КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

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

ВВЕДЕНИЕ

Белки клетки-хозяина представляют собой производственные примеси, источником которых является организм-хозяин, используемый 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 нанограммах на миллиграмм действующего (активного) вещества (ppm), должен быть обоснован с учетом эффективности процесса очистки в отношении белков клетки-хозяина и их потенциального влияния на организм пациента, исходя из введения максимального количества остаточных белков клетки-хозяина, вводимых вместе с лекарственным препаратом.

При определении допустимых пределов необходимо помнить, 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.

Количественное 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 количественного 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 ответом на стандартный образец белка клетки-хозяина. При разработке и выборе метода количественного 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. Выбор метода проводят с учетом различных факторов, включая стадию разработки лекарственного препарата, природу клетки-хозяина и иммуногенность белков, тип экспрессии, производственный процесс и предшествующий опыт.

Кроме того, при выборе и разработке методики количественного определения остаточных белков клетки-хозяина необходимо учитывать весь 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 вариации производственного процесса.

Платформенные методы количественного определения

Платформенные методы количественного определения остаточных белков клетки-хозяина разрабатывают производители для индивидуальных 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 (СНО)), 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 раскрыта поставщиком. 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 могли бы 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 клеточной 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 придется выделять 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 щадящему воздействию (фильтрации, концентрированию) с целью получения репрезентативного спектра белков клетки-хозяина. Дальнейшую очистку обычно не рекомендуют, 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 из различных этапов обработки. Возможно увеличение разнообразия антигенов путем объединения материалов, полученных в результате имитации ферментации или очистки с использованием различных производственных условий, или селективных этапов очистки (например, для уменьшения общего количества некоторых иммунодоминантных остаточных белков клетки-хозяина).

Перекрестная контаминация целевым белком

Существенным фактором риска при получении антигенов, используемых в качестве реактивов, является контаминация целевым белком с последующей перекрестной 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, и 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. процесс-специфичный метод количественного определения).

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, хотя 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 поставщик коммерческого набора реактивов. Подробная информация по производству реактивов может быть не раскрыта поставщиком. 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. Тем не менее, общий метод количественного определения должен быть выбран с учетом предполагаемого конкретного производственного процесса (например, подходящая линия клетки-хозяина), и должен быть 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 композиции белков клетки-хозяина, используемой в качестве иммуногена. Иммунный ответ животного должен индуцироваться как высокоиммунными, так и низкоиммунными антигенами.

Выбирают животное, позволяющее получать достаточное количество и разнообразие специфического к белкам клетки-хозяина иммуноглобулина G (IgG).

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 состояния системы иммунитета и обеспечить дополнительное разнообразие ответов, что обеспечит максимальный охват антителами против антигенов белка клетки-хозяина.

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

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

Иммунный ответ на белки клетки-хозяина для данной схемы иммунизации необходимо контролировать 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 второстепенные 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 иммунный реактив, содержащий антитела, одновременно и специфически распознавал как можно больше отдельных молекул в образце, и чтобы он присутствовал в стехиометрическом избытке. Для этой цели серии разведений исследуемых образцов, полученных на разных стадиях производственного процесса, предварительно оценивают 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 до начала проведения испытания.

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 необходимо хранить 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 методы с использованием нативных условий.

ОБЩИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Иммунизацию, очистку и производство антител к белкам клетки-хозяина выполняет поставщик 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 испытания на остаточные белки клетки-хозяина разработан для 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 «фоновом» матриксе (например, активная фармацевтическая субстанция или образец с соответствующего этапа очистки).

Специфичность

Специфичность подтверждают отсутствием интерференции со стороны матрикса (содержащего активную фармацевтическую субстанцию). Для оценки специфичности могут быть использованы результаты проверки правильности.

Прецизионность

Как и для любой другой методики количественного определения, повторяемость, промежуточная прецизионность и воспроизводимость должны быть соответствующим образом подтверждены.

Предел количественного определения и предел обнаружения

Чувствительность обычно находится в диапазоне частей на миллион (ppm) и обычно выражается через предел количественного определения. Предел количественного определения обычно определяют методом добавок белков клетки-хозяина в активную фармацевтическую субстанцию или в соответствующую пробу матрикса 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 излишком 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 достаточно большим, 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 сделать реактивы непригодными для использования в испытании.

Вновь приготовленные реактивы должны быть тщательно охарактеризованы (например, сочетанием методов двумерного электрофореза 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 2.6.34.-1. – Рекомендации по оценке пригодности реактивов и оценке валидационных характеристик методики иммунологического испытания в случае истощения запаса используемых реактивов или внесения изменения в производственный процесс

	Реактив		Изменения в производственном процессе
	Антигены или стандартный образец белка клетки-хозяина	Антитела к белкам клетки-хозяина	
Оценка пригодности	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	Определяют общую концентрацию белка новой серии антител. Конечную концентрацию для количественного определения необходимо оттитровать для новой серии, чтобы получить такую же калибровочную кривую, что и для текущей (одобренной) серии реактива. Для детектирующих антител с меткой (вторичные антитела)	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). Если изменение производственного процесса не приводит к

	<p>дифференциальный гель-электрофорез) оценивают сходство совокупностей видов белков между новой серией и текущей (одобренной) серией реактивов.</p>	<p>контролируют стехиометрию белков для подтверждения аналогичности текущей (одобренной) серии антител. Иммунореактивность новой серии антител сравнивают качественно (путем визуального сравнения) 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>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</p>
--	--	--	--

			процессом и новую иммунизацию.
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. Сокращенное исследование проводят с испытанием соответствующих технологических образцов (например, начиная от стадии очистки полупродукта 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.
Оценка валидационного статуса	Если проверка пригодности реактивов и испытания ИФА показали соответствие нового стандартного образца белков клетки-хозяина, текущий (одобренный) стандартный образец может быть заменен. Повторная валидация методики испытания не требуется.	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. Если новая серия антител значительно	Если для нового производственного процесса текущая (одобренная) серия антител показывает аналогичную или более высокую иммунореактивность по сравнению с предыдущим процессом, и результат количественного определения остаточных белков клетки-хозяина

	<p>Если новый стандартный образец белков клетки-хозяина значительно отличается по совокупности видов белков и (или) по рабочим характеристикам в количественном определении от текущего (одобренного) стандартного образца, требуется повторная валидация методики.</p>	<p>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>подтверждает 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. Если ИФА обнаруживает существенные различия в открываемости 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</p>
--	---	---	--

			<p>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>
--	--	--	---