2.3.19.8. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, ПОЛУЧАЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

Общая фармакопейная статья содержит общие требования к производству и контролю лекарственных средств, содержащих белки и (или) пептиды, получаемых с использованием технологии рекомбинантной ДНК (рДНК). Активная фармацевтическая субстанция, полученная с применением технологии рДНК, должна отвечать требованиям, изложенным в соответствующем разделе настоящей общей фармакопейной статьи. Данные требования не являются всеобъемлющими для каждого конкретного случая, дополнительные или расширенные требования представлены в частной фармакопейной статье или установлены уполномоченным органом.

Данная общая фармакопейная статья также применима к антигенам вакцин полученным по технологии рДНК, при этом более подробные требования, изложены в общих фармакопейных статьях 2.3.19.11. «Вакцины и анатоксины для медицинского применения» и 2.3.19.22. Вакцины для ветеринарного применения и в соответствующих частных фармакопейных статьях, посвященных вакцинам.

Некоторые аспекты данной общей фармакопейной статьи могут быть применимы к продуктам, полученных с использованием трансгенных животных и растений.

Данная общая фармакопейная статья не распространяется на модифицированные (рекомбинантные) организмы, предназначенные для использования напрямую в организме человека или животных, например, в качестве живых рекомбинантных векторов или живых вакцин.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Белки и (или) пептиды (далее – продукты), получаемые с использованием технологии рДНК, производят путем генетической модификации, при которой нуклеотидную последовательность, кодирующую целевой продукт, как правило, вводят с помощью плазмиды или вирусного вектора в подходящие компетентные микроорганизмы (бактерии или дрожжи), или в клеточную линию млекопитающих (включая человека), насекомых или растений. Клетки хозяина с встроенным фрагментом ДНК обеспечивают экспрессию целевого продукта, в виде белка или пептида, извлекаемых в ходе этапов выделения и очистки.

Клетки хозяина представляют собой клетки микроорганизма или эукариотических клеточных линий, используемые для встраивания экспрессирующего вектора, а стабильную конструкцию из компетентных клеток и вектора экспрессии, используемую в производственном процессе, называют системой вектор/клетка-хозяин.

Продукты, полученные с использованием технологии рДНК, могут подвергаться преднамеренным посттрансляционным модификациям, например, таким как пегилирование или конъюгация.

ПРОИЗВОДСТВО

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Производство продуктов рДНК основано на валидированной системе посевных материалов с использованием подходящей системы вектор/клетка-хозяин. В системе посевного материала обычно используют главный банк клеток (ГБК) и рабочий банк клеток (РБК).

Описание клеток хозяина, вектора экспрессии, системы вектор/клетка-хозяин, ГБК и РБК, включая их происхождение, создание, поддержание и культивирование должно быть детально задокументировано.

При использовании в производственном процессе материалов животного или человеческого происхождения применяют требования общих фармакопейных статей *2.3.1.3. Вирусная безопасность* и *2.3.19.3. Минимизация риска контаминации лекарственных средств инфекционными агентами прионных заболеваний.*

Валидация производственного процесса должна охватывать:

– стадии производственного процесса, включая этапы культивирования клеток и ферментацию, очистку и любую последующую преднамеренную модификацию целевого белкового продукта, если это применимо;

– удаление или инактивацию посторонних агентов;

– удаление родственных и производственных примесей (например, нежелательные молекулярные варианты, остаточные белки и ДНК клеток хозяина, антибиотики, компоненты клеточной среды), а также материалов, используемых в ходе очистки целевого продукта;

– удаление пирогенных веществ, если это применимо.

В качестве стандартного образца для идентификации, количественного определения и других испытаний используют серию с доказанной стабильностью и репрезентативностью по отношению к сериям, прошедшим клинические исследования. Стандартный образец характеризуют надлежащим образом в соответствии с требованиями Фармакопеи Союза.

ВЕКТОР ЭКСПРЕСИИ И КЛЕТКА-ХОЗЯИН

Исходные материалы, используемые в производстве продукта рДНК, включая вектор экспрессии, клетки хозяина и пул трансформированных или трансфицированных клеток, из которых будет получен исходный клон, должны быть подробно охарактеризованы и документально оформлены.

Информация о происхождении, источнике и истории клеток хозяина и вектора экспрессии также должна быть задокументирована. Необходимо представить подробное описание гена, кодирующего целевой продукт, а также других функционально значимых участков экспрессирующей конструкции (например, нуклеотидная последовательность целевого гена и его фланкирующие участки, карта рестрикции).

Для подтверждения пригодности системы вектор/клетка-хозяин, в частности, в отношении микробиологической чистоты, используют:

– фенотипические и генотипические характеристики клетки хозяина;

– характеристики экспрессирующей конструкции в клетке-хозяина (интеграцию, количество копий, последовательность нуклеотидов, происхождение компонентных составных частей экспрессирующей конструкции, стадии сборки экспрессирующей конструкции и другие показатели);

– документы (информацию) об исходном сырье, трансформации или трансфекции клетки-хозяина вектором экспрессии и стратегии получения клона, используемого для создания системы банка клеток.

СИСТЕМА БАНКОВ КЛЕТОК

Главный банк клеток представляет собой гомогенную суспензию из исходных клеток уже трансформированных или трансфицированных вектором экспрессии, содержащих требуемый ген, и в течение одной операции распределенную в равных объемах по индивидуальным емкостям для хранения (например, в жидком азоте). В некоторых случаях может потребоваться создание отдельных ГБК для вектора экспрессии и для клеток хозяина.

Рабочий банк клеток представляет собой гомогенную суспензию клеток, полученную из главного банка клеток при установленном уровне пассажа и в течение одной операции распределенную в равных объемах по индивидуальным емкостям для хранения (например, в жидком азоте).

Все емкости из одного банка клеток хранят в валидированных идентичных условиях и после извлечения из хранилища обратно в хранилище не возвращают.

Установление характеристик и испытание банков эукариотических и прокариотических клеток представляет собой критически важную часть контроля лекарственных средств, получаемых с использованием технологии рДНК. Испытания банка клеток проводят для подтверждения подлинности, чистоты и пригодности клеточного субстрата для предполагаемого использования в производстве.

Стратегия проведения испытаний банков клеток может варьировать в зависимости от природы и биологических свойств клеток (например, потребности в питательных веществах для роста), истории культивирования клеточного субстрата (например, использование сырья рекомбинантного или животного происхождения, в том числе, полученного из тканей, органов или жидкостей человека, и применение антибиотиков). Методы молекулярной биологии используют для определения количества копий экспрессирующей конструкции, выявления в ней инсерций (вставок) или делеций, а также установления количества сайтов интеграции. Необходимо подтвердить, что нуклеотидные последовательности кодирующего фрагмента, фланкирующих контрольных участков и промоторов идентичны последовательностям, установленным для экспрессирующей конструкции и соответствуют планируемой аминокислотной последовательности белка.

При выявлении каких-либо изменений в последовательности нуклеотидов, необходимо их точное определение и обоснование приемлемости подобных изменений с представлением данных о стабильности вектора экспрессии и его способности к постоянной экспрессии целевого продукта.

Банки клеток (ГБК и РБК) должны быть охарактеризованы и испытаны на разных стадиях, включая клетки на стадии до и после достижения уровня удвоения популяции или числа генераций, используемых при производстве (клетки предельного для производства клеточного возраста *in vitro*).

Для банков прокариотических и дрожжевых клеток установление характеристики должно включать подтверждение молекулярной идентичности экспрессируемого гена, подлинности и чистоты клеток, в том числе, идентификацию штамма (с помощью биохимических, генетических или протеомных методов и др.), фенотипическую и генотипическую характеристику штамма, жизнеспособность, наличие плазмиды (например, последовательность нуклеотидов, количество копий, карту рестрикции, процент клеток, сохраняющих плазмиду), микробиологическую чистоту и, при необходимости, испытание на присутствие бактериофагов. Могут потребоваться дополнительные специфичные испытания, способные дать значимую информацию. Целесообразность проведения подобных испытаний должна быть рассмотрена в каждом конкретном случае.

Для банков клеток животных установление характеристики должно включать определение морфологии, подлинности, жизнеспособности, генетической стабильности клеток (количество копий, целостность экспрессионной кассеты, способы индукции и контроль экспрессии, подтверждение генетической стабильности на конечной стадии роста и др.). Банки клеток животных должны быть проверены на наличие посторонних агентов, так как клеточные субстраты животных благоприятны для размножения посторонних агентов, таких как микоплазма и вирусы. Кроме того, клеточные линии животных могут содержать эндогенные контаминанты, такие как эндогенные ретровирусы. Стратегия испытаний в отношении посторонних агентов должна быть разработана на основе принципов управления рисками для качества с учетом природы и истории клеточной линии.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ДРУГОЕ ИСХОДНОЕ СЫРЬЕ

Надлежащий контроль качества обеспечивают для культуральных сред и всего исходного сырья (реактивы, сыворотки, добавки и др.), используемых при производстве рекомбинантных продуктов, с учетом их влияния на качество, безопасность и эффективность целевого продукта. В частности, должно быть известно происхождение исходного сырья и задокументирована его прослеживаемость.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СБОР

Банк клеток (например, одну или более ёмкостей РБК или ГБК) используют для начала процесса культивирования. Определяют параметры производственного процесса и порядок внутрипроизводственного контроля (например, для степени удвоения популяции, концентрации клеток, объема, pH, времени культивирования, температуры, микробиологических испытаний) с целью обеспечения надлежащей производительности и чередования этапов процесса культивирования.

Критерии для сбора продукта, а также для завершения культивирования определяет производитель с учетом предельного возраста клеток *in vitro* (например, определенных количеств пассажей или удвоений популяции), при котором клеточный субстрат показал стабильность и способность производить целевой или промежуточный продукт. Каждый сбор продукта проверяют на отсутствие контаминации.

Отсутствие контаминации при производстве с использованием прокариотических клеток или других микроорганизмов подтверждают, в первую очередь, путем испытания на микробиологическую чистоту.

В случае использования клеток животных отсутствие посторонних агентов проверяют с помощью соответствующих методов при культивировании клеток *in vitro* или молекулярно-биологических методов.

ОЧИСТКА

Должно быть подтверждено, что процедуры выделения и очистки позволяют получить планируемые промежуточные продукты надлежащей чистоты. Для этого должен быть проведен анализ процедур, предпринятых как для контроля родственных примесей и родственных соединений, так и для удаления или инактивации производственных примесей и контаминантов.

Для обеспечения постоянства и надлежащего качества процесса очистки устанавливают внутрипроизводственный контроль для соответствующих параметров (перечень контролируемых параметров) и периодичности этапов (например, для выхода, объема, pH, времени обработки, температуры, профиля элюирования и отбора фракций, микробиологических испытаний).

Если применимо, определяют условия и срок хранения промежуточных продуктов или возможности проведения повторной обработки.

ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

В процессе фармацевтической разработки необходимо получить подробную характеристику активной фармацевтической субстанции, включая определение ее структуры, физико-химических свойств, биологической активности, иммунохимических свойств и чистоты.

Характеристика необходима для определения показателей качества важных для безопасности и эффективности лекарственного препарата. Полученная информация обеспечит основу для обоснования перечня показателей качества, включаемых в спецификации на выпуск, оценки стабильности и проведения любых испытаний, которые могут потребоваться для подтверждения приемлемости изменений процесса.

Структура. Необходимо максимально полно охарактеризовать первичную структуру и структуры более высокого порядка целевого продукта, любые

посттрансляционные модификации, например, гликозилирование, а также любые его преднамеренные модификации.

Аминокислотную последовательность устанавливают на основании последовательности ДНК вектора экспрессии и подтверждают испытанием полученного белкового продукта. Аминокислотную последовательность и дисульфидные связи целевого продукта определяют с помощью комбинации методов, например, таких как пептидное картирование (*2.1.2.39*) и масс-спектрометрия (*2.1.2.51*).

Испытания пегилированных белков должны включать в себя определение участка модификации и степени занятости сайта, но не ограничиваться этим.

Характеристика гликозилирования должна включать определение общего состава моносахаридов (нейтральные сахара, аминосахара и сиаловые кислоты), сайтов связывания, типа гликозилирования (например, N- или O-опосредованное), степени занятости сайта и олигосахаридных структур гликановых цепей (удлинения, протяженности, разветвленности, типа соединения) с использованием, например, принципов и методов общей фармакопейной статьи *2.1.2.56 Анализ гликанов в гликопротеинах.*

Особое внимание, в связи с возможной иммуногенностью, необходимо уделить гликановым структурам отсутствующим в природных белках человека или, в случае вакцин для ветеринарного применения, в природных белках целевых видов животных.

Определение конформации белка проводят с использованием физико-химических методов, таких как спектроскопия кругового дихроизма, инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием, флуоресценция, дифференциальная сканирующая калориметрия, спектрометрия протонного ядерного магнитного резонанса и (или) масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена.

Необходимо изучение состава форм белка с различным зарядом (заряженных изоформ). Влияние изоформенного состава на безопасность и эффективность целевого продукта должно быть подтверждено в надлежащих испытаниях.

Биологические испытания, связанные с определением функциональной активности, также могут служить дополнительным подтверждением конформации белка.

Биологическая активность. Биологическую активность (уникальную способность продукта вызывать определенный фармакологический эффект) оценивают биологическими, биохимическими (включая иммунохимические методы) или физико-химическими методами, в зависимости от природы и свойств продукта.

Механизм действия активной фармацевтической субстанции должен быть изучен и охарактеризован, при возможности, в соответствующих испытаниях активности.

Иммунохимические свойства. Если иммунохимические свойства имеют отношение к механизму действия, в частности, для антител, то их необходимо тщательно охарактеризовать (например, определение Fc-эффекторной функции).

Родственные примеси и родственные соединения. Продукты, получаемые с помощью технологии рДНК обычно имеют несколько источников гетерогенности (например, N-концевой или C-концевой процессинг, N-концевое пироглутамирование, дезамидирование, окисление, изомеризация, фрагментация, несоответствие дисульфидных связей, N-гликозилирование и O-гликозилирование, гликирование, агрегация), что приводит к сложному профилю продукта, состоящему из нескольких сходных молекулярных соединений или молекулярных вариантов.

Если безопасность и эффективность молекулярных вариантов сопоставимы с целевым продуктом и не имеют негативного влияния на безопасность и эффективность лекарственного препарата, то такие молекулярные варианты относят к родственным соединениям и не рассматривают в качестве примесей.

Другие молекулярные варианты, которые не обладают сопоставимыми с целевым продуктом безопасностью и эффективностью, рассматривают как родственные примеси.

Методы, используемые для оценки родственных соединений и родственных примесей, должны быть способны выявлять структурные варианты с различными физико-химическими свойствами, например, зарядом, размером и гидрофобностью. Общепринятым подходом является применение комбинации ортогональных методов, например, хроматографических, электрофоретических и спектроскопических.

Определение особенностей молекулярных вариантов продукта по заряду, например, после различного сиалилирования или дезамидирования, выполняют соответствующими методами (капиллярного электрофореза, изоэлектрического фокусирования, ионообменной хроматографии и др.), которые можно использовать совместно с другими методами, например, такими как масс-спектрометрия.

Высокомолекулярные формы белка, такие как димеры и высшие олигомеры, могут быть разделены и количественно определены с помощью методов разделения по размеру (например, эксклюзионной хроматографии, проточного фракционирования в поперечных полях, аналитического ультрацентрифугирования) в сочетании с подходящими методами детектирования (например, ультрафиолетовой спектрофотомерии, флуориметрии, светорассеяния).

Производственные примеси и контаминанты. Примеси, связанные с производственным процессом (производственные примеси), могут включать остаточные белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина и компоненты питательной среды (например, индукторы, антибиотики, сыворотки). Производственные примеси должны быть идентифицированы и оценены качественно и количественно.

Остаточные белки клеток хозяина определяют с помощью чувствительного и надежного испытания, способного обнаруживать широкий спектр белковых примесей, с учетом рекомендаций, приведенных в общей фармакопейной статье *2.1.6.20. Определение остаточных белков клетки-хозяина*.

Остаточную ДНК клеток хозяина определяют с помощью специфичных количественных методов с достаточной чувствительностью.

Примеси, образующиеся в ходе производственного процесса, могут включать ферменты, реактивы (например, гуанидин, красители, окислители и восстановители), соли (например, тяжелых металлов), растворители, лиганды (например, белок А) и другие выщелачиваемые вещества.

Контаминанты и загрязняющие вещества включают в себя все случайно попавшие в продукт вещества, не предназначенные для использования в производственном процессе (например, микроорганизмы, ферменты, бактериальные эндотоксины).

Примеси, связанные с производственным процессом и контаминанты, контролируют с помощью надлежащих стратегий, основанных на принципах управления рисками.

Содержание. Количественное определение проводят с помощью соответствующих физико-химических или иммунохимических методов. Содержание общего белка (выраженное в единицах массы) определяют с помощью нескольких методов, представленных в общей фармакопейной статье *2.1.5.14. Общий белок*.

СТРАТЕГИЯ КОНТРОЛЯ

На основе знаний о рекомбинантном продукте и производственном процессе устанавливают запланированный комплекс мероприятий контроля, обеспечивающих эффективность производства и качество конечной продукции (т.е. стратегию контроля). Стратегия контроля должна включать в себя контроль параметров процесса, контроль в процессе производства, контроль исходного сырья, промежуточных продуктов, активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, а также используемые методы и частоту контроля.

Стратегия контроля должна гарантировать, что характеристики качества, имеющие отношение к безопасности и эффективности, находятся в пределах допустимого диапазона

изменчивости каждого параметра процесса, исходя из степени его влияния на ожидаемое качество лекарственного препарата.

Выбор испытаний и этапов их проведения должен быть основан на знании производственного процесса и всесторонней характеристике целевого продукта, активной фармацевтической субстанции и лекарственного препарата. Часть испытаний отбирают для включения в спецификации. Спецификации на активную фармацевтическую субстанцию и лекарственный препарат, полученных с использованием технологии рДНК, являются одной из частей общей стратегии контроля.

АКТИВНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ СУБСТАНЦИЯ

Для активной фармацевтической субстанции определяют следующие показатели качества: описание, цветность, прозрачность, идентификация, микробиологическая чистота, бактериальные эндотоксины, родственные соединения, профиль примесей, в том числе родственные примеси и производственные примеси, структурная целостность, содержание белка и биологическая активность, при необходимости с проведением сравнения с подходящими стандартными образцами.

Если активная фармацевтическая субстанция включает конъюгированный или химически модифицированный белок (например, пегилированный белок), соответствующие испытания должны быть проведены как для модифицированного, так и для немодифицированного продукта. Проводят испытания для молекулярных вариантов, родственных продукту (например, доля модифицированного и немодифицированного белка) и для производственных примесей, полученных в результате модификации (например, побочные продукты модификации, реагенты) и устанавливают критерии их приемлемости.

ГОТОВАЯ НЕРАСФАСОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

Для получения готового нерасфасованного продукта могут быть объединены одна или несколько серий фармацевтической субстанции. В процессе его получения могут быть добавлены подходящие стабилизаторы или другие вспомогательные вещества.

Лекарственный препарат должен отвечать требованиям соответствующих общих фармакопейный статей для лекарственных форм и частной фармакопейной статьи. Для оценки качества применяют следующие универсальные испытания, представленные ниже.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Испытания на подлинность должны быть специфичными и основаны на уникальных особенностях молекулярной структуры или других свойствах молекулы, таких как размер, первичная структура, изоэлектрический профиль, хроматографические свойства и функциональная конформация. Если возможно, проводят сравнение с соответствующим стандартным образцом. Методы, используемые при определении активности и чистоты, также можно использовать для идентификации.

ИСПЫТАНИЯ

Используют методы, способные определить производственные примеси, родственные примеси и родственные соединения (например, возникающие в результате укорачивания, фрагментации, агрегации, окисления, дезамидирования продукта и др.) и устанавливают критерии их приемлемости. Выбор методов должен быть обоснован. На готовом продукте (лекарственном препарате) допускается не проводить испытания по контролю примесей, если его осуществляют на подходящих более ранних стадиях производства.

Испытания для модифицированных белков. Испытания проводят в зависимости от типа модификации белка в конкретном лекарственном препарате на соответствие установленным пределам содержания.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Содержание. Содержание активной фармацевтической субстанции должно соответствовать пределам, установленным для конкретного лекарственного препарата. Обычно оно основано на определении содержания белка и выражено в единицах массы. Могут быть использованы методы, представленные в общей фармакопейной статье *2.1.5.14. Общий белок*. При необходимости, могут применяться другие методы с использованием подходящего стандартного образца, например, жидкостная хроматография (*2.1.2.28*). Для модифицированных белков количественное определение относится только к белковой части молекулы.

Активность. Активность устанавливают в испытаниях с использованием подходящего стандартного образца и количественно оценивают по сравнению с активностью стандартного образца. Для вычисления и обработки результатов испытаний используют рекомендации общей фармакопейной статьи *2.3.12.0. Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств*.