

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТАТОЧНОЙ ДНК КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

Настоящая 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. Это не исключает возможности использования альтернативных подходов при согласовании с уполномоченным органом.

ВВЕДЕНИЕ

Для количественного 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 2.6.35.-1.

Таблица 2.6.35.-1. – Сравнение методов кПЦР-РВ (метод 1) и
иммуноферментного анализа (метод 2)

Характеристики	Метод 1	Метод 2
Может быть использована для оценки распределения по размеру ДНК	Да	Нет
Предел количественного определения (зависит от матрицы, используемого метода и мешающих веществ)	(0,01 – 10) пг/мл	(2 – 10) пг/мл
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/лунка.
-------------	---	---

ПРОБОПОДГОТОВКА

Концентрация остаточной ДНК клетки-хозяина существенно зависит от вида биотехнологического лекарственного средства, от биотехнологии 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-хозяина 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). Остаточная ДНК клетки-хозяина извлекается 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 независимых процедур выделения. В каждую процедуру выделения должны быть включены отрицательные контроли. В некоторых случаях рекомендуется разведение растворов образцов для уменьшения эффекта матрицы. Также может быть применен поправочный коэффициент, учитывающий открываемость добавки.

МЕТОД 1 – КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ кПЦР-РВ

Этот метод может быть использован для количественного определения целевой последовательности клеточной ДНК, выделенной из различных испытуемых образцов. Для количественного 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 направленности на повторяющиеся элементы, потенциальный фоновый шум ДНК из окружающей среды может быть трудно устраним (например, при использовании Alu последовательностей человеческого генома). 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 можно использовать цифровые методы ПЦР.

Амплификация

Обнаружение и количественное 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 **2.6.21. Методы амплификации нуклеиновых кислот.**

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

Если выполняется несколько выделений, то извлеченные пробы, при необходимости, после подходящего разбавления, должны иметь сопоставимую концентрацию ДНК клетки-хозяина.

Используют образцы для отрицательного контроля ПЦР.

Стандартную кривую строят с использованием серий разведений образцов 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 применяется для оценки распределения по размеру остаточной ДНК клетки-хозяина. Для амплификации перекрывающихся фрагментов разного размера в целевой последовательности нуклеотидов могут быть использованы как минимум 2 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), добавляют в испытуемый образец в определенной концентрации или количестве копий целевой последовательности. В этом случае ампликоны должны иметь четко определяемые различия и возможность быть обнаруженными в отдельном испытании методом кПЦР-РВ. В качестве альтернативы можно использовать образец для внешнего контроля, состоящий 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 определенного 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 откорректирован 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). Таким образом 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 обрабатываться в контролируемых условиях до этапа денатурации.

Данный метод обнаруживает одноцепочечную ДНК.

Принцип

Количественное определение общей ДНК данным методом состоит из 4 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 стрептавида 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. Неспецифического связывания можно избежать за счет использования нитроцеллюлозной мембраны, покрытой альбумином.

– *детектирование* – мембрану помещают в планшетный спектрофотометр, содержащий раствор мочевины, реагирующий с уреазой в комплексе ДНК с образованием аммиака. Соответствующее изменение pH измеряется потенциометрическим датчиком (в милливольт в секунду) и 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 в сертификате партии, предоставленном 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 заданного 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:

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

где: *ID* – коэффициент разведения;

C – исходное (необработанное) среднее значение (в пикограммах на пробирку) для пробирок, содержащих разведенный 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, данный результат может быть откорректирован с учетом открываемости при выделении (например, средней открываемости для данного продукта).