обеспечить соответствующий уровень чистоты воздуха, когда применяются дополнительные меры (например, контроль целостности костюма (перчаток) оператора); в этом отношении решающее значение имеет оценка риска;

- для сложных операций в открытой системе (например, изготовление в открытом флаконе или наполнение флакона после стерилизующей фильтрации, асептическое изготовление, радиомечение аутологичных клеток) могут потребоваться дополнительные меры в окружающей производственной среде, непосредственно прилегающей к производственной (рабочей) зоне для обеспечения стерильности радиофармацевтического лекарственного препарата.

Процедуры закрытого наполнения применяются по возможности в качестве альтернативы заполнению открытого флакона, особенно для очень малых серий или в случае радиофармацевтических лекарственных препаратов для отдельных пациентов. Дозирующий набор (стерилизующий фильтр, иглы, пробирки и флаконы), применяемый в закрытых асептических операциях наполнения, должен быть стериль-

ным, что может быть достигнуто стерилизацией дозирующего набора или использованием стерильных компонентов. Такие стерильные компоненты собирают и соединяют в зоне с подаваемым воздухом класса А, расположенной в зоне с чистотой воздуха, соответствующей классу С. Процесс закрытого асептического наполнения может выполняться в зоне, чистота воздуха которой соответствует как минимум классу С.

Мониторинг количества частиц и микробной контаминации воздуха в критических зонах класса А и окружающей среды должен проводиться на регулярной основе. При использовании стерилизующей фильтрации перед введением радиофармацевтического лекарственного препарата пациенту фильтр проверяют на целостность. Испытание целостности фильтра для каждого типа лекарственного препарата, например, методом «точки пузырька», должно быть валидировано.

Для радиофармацевтических лекарственных препаратов, содержащих радионуклид с периодом полураспада менее 10 мин, испытание на целостность фильтра перед отпуском лекарственного препарата не проводится.

Если введение пациенту радиофармацевтического лекарственного препарата выполняется непосредственно от оборудования, используемый фильтр должен быть пригоден для непосредственного применения у человека.

Совместимость мембраны и корпуса фильтра с раствором радиофармацевтического лекарственного препарата проверяют экспериментально с использованием спецификаций поставщика фильтра. В некоторых случаях невозможно найти сертифицированные фильтры, приемлемые для определенных радиофармацевтических лекарственных препаратов (например, для гидрофобных радиофармацевтических лекарственных препаратов). В этих случаях необходимо проводить испытания фильтров на содержание бактериальных эндотоксинов, эффективность и выход продукта.

4.9. АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

Все аналитические системы должны быть квалифицированы, а методики валидированы. По возможности контроль качества не должен проводиться лицами, осуществляющими изготовление радиофармацевтического лекарственного препарата.

4.9.1. Исходные материалы

Исходные материалы, используемые для изготовления, должны соответствовать требованиям и положениям общей фармакопейной статьи 2.3.18.0. *Субстанции для фармацевтического применения* и частным фармакопейным статьям (при наличии).

Для исходных материалов, не входящих в состав радиофармацевтических лекарственных препаратов (например, реактивы, удаленные очисткой, катализаторы, растворители, картриджи), соответствие спецификациям проверяют путем оценки сертификата анализа, предоставленного их производителем, и дополняют, при необходимости, специфическими испытаниями. Если испытание невозможно с технической точки зрения, например, при использовании доступных в продаже предварительно заполненных кассет, допускается не проводить испытание, если осуществляется оценка риска. Спецификации исходных материалов должны быть адаптированы к уровню химической и микробиологической чистоты, который необходим для обеспечения качества целевого продукта радиосинтеза. Подлинность вспомогательных веществ, входящих в состав радиофармацевтического лекарственного препарата, проверяют подходящим аналитическим методом. Спецификации вспомогательных веществ должны быть адаптированы к уровню чистоты, который требуется для обеспечения качества компонента лекарственного препарата для парентерального применения, особенно в отношении бионагрузки и содержания бактериальных эндотоксинов.

В случае некоторых радионуклидов систематическая аналитическая оценка их качества невозможна перед использованием в процессе радиосинтеза. Их пригодность для предполагаемой цели должна устанавливаться каждый раз при использовании новой серии материала мишени или модификации процесса изготовления радионуклидов.

Для химических прекурсоров должны выполняться следующие требования:

- подлинность подтверждают подходящим аналитическим методом;

- пригодность для радиосинтеза проверяют путем проведения полного радиосинтеза с подтверждением соответствия готового к применению радиофармацевтического лекарственного препарата требованиям всех его спецификаций (испытательный синтез);

- соответствие спецификациям проверяют путем оценки сертификата анализа, предоставленного производителем, и дополняют, при необходимости, специфическими испытаниями.

4.9.2. Радиофармацевтические лекарственные препараты

Изготовленные радиофармацевтические лекарственные препараты должны соответствовать требованиям и положениям общей фармакопейной статьи 2.3.20.2. *Радиофармацевтические лекарственные препараты* и частных фармакопейных статей (при наличии). Кроме того, к ним также должны применяться другие общие фармакопейные статьи, особенно 2.5.3.1. *Лекарственные препараты*, 2.3.1.5. *Методы обеспечения стерильности продуктов*, 2.3.2.0. *Остаточные органические растворители*.

При отсутствии частной фармакопейной статьи или утвержденной общей характеристики лекарственного препарата должны быть разработаны спецификации и соответствующие методы испытаний для каждого радиофармацевтического лекарственного препарата. В таблице 2.3.20.3.-1 представлены примеры испытаний (или показателей качества) и соответствующих методов их проведения. Подробные сведения об измерении радиоактивности при проведении испытаний приводятся в общей фармакопейной статье 2.1.2.43. *Обнаружение и измерение радиоактивности*. Для каждого планируемого испытания указывают, должен ли быть получен результат перед отпуском радиофармацевтического лекарственного препарата. Если испытание отложено на момент после отпуска, это должно быть обосновано, а максимальный период отсрочки испытания четко установлен.

4.10. УПАКОВКА

Материал первичной упаковки должен быть совместим с радиофармацевтическим лекарственным препаратом.

4.11. МАРКИРОВКА

Если радиофармацевтический лекарственный препарат изготавливают и применяют на одном и том же участке, маркировка первичной упаковки должна указывать на наличие радиофармацевтического лекарственного препарата и обеспечивать его прослеживаемость. Маркировку таких лекарственных препаратов осуществляют в соответствии с требованиями законодательства государств – членов Союза.

На этикетке радиофармацевтического лекарственного препарата обычно указывают:

- наименование лекарственного препарата (активной фармацевтической субстанции) и (или) его (ее) характеристики;
- точные данные по изготовлению (номер серии или дата изготовления);
- порядковый номер дозированной единицы лекарственного препарата при изготовлении нескольких дозированных единиц, если применимо;
- международный символ радиоактивности.

Если применимо, маркировка защитного контейнера должна содержать данные пациента (идентификационный номер или фамилию и инициалы).

Для радиофармацевтических лекарственных препаратов в жидких и газообразных лекар-

ственных формах маркировка защитного контейнера должна включать общую радиоактивность в расчете на контейнер или радиоактивную концентрацию на миллилитр, указанные на дату и время измерения, а также объем жидкого лекарственного препарата в контейнере.

Для радиофармацевтических лекарственных препаратов в твердых лекарственных формах (например, капсулы) указывают общую радиоактивность на дату и, при необходимости, время измерения.

В определенных случаях допускается изменение маркировки, если ввиду чрезвычайно короткого периода полураспада (менее 10 мин) радиофармацевтический лекарственный препарат применяется до получения всей информации по оценке его качества.

Таблица 2.3.20.3.-1. – Примеры испытаний и методов их проведения для отпуска изготовленных радиофармацевтических лекарственных препаратов

Испытание (показатель качества)	Метод проведения испытания
свойства описание	визуальная оценка
подлинность радионуклида	определение периода полураспада, альфа-спектрометрия, бета-спектрометрия, гамма-спектрометрия
радиохимическая подлинность	жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография
радиохимическая чистота	жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография
химическая чистота	жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография
радионуклидная чистота	определение периода полураспада, гамма-спектрометрия, альфа-спектрометрия, бета-спектрометрия
остаточные органические растворители	газовая хроматография
фармацевтические или физиологические показатели (рН, осмоляльность и др.)	потенциометрия, осмометрия и др.
стерильность бактериальные эндотоксины	микробиологические методы
радиоактивность или радиоактивная концентрация	ионизационная камера
удельная радиоактивность	жидкостная хроматография, ионизационная камера
энантиомерная чистота	хиральная хроматография

Кроме того, на этикетке защитного контейнера или наружной упаковке указывают:

- наименование всех вспомогательных веществ, входящих в состав радиофармацевтического лекарственного препарата, если применимо;
- путь введения;
- дату истечения срока годности;
- особые условия хранения, если применимо.

4.12. ОТПУСК

Решение об отпуске готового к применению радиофармацевтического лекарственного препарата зависит от соответствия результатов аналитических испытаний требованиям спецификаций и от технологических данных, относящихся к изготовлению, особенно контролю в процессе изготовления и мониторингу (например, частицы, микроорганизмы, параметры окружающей среды). Однако, учитывая короткоживущую природу радиофармацевтического лекарственного препарата, результаты не всех испытаний могут быть получены на время его отпуска к применению. Перечень аналитических испытаний, которые должны быть выполнены до отпуска радиофармацевтического лекарственного препарата, составляют в соответствии с разделом 4.9.2 данной общей фармакопейной статьи. Отпуск радиофармацевтического лекарственного препарата осуществляют в соответствии с документированной процедурой с указанием всех необходимых данных (изготовление, контроль качества, оценка отклонений и др.). Такая процедура основана на оценке риска. Ретроспективное исследование результатов аналитических испытаний допускается в тех случаях, когда ввиду технических возможностей они не могут быть получены до применения радиофармацевтического лекарственного препарата, и должно быть основано на оценке риска. Рассмотрение результатов и разрешение на отпуск радиофармацевтического лекарственного препарата до применения осуществляет ответственное лицо в письменной форме в документации серии.

Должна быть разработана документированная процедура, описывающая действия, обязательные для выполнения в случае получения неудовлетворительных результатов испытаний после отпуска радиофармацевтического лекарственного препарата (отзыв или предоставление информации пользователям лекарственного препарата в зависимости от времени обнаружения).

Заключительное рассмотрение результатов и разрешение на отпуск радиофармацевтического лекарственного препарата осуществляет ответственное лицо в письменной форме в документации серии.

4.13. АРХИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ

При изготовлении радиофармацевтического лекарственного препарата в медицинской организации его архивные образцы хранят в течение 1 мес с момента завершения всех испытаний или 1 мес после изготовления в зависимости от того, какой срок больше. При изготовлении одного флакона радиофармацевтического лекарственного препарата получение архивных образцов является невозможным, что требует учета при оценке риска. По возможности аналогичный подход применяют к химическим прекурсорам и исходным материалам. Архивные образцы не требуются для радиофармацевтических лекарственных препаратов, изготовленных из радиомеченных клеток крови.

4.14. ПОЛУЧЕНИЕ РАДИОМЕЧЕННЫХ КЛЕТОК КРОВИ

При операциях с клетками и радиомечении необходимо поддерживать как жизнеспособность, так и стерильность клеток. При этом защита оператора должна иметь первостепенное значение, биологического и радиационного воздействия на оператора следует избегать.

4.14.1. Сбор клеток крови и клеточных компонентов для радиомечения и повторного введения донору или пациенту

Сбор клеток крови и клеточных компонентов осуществляют таким образом, чтобы сохранить их функцию, например, применяя иглу с широким отверстием, используя шприц, предварительно покрытый соответствующим антикоагулянтом, избегая чрезмерного центрифугирования. Для предотвращения перепутывания контейнеров на их этикетках подходящим способом приводят информацию о пациентах. Требования к качеству для всех веществ, используемых при выделении клеток, указываются в соответствующих частных фармакопейных статьях (при наличии). Независимо от наличия или отсутствия частной фармакопейной статьи применяют общую фармакопейную статью 2.3.18.0. *Субстанции для фармацевтического применения*. При использовании гетерологичных клеток могут понадобиться дополнитель-

ные меры предосторожности, что должно быть предусмотрено соответствующими правилами.

Для выделения клеточных компонентов крови необходимо применение центрифуги, конструкция которой должна обеспечивать локализацию образцов в случае разливов и (или) поломок (например, с закрытыми емкостями). Оборудование, используемое для радиомечения клеток, применяют только для одной процедуры (одного пациента) за один раз, при этом предпочтительным выбором является одноразовая посуда. Обработка образцов от разных пациентов должна разделяться соответствующими интервалами времени и включать процесс очистки и дезинфекции посуды и оборудования, который обеспечивает уничтожение передаваемых через кровь патогенов и вирусов.

4.14.2. Радиомечение клеток

Для предотвращения перекрестной контаминации, перекрестного инфицирования или перепутывания образцов крови и их микробной контаминации принимают соответствующие меры

предосторожности. Условия радиомечения не должны нарушать целостность и (или) жизнеспособность клеток. Вследствие невозможности проведения финишной стерилизации радиомечение клеток рассматривают как асептический процесс (см. раздел 4.8 данной общей фармакопейной статьи).

4.14.3. Контроль качества

Для проверки пригодности радиомеченных клеток до их отпуска и повторного введения проводят идентификацию, расчет выхода процесса радиомечения и испытание на отсутствие агрегации или слипания клеток. Испытание жизнеспособности и целостности клеток должно выполняться через регулярные интервалы времени.

Валидация процесса получения радиомеченных клеток крови включает проверку жизнеспособности, морфологии или функции клеток в зависимости от типа клеток. Любые изменения в процедуре получения радиомеченных клеток должны быть валидированы.

4. ПРИЛОЖЕНИЕ

402000000-2023

4.2. ФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАДИОНУКЛИДОВ, УКАЗАННЫХ В ФАРМАКОПЕЕ ЕВРАЗИЙСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА

В приложении приводятся физические характеристики радионуклидов, указанных в Фармакопее Союза. Приложение следует рассматривать в качестве дополнения к общей фармакопейной статье 2.3.20.2. *Радиофармацевтические лекарственные препараты.*

В качестве физических характеристик радионуклидов приводятся период полураспада радионуклидов, а также тип, энергия и вероятность излучения (в расчете на 100 распадов) для электронного и фотонного излучений. Физические характеристики радионуклидов, указанных в Фармакопее Союза, представлены в

таблице 4.2.-1. Их значения получены из базы данных Национального центра по ядерным данным (NNDC) Брукхейвенской национальной лаборатории (США) (<http://www.nndc.bnl.gov>). При использовании более точных или обновленных значений физических характеристик из другого источника информации следует приводить ссылку на использованный источник.

Значения периода полураспада указываются вместе с их неопределенностью, которая представляет собой стандартную неопределенность соответствующих последних цифр в значении периода полураспада. При этом неопределенность периода полураспада приводится в круглых скобках.

В таблице используются следующие обозначения:

- e_A – электроны Оже;
- ce – конверсионные электроны;
- β^- – электроны;
- β^+ – позитроны;
- γ – гамма-излучение;
- X – рентгеновское излучение.

Таблица 4.2.-1. – Физические характеристики радионуклидов, указанных в Фармакопее Союза

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Тритий (^3H)	12,33 (6) лет	β^-	0,006 ⁽¹⁾ (макс. 0,19)	100			
Углерод-11 (^{11}C)	20,385 (20) мин	β^+	0,386 ⁽¹⁾ (макс. 0,960)	99,8	γ	0,511	199,5 ⁽¹¹⁾
Азот-13 (^{13}N)	9,965 (4) мин	β^+	0,492 ⁽¹⁾ (макс. 1,198)	99,8	γ	0,511	199,6 ⁽¹¹⁾
Кислород-15 (^{15}O)	122,24 (16) с	β^+	0,735 ⁽¹⁾ (макс. 1,732)	99,9	γ	0,511	199,8 ⁽¹¹⁾
Фтор-18 (^{18}F)	109,77 (5) мин	β^+	0,250 ⁽¹⁾ (макс. 0,633)	96,7			
Фосфор-32 (^{32}P)	14,26 (4) сут	β^-	0,695 ⁽¹⁾ (макс. 1,71)	100			
Фосфор-33 (^{33}P)	25,34 (12) сут	β^-	0,076 ⁽¹⁾ (макс. 0,249)	100	γ	0,511	193,5 ⁽¹¹⁾
Сера-35 (^{35}S)	87,51 (12) сут	β^-	0,049 ⁽¹⁾ (макс. 0,167)	100			
Хром-51 (^{51}Cr)	27,7025 (24) сут	ϵ_A	0,004	67	X	0,005	22,3
					γ	0,320	9,9

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Кобальт-56 (^{56}Co)	77,27 (3) сут	e_A	0,006	47	X	0,006 – 0,007	25
			0,179 ⁽¹⁾	0,9	γ	0,511	38,0 ⁽¹¹⁾
						0,847	100,0
						1,038	14,1
						1,175	2,2
						1,238	66,1
						1,360	4,3
						1,771	15,5
						2,015	3,0
						2,035	7,8
			2,598	17,0			
Кобальт-57 (^{57}Co)	271,79 (9) сут	$e_A + ce$	0,006-0,007	177,4	X	0,006 – 0,007	57
			0,014	7,4	γ	0,014	9,2
			0,115	1,8		0,122	85,6
			0,129	1,3		1,136	10,7
						0,692	0,15

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение								
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)						
Кобальт-58 (^{58}Co)	70,86 (7) сут	e_A	0,006	49,4	X	0,006-0,007	26,3						
		β^+	0,201 ⁽¹⁾	14,9	γ	0,511	29,9 ⁽¹¹⁾						
						0,811	99,4						
						0,864	0,7						
						1,675	0,5						
Кобальт-60 (^{60}Co)	5,2714 (5) лет	β^-	0,096 ⁽¹⁾ (макс. 0,318)	99,9	1,173	100,0							
					1,333	100,0							
					0,009 – 0,010	19,1							
Галлий-66 (^{66}Ga)	9,49 (7) ч	e_A	0,008	21	X	0,009 – 0,010	19,1						
								β^+	1,90 ⁽¹⁾	50	γ	0,511	112 ⁽¹¹⁾
												0,157 ⁽¹⁾	1
												0,331 ⁽¹⁾	0,7
												0,397 ⁽¹⁾	3,8
		0,782 ⁽¹⁾	0,3										
		β^+	1,90 ⁽¹⁾	50	γ	1,039	37						
						1,333	1,2						
						1,919	2,1						
						2,190	5,6						
2,423	1,9												
β^+	1,90 ⁽¹⁾	50	γ	2,752	23,4								
				3,229	1,5								
				3,381	1,5								
				3,792	1,1								
				4,086	1,3								
β^+	1,90 ⁽¹⁾	50	γ	4,295	4,1								
				4,807	1,8								

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Галлий-67 (⁶⁷ Ga)	3,2612 (6) сут	e _A	0,008	62	X	0,008-0,010	57
		ce	0,082-0,084	30,4	γ	0,091-0,093	42,4
			0,090-0,092	3,6		0,185	21,2
			0,175	0,3		0,209	2,4
Германий-68 (⁶⁷ Ge) в равновесии с Галлием-68 (⁶⁸ Ga)	270,82 (27) сут (⁶⁸ Ga: 67,629 (24) мин)	e _A	0,008	42,4	X	0,009 – 0,010	44,1
		β ⁺	0,353 ⁽¹⁾	1,2	γ	0,511	178,3
			0,836 ⁽¹⁾	88,0		1,077	3,0
		e _A	0,008	5,1	X	0,009 – 0,010	4,7
Галлий-68 (⁶⁸ Ga)	67,29 (24) мин	β ⁺	0,353 ⁽¹⁾	1,2	γ	0,511	178,3
			0,836 ⁽¹⁾	88,0		1,077	3,0
Криптон-81m (^{81m} Kr)	13,10 (3) с	ce	0,176	26,4	X	0,012 – 0,014	17,0
			0,189	4,6		γ	0,190

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Рубидий-81 (⁸¹ Rb) в равновесии с Криптоном-81m (^{81m} Kr)	4,576 (5) ч (^{81m} Kr: 13,10 (3) с)	e _A	0,011	31,3	X	0,013 – 0,014	57,2
		ce	0,176	25,0	γ	0,190	64
			0,188	4,3		0,446	23,2
			0,253 ⁽¹⁾	1,8		0,457	3,0
			0,447 ⁽¹⁾	25,0		0,510	5,3
Стронций-89 (⁸⁹ Sr) в равновесии с Иттрием-89m (^{89m} Y)	50,53 (7) сут (^{89m} Y: 16,06 (4) с)	β ⁻	0,583 ⁽¹⁾ (макс. 1,492)	99,99	γ	0,909	0,01
Стронций-90 (⁹⁰ Sr) в равновесии с Иттрием-90 (⁹⁰ Y)	28,74 (4) лет (⁹⁰ Y: 64,10 (8) ч)	β ⁻	0,196 ⁽¹⁾ (макс. 0,546)	100			
Иттрий-90 (⁹⁰ Y)	64,10 (8) ч	β ⁻	0,934 ⁽¹⁾ (макс. 2,280)	100			

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение				
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)		
Молибден-99 (⁹⁹ Mo) в равновесии с Технецием-99m (^{99m} Tc)	65,94 (1) ч (^{99m} Tc: 6,01 (1) ч)	β	0,133 ⁽¹⁾	16,4	γ	0,018-0,021	3,6		
			0,290 ⁽¹⁾	1,1					
			0,443 ⁽¹⁾	82,4				0,041	1,1
Технеций-99m (^{99m} Tc)	6,01 (1) ч	се	0,002	74	X	0,018-0,021	7,3		
			0,015	2,1					
			0,120	9,4					
			0,137-0,140	1,3					
Технеций-99 (⁹⁹ Tc)	2,11 × 10 ⁵ лет	β ⁻	0,085 ⁽¹⁾ (макс. 0,294)	100					
			0,017	12					
Рутений-103 (¹⁰³ Ru) в равновесии с Родием-103m (^{103m} Rh)	39,26 (2) сут (^{103m} Rh: 56,114 (20) мин)	се	0,030-0,039	88,3	γ	0,020 – 0,023	9,0		
			0,031 ⁽¹⁾	6,6					
			0,064 ⁽¹⁾	92,2					

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение					
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)			
Индий-110 (^{110}In)	4,9 (1) ч	e_A	0,019	13,4	X	0,023 – 0,026	70,5			
					γ	0,642	25,9			
						0,658	98,3			
						0,885	92,9			
						0,938	68,4			
0,997	10,5									
Индий-110m (^{110m}In)	69,1 (5) мин	e_A	0,019	5,3	X	0,023 – 0,026	27,8			
					β^+	0,511	123,4 ^(II)			
						1,015 ⁽⁰⁾	61			
						0,658	97,8			
						2,129	2,1			
Индий-111 (^{111}In)	2,8047 (5) сут	e_A	0,019	15,6	X	0,003	6,9			
								ce	0,145	7,8
									0,167 – 0,171	1,3
									0,219	4,9
									0,241 – 0,245	1,0
0,023 – 0,026	82,3									
0,171	90,2									
0,245	94,0									

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение					
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)			
Индий-114m (^{114m} In) в равновесии с Индием-114 (¹¹⁴ In)	49,51 (1) сут (¹¹⁴ In: 71,9 (1) с)	се	0,162	40	X	0,023 – 0,027	36,3			
			0,186 – 0,190	40						
		β ⁻	0,777 ⁽⁴⁾ (макс. 1,985)	95	γ	0,558	3,2			
Теллур-121m (^{121m} Te) в равновесии с Теллуrom-121 (¹²¹ Te)	154,0 (7) сут (¹²¹ Te: 19,16 (5) сут)	е _A	0,003	88,0	X	0,026-0,031	50,5			
			0,022 – 0,023	7,4						
		се	0,050	33,2	γ	1,102	2,5			
			0,077	40,0						
			0,180	6,1						
Теллур-121 (¹²¹ Te)	19,16 (5) сут	е _A	0,022	11,6	X	0,026 – 0,030	75,6			
								γ	0,470	1,4
									0,508	17,7
						0,573	80,3			

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Йод-123 (^{123}I)	13,27 (8) ч	e_A	0,023	12,3	X	0,004	9,3
			0,127	13,6		0,027 – 0,031	86,6
		ce	0,154	1,8	γ	0,159	83,3
			0,158	0,4		0,346	0,1
						0,440	0,4
0,505	0,3	0,529	1,4				
Йод-125 (^{125}I)	59,402 (14) сут	$e_A + ce$	0,004	80	X	0,004	15,5
			0,023-0,035	33		0,027	114
						0,031	26
				γ	0,035	6,7	

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение				
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)		
Йод-126 (¹²⁶ I)	13,11 (5) сут	e _A	0,023	6	X	0,027-0,031	42,2		
		ce	0,354	0,5	γ	0,388	34		
			0,634	0,1		0,491	2,9		
			0,109 ⁽¹⁾	3,6		0,511	2,3 (III)		
		β ⁻	0,290 ⁽¹⁾	32,1	γ	0,666	33		
			0,459 ⁽¹⁾	8,0		0,754	4,2		
			0,530 ⁽¹⁾	1		0,880	0,8		
		β ⁺				1,420	0,3		
		Йод-131 (¹³¹ I)	8,02070 (11) сут	ce	0,46	3,5	X	0,029 – 0,030	3,9
					0,330	1,6	γ	0,080	2,6
β ⁻	0,069 ⁽¹⁾			2,1	0,284	6,1			
	0,097 ⁽¹⁾			7,3	0,365	81,7			
	0,192 ⁽¹⁾			89,9	0,637	7,2			
						0,723		1,8	

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Ксенон-131m (^{131m} Xe)	11,84 (7) сут	e _A	0,025	6,8	X	0,004	8,3
						0,030	44,0
		ce	0,129	61	γ	0,164	2,0
			0,159	28,5			
Йод-133 (¹³³ I) (распадается до радиоактивного Ксенона-133)	20,8 (1) ч	β ⁻	0,163	8,3	γ	0,530	87
			0,140 ⁽¹⁾	3,8			
			0,162 ⁽¹⁾	3,2			
			0,299 ⁽¹⁾	4,2			
			0,441 ⁽¹⁾	83			
Ксенон-133 (¹³³ Xe)	5,243 (1) сут	e _A	0,026	5,8	X	0,004	6,3
						0,031	40,3
		ce	0,045	55,1	γ	0,080	38,3
			0,075 – 0,080	9,9			

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Ксенон-133m (^{133m} Xe) (распадается до радиоактивного Ксенона-133)	2,19 (1) сут	e _A	0,025	7	X	0,004	7,8
		ce	0,199	64,0		0,030	45,9
			0,228	20,7		0,034	10,6
				0,232	4,6	γ	0,233
Йод-135 (¹³⁵ I) (распадается до радиоактивного Ксенона-135)	6,57 (2) ч	β ⁻	0,140 ⁽⁰⁾	7,4	γ	0,527	13,8
			0,237 ⁽⁰⁾	8		0,547	7,2
			0,307 ⁽⁰⁾	8,8		0,837	6,7
			0,352 ⁽⁰⁾	21,9		1,039	8,0
			0,399 ⁽⁰⁾	8		1,132	22,7
			0,444 ⁽⁰⁾	7,5		1,260	28,9
		0,529 ⁽⁰⁾	23,8		1,458	8,7	
					1,678	9,6	
					1,791	7,8	
Ксенон-135 (¹³⁵ Xe)	9,14 (2) ч	ce	0,214	5,5	X	0,031 – 0,035	5,0
		β ⁻	0,171	3,1	γ	0,250	90,2
			0,308	96,0		0,608	2,9

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение				
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)		
Цезий-137 (^{137}Cs) в равновесии с Барием-137m ($^{137\text{m}}\text{Ba}$)	30,04 (3) лет ($^{137\text{m}}\text{Ba}$: 2,552 (1) мин)	e_A	0,026	0,8	X	0,005	1		
		ce	0,624	8,0		0,032 – 0,036	7		
			0,656	1,4	γ	0,662	85,1		
			0,174 ⁽¹⁾	94,4					
			0,416 ⁽¹⁾	5,6					
		e_A	0,00602	6,34	X	0,0530 – 0,541	5,90		
ce	0,05049	7,42							
Иттербий-175 (^{175}Yb)	4,185 (1) сут	β^-	0,1029	1,76	γ	0,1138	3,87		
			0,0190	20,4		0,2825	6,13		
			0,1024	6,7		0,3963	13,2		
		e_A	0,1399	72,9	X	0,0079	45,6		
		ce	0,00618	129,8				0,0546 – 0,0649	115,2
		0,04001	33,6						
Лютеций-177m ($^{177\text{m}}\text{Lu}$)	160,44 (6) сут	ce	0,04760	18,2	γ	0,2285	37,1		
			0,06315	23,9		0,2818	14,2		
			0,08793	16,1		0,3277	18,1		
		β^-	0,1017	23,9	0,4137	0,3785	29,9		
		0,04082 ⁽¹⁾	78,6	0,4137				17,5	
		0,4185	21,3	0,4185				21,3	

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Лютеций-177 (¹⁷⁷ Lu)	6,647 (4) сут	e _A	4,3 – 11,2	8,8	X	0,007 – 0,011	3,2
						0,054 – 0,056	4,4
		β ⁻	0,0477	11,6	γ	0,1129	6,2
						0,2084	10,4
Таллий-200 (²⁰⁰ Tl)	26,1 (1) ч	се	0,285	3,4	X	0,010	32,0
						0,353	63,3
		β ⁻	0,495 ⁽¹⁾	0,3	γ	0,08	17,5
						0,368	87,2
						0,579	13,8
						0,828	10,8
				1,206	29,9		
				1,226	3,4		
				1,274	3,3		
				1,363	3,4		
				1,515	4,0		

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Свинец-201 (^{201}Pb) (распадается до радиоактивного Таллия-201)	9,33 (3) ч	e_A	0,055	3	X	0,070 – 0,073	69
			0,246	8,5		0,083	19
			0,276	2	γ	0,331	79
						0,361	9,9
						0,406	2,0
						0,585	3,6
						0,692	4,3
						0,767	3,2
						0,826	2,4
						0,908	5,7
			0,946	7,9			
			1,099	1,8			
			1,277	1,6			
Таллий-201 (^{201}Tl)	72,912 (17) ч	ce	0,016 – 0,017	17,7	X	0,010	46,0
			0,027 – 0,029	4,1		0,069 – 0,071	73,7
			0,052	7,2		0,080	20,4
			0,084	15,4		0,135	2,6
			0,153	2,6		0,167	10,0

Таблица 4.2.-1. – Продолжение

Радионуклид	Период полураспада	Электронное излучение			Фотонное излучение		
		тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)	тип	энергия (МэВ)	вероятность излучения (на 100 распадов)
Таллий-202 (²⁰² Tl)	12,23 (2) сут	e _A	0,054	2,8	X	0,010	31,0
						0,069 – 0,071	61,6
		ce	0,357	2,4	γ	0,080	17,1
						0,440	91,4
Свинец-203 (²⁰³ Pb)	51,873 (9) ч	e _A	0,055	3,0	X	0,010	37,0
						0,071 – 0,073	69,6
		ce	0,194	13,3	γ	0,083	19,4
						0,279	80,8
						0,401	3,4

Примечание:

(I) Средняя энергия β-спектра.

(II) Максимальная вероятность излучения, соответствующая суммарной энергии излучения в источнике в расчете на 100 распадов.

