

Номер. ИСПЫТАНИЕ НА АКТИВАЦИЮ МОНОЦИТОВ

Настоящая фармакопейная статья представляет методы для обнаружения или количественного 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» 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 испытуемом 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-эффект, в сравнении с кривыми зависимости доза-эффект 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, утверждённая 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:

$$\frac{\text{Предельное содержание пирогенов} \times \text{Концентрация испытуемого раствора}}{\text{Предел обнаружения}}$$

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:

$$\frac{K}{M}$$

где К – предельная пирогенная доза бактериального эндотоксина из расчета на килограмм массы тела,

М – максимальная разовая доза испытуемого лекарственного препарата из расчета на килограмм массы тела.

В случае введения лекарственного препарата через частые интервалы или инфузионно, в качестве «М» используют общую максимальную дозу, вводимую 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, и концентрацию испытуемого раствора выражают:

- 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-эффект 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 сыворотки 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 ± 1) °С в подходящей атмосфере для культуральной среды, например, увлажненном воздухе с 5 % CO₂. 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, депирогенизируют в стерилизационном воздушном шкафу с использованием валидированной процедуры. Общепринятым минимальным режимом депирогенизации является нагревание при температуре 250 °С не менее 30 мин. 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-эффект для пула с использованием растворов стандартного образца эндотоксина не менее чем в четырех разведениях, например, в диапазоне от 0,01 МЕ/мл до 4 МЕ/мл.

Кривые доза-эффект 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 статуса 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-эффект 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-эффект 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 Ig дозы должна быть статистически значима ($p < 0,01$);
- регрессионная зависимость ответов на Ig дозы не должна существенно отличаться от линейности ($p > 0,05$) (номер. *Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств*).

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 добавленным 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 приемлимости. 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/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-эффект для испытуемой и контрольной серий. В таком случае, растворы испытуемых

образцов испытывают в 3 или более геометрических разведениях, которые охватывают диапазон кривой доза-эффект, используемый для выбранного испытания (*номер. Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств*).

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 номер-1. Квалифицированные клетки культивируют в четырех повторностях с каждым из растворов.

Таблица номер-1.

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

Примечания: 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 R₁–R₄ – растворы стандартного образца эндотоксина в концентрациях, использованных в испытании на мешающие факторы.

7.1.2. Вычисления и обработка результатов

Для обработки результатов используют данные, относящиеся к клеткам, соответствующих 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, АS, ВS и СS 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 АS, ВS и СS, 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 растворов 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 моноцитарных 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 номер-2. Квалифицированные клетки культивируют с каждым из растворов в четырех повторностях.

Таблица номер-2.

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

Примечания:

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.

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 R₀-R₄ увеличиваются в прогрессии. Среднее значение откликов на R₀ может быть равным среднему значению откликов на R₁. Для каждого конкретного источника клеток, среднее значение откликов на раствор R₂ должно быть больше положительного предельного значения. Результаты ниже этого положительного предельного значения рассматриваются как отрицательный отклик. Если среднее значение ответных реакций на R₁ или R₂ 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 R₃.

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 такие 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 приемлимости. 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 предполагается, 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 номер-3. Квалифицированные клетки культивируют с каждым из растворов в четырех повторностях.

Таблица номер.-3.

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

Примечания:

f, f_1, f_2 – степень разведения раствора.

Растворы А, В и С – 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 R_0 – растворитель, используемый для разведения испытуемого лекарственного средства; отрицательный контроль.

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-эффект 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 такие 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, неизвестна. 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-эффект (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 испытываться 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-эффект 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:

$$\frac{K}{M},$$

где К – предельная пирогенная доза бактериального эндотоксина из расчета на килограмм массы тела,

М – максимальная разовая доза испытуемого лекарственного препарата из расчета на килограмм массы тела.

В случае введения лекарственного препарата через частые интервалы или инфузионно, в качестве «М» 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 (К) приведены в таблице номер-4.

Таблица номер-4.

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
Инtrateкальный	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

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 *номер. Рекомендации по применению испытания на бактериальные эндотоксины*, указано, что испытание на активацию моноцитов следует проводить для лекарственных средств, где нельзя исключать 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) должны 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 *номер Испытание на активацию моноцитов*, для оценки лекарственного средства, являющегося предметом 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 *Пирогенность*, 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 должна 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.