

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОСТАВКИ ГЕНОВ

Настоящая общая фармакопейная статья приводится для информации.

Данная общая фармакопейная статья содержит описание лекарственных средств для медицинского применения с использованием доставки (переноса) генов на основе рекомбинантных векторов и генетически модифицированных клеток, и представляет требования, применимые к их производству и контролю.

Информация предназначена для применения к зарегистрированным лекарственным средствам; необходимость использования части или всей информации к продуктам на различных этапах клинических испытаний определяет уполномоченный орган. Положения данной общей фармакопейной статьи не исключают использования альтернативных способов производства и методов его контроля, приемлемых для уполномоченного органа.

Более подробные рекомендации по лекарственным средствам с использованием доставки генов содержатся в Руководствах, входящих в право Союза (включая любые последующие изменения документов).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Для целей настоящей общей фармакопейной статьи под лекарственным средством с использованием доставки генов на основе рекомбинантных векторов и генетически модифицированных клеток понимается продукт, полученный в результате высокотехнологических процессов, направленных на передачу гена (генов) *in vivo* или *ex vivo* в клетки человека или животных и его последующую экспрессию *in vivo*.

Лекарственные средства с использованием доставки генов на основе рекомбинантных векторов и генетически модифицированных клеток применяют для:

- регулирования, репарации, замены, вставки или удаления нуклеотидной последовательности в терапевтических, профилактических или диагностических целях;
- реконструкции, восстановления и (или) формирования структуры или функции органа для предотвращения заболеваний человека;
- селективного уничтожения опухолевых клеток в организме пациента.

Их активность непосредственно связана с последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты или с продуктом, экспрессированным последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Генетический материал для доставки состоит из нуклеотидных последовательностей, которые могут, в частности, кодировать белки, антисмысловые транскрипты или рибозимы. Генетический материал может находиться в цитоплазматической или эписомальной форме, а также может быть интегрирован в геном клетки-хозяина в зависимости от интегрирующего или неинтегрирующего типа вектора. Доставку генетического материала осуществляют с помощью векторов вирусного или невирусного происхождения. Вектор может быть внедрен в клетку человека или животного. Векторы могут быть предназначены для включения в состав готового продукта или являться исходным материалом, в том числе

для вакцин. Принципы производства и контроля качества вирусных векторов, изложенные в данной фармакопейной статье, могут быть использованы для вакцин на основе векторов.

Рекомбинантные векторы: вирусные векторы и плазмиды. Рекомбинантные векторы вводят непосредственно в организм пациента (перенос генов *in vivo*) или в клетку-хозяина перед введением генетически модифицированных клеток пациенту (*ex vivo* передача генов), например, клетки, взятые у пациента (донора), генетически модифицируют с использованием векторов, а затем вводят обратно пациенту.

Рекомбинантные векторы могут быть вирусными векторами, онколитическими вирусами, векторами нуклеиновых кислот или генетически модифицированными клетками и микроорганизмами:

- вирусные векторы получают на основе различных вирусов (например, аденовирусов, поксвирусов, ретровирусов, лентивирусов, аденоассоциированных вирусов, герпесвирусов). Векторы могут быть реплицирующимися, нереплицирующимися или условно реплицирующимися.

- онколитические вирусы представляют собой генетически модифицированные вирусы, избирательно инфицирующие и уничтожающие опухолевые клетки;

- векторы нуклеиновых кислот могут включать в состав векторы на основе ДНК (например, плазмидные векторы) и векторы на основе РНК, как в простой форме (например, «голые» нуклеиновые кислоты), так и в комплексе с различными молекулами (например, синтетические векторы, совмещенные с молекулами, такими как липиды или полимеры, или наночастицами);

- генетически модифицированные микроорганизмы представляют собой рекомбинантные клетки микроорганизмов, например, бактерий.

Генетически модифицированные клетки. Генетически модифицированные эукариотические клетки могут быть аутологичными, аллогенными или ксеногенными клетками, модифицированными перед введением пациенту.

Генетическую модификацию эукариотических или бактериальных клеток осуществляют с помощью векторов для экспрессии целевого продукта.

Данная общая фармакопейная статья не распространяется на химически синтезированные олигонуклеотиды.

ПРОИЗВОДСТВО

Исходное сырье и исходные материалы, используемые в производстве. Исходное сырье, используемое в производственном процессе, включая вирусный посевной материал и создание банка клеток, если применимо, валидируют. Все используемые вещества производят в рамках признанной системы менеджмента качества с использованием соответствующих производственных мощностей, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа. Спецификации устанавливают для контроля, в частности, подлинности, эффективности и, если применимо, чистоты и безопасности с точки зрения микробиологического качества и контаминации эндотоксинами. Качество используемой воды должно соответствовать требованиям частных фармакопейных статей *Вода очищенная*, *Вода для инъекций*. Если используют сыворотку крупного рогатого скота, она должна соответствовать частной фармакопейной статье *Сыворотка крупного рогатого*

ската. В производственном процессе следует избегать использования антибиотиков везде, где возможно.

Вирусная безопасность (2.3.1.3). Применяют требования общей фармакопейной статьи *Вирусная безопасность*.

Трансмиссивные агенты губчатой энцефалопатии (5.2.8). Проводят оценку риска в отношении передачи агентов губчатой энцефалопатии и принимают соответствующие меры для минимизации таких рисков.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВЕКТОРЫ

ПРОИЗВОДСТВО

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Производство вирусных векторов основано на системе банков клеток и системе вирусных посевных материалов, если применимо.

Производство плазмидных векторов основано на системе банков бактериальных клеток.

Необходимо документально подтвердить постоянство получения плазмидного вектора надлежащего качества в производственном процессе.

Вектор целевого продукта должен пройти не больше числа пассажей (удвоения популяций) или субкультивирований главной посевной культуры, чем вектор, признанный в ходе клинических испытаний удовлетворительным с точки зрения безопасности и эффективности, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа.

КЛЕТОЧНЫЙ СУБСТРАТ ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ ВЕКТОРОВ

Используемые клеточные субстраты должны отвечать соответствующим требованиям Ф ЕАЭС (5.2.2, 5.2.3).

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕКТОРА

Информация о создании вектора должна быть задокументирована, включая происхождение вектора и последующие манипуляции с ним, в частности, удаленные или измененные участки. Вектор характеризуют с помощью подходящих валидированных методик. Необходимо подтвердить генетическую стабильность вектора подходящими методами на максимальном уровне удвоения клеточной популяции или числа генераций, используемых при производстве (клетки предельного для производства клеточного возраста *in vitro*).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СБОР

Должно быть полностью исключено проведение культивирования и сбора биомассы в одних и тех же помещениях или зонах одновременно с проведением манипуляций с другими банками клеток или векторами.

Любой материал человеческого или животного происхождения, используемый при получении клеточных суспензий и культуральных сред должен быть квалифицирован. Чистоту сбора проверяют с помощью подходящих испытаний, как указано в соответствующих разделах данной общей фармакопейной статьи.

ОЧИСТКА СБОРА

Нерасфасованный обработанный сбор представляет собой серию очищенных рекомбинантных векторов (вирусные векторы, «голые» или комплексные плазмиды).

ГОТОВЫЙ ПРОДУКТ (ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ)

Наполнение и укупорку целевого готового продукта (лекарственного препарата) осуществляют в асептических условиях с использованием стерильной упаковки (3.2), при отсутствии других указаний. Стабильность серии готового продукта (лекарственного препарата) оценивают с использованием протоколов стабильности, включающих продолжительность, условия хранения, количество серий, подлежащих испытанию, график испытаний и испытания, которые должны быть выполнены.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИСПЫТАНИЯ

Количественное определение и испытания для лекарственных средств с использованием компонентов доставки генов должны соответствовать требованиям, представленным в соответствующих разделах данной общей фармакопейной статьи.

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

Для клеток, модифицированных с помощью рекомбинантного вектора, требования, относящиеся к вектору, представлены в разделе *Рекомбинантные векторы* данной общей фармакопейной статьи.

ПРОИЗВОДСТВО

КЛЕТОЧНЫЙ СУБСТРАТ

Для получения ксеногенных клеточных линий, включая бактериальные клетки, используют систему банков клеток, состоящую из ГБК и РБК.

Для аутологичных и аллогенных клеток, если применимо, создают систему банков клеток, включающую ГБК и РБК.

ТРАНСФЕКЦИЯ ИЛИ ТРАНСДУКЦИЯ

Перенос генов в клетки осуществляют с помощью трансфекции или трансдукции с рекомбинантным вектором (плазмидным или вирусным), охарактеризованным как описано в разделе *Рекомбинантные векторы* данной общей фармакопейной статьи; процесс должен быть валидирован. Работы с модифицированными клетками осуществляют в асептических условиях в помещениях или зонах, где полностью исключено проведение одновременных манипуляций с другими клетками или векторами.

Все реактивы, используемые на этапах манипуляций с клетками, должны быть квалифицированы. Следует избегать использования антибиотиков, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа. Трансфекцию или трансдукцию проводят в асептических условиях.

ГОТОВЫЙ ПРОДУКТ (ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ)

Жизнеспособность генетически модифицированных клеток при криогенном хранении оценивают перед криоконсервацией и после размораживания.

Если клетки не используют в течение короткого периода времени, стабильность определяют путем проверки жизнеспособности клеток и экспрессии генетической вставки.

Для генетически модифицированных клеток, инкапсулированных перед имплантацией человеку, любой инкапсулирующий компонент используют как часть готового продукта (лекарственного препарата), и, вследствие этого, контролируют его качество и полностью характеризуют (например, представляют данные о физической целостности, селективной проницаемости, стерильности).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИСПЫТАНИЯ

Контроль ксеногенных, аллогенных или аутологичных клеток включает следующее:

- идентификацию, определение количества и жизнеспособности клеток;
- общую целостность, функциональность, количество копий на клетку, перенос и эффективность экспрессии генетической вставки;
- микробиологический контроль (2.1.6.1 или 2.6.27), содержание эндотоксинов, контаминацию микоплазмами (2.6.7), занесенными вирусами (непреднамеренно привносимыми посторонними вирусами) и, если применимо, генерацию репликативных векторов.

Уполномоченный орган может утвердить сокращенную программу испытаний, если это необходимо в связи с ограниченной доступностью клеток. Если существуют ограничения по сроку хранения, готовый продукт (лекарственный препарат) может быть одобрен к выпуску до завершения некоторых выпускающих испытаний, например, стерильности.

ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Плазмидные векторы для медицинского применения представляют собой лекарственные средства, содержащие кольцевые двуцепочечные ДНК, представленные в лекарственной форме растворы или лиофилизаты. Плазмидные векторы могут иметь в своем составе интересующий (терапевтический) ген или нуклеотидную последовательность, кодирующие антисмысловые последовательности нуклеотидов или рибозимы и их кассеты экспрессии. Их используют для доставки генетического материала в соматические клетки человека *in vivo* или для генетической модификации аутологичных, аллогенных, ксеногенных или бактериальных клеток перед введением в организм человека. Плазмидные векторы могут быть представлены в виде простой «голой» ДНК или могут быть совмещены с синтетическими системами доставки, такими как липиды (липоплексы), полимеры (полиплексы), наночастицы и (или) пептидные лиганды, которые облегчают перенос через клеточную мембрану и доставку в клетку или направленную доставку через специфичные рецепторы.

Данная общая фармакопейная статья не распространяется на плазмиды, совмещенные

с использованием синтетических систем доставки.

ПРОИЗВОДСТВО

КОНСТРУКЦИЯ ПЛАЗМИД

Типичный плазмидный вектор состоит из:

- основы, которая содержит несколько сайтов рестрикции для вставки генов и бактериальных компонентов, необходимых для производства плазмиды, таких как маркеры селекции для идентификации клеток, несущих рекомбинантный вектор;
- необходимых регуляторных генетических элементов для экспрессии генетической вставки;
- генетической вставки;
- сайта полиаденилирования (сигнала полиаденилирования).

Установление характеристик ДНК плазмиды должно включать определение нуклеотидной последовательности, подлинности и источника происхождения, способа выделения, нуклеотидной последовательности генетической вставки. Информация об источнике и функциональных компонентах плазмиды, таких как ориджин репликации (сайт начала репликации), вирусные и эукариотические промоторы и гены, кодирующие маркеры селекции должна быть задокументирована.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Клеточные банки. Производство плазмидных векторов основано на системе бактериальных клеточных банков с созданием ГБК, РБК и банка производственных клеток, в соответствии с указаниями раздела *Бактериальные клетки, используемые для производства плазмидных векторов* данной общей фармакопейной статьи. Исходное сырье, используемое в процессе производства, включая создание банка клеток, должно быть квалифицировано (иметь подтверждение пригодности для применения по назначению).

Методы выделения. Необходимо обеспечить надлежащий отбор плазмид с генетической вставкой (интегрантов). В конструкцию плазмидного вектора в качестве генетических маркеров селекции не включают гены устойчивости к антибиотикам, широко используемые в клинической практике, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа. Для выделения рекомбинантной плазмиды предпочтительно использовать другие методы отбора.

Стандартные образцы. В качестве стандартного образца в рутинных испытаниях используют подходящую серию готовой плазмиды, полностью охарактеризованную и предпочтительно прошедшую клиническую оценку.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СБОР

Плазмидную ДНК интегрируют в бактериальные клетки-хозяина, и один клон трансформированных бактерий размножают для создания ГБК. Затем из ГБК получают РБК. Банк производственных клеток получают из РБК путем культивирования в условиях производственного процесса.

Плазмидную ДНК выделяют из сбора клеток с помощью экстракции и очищают для получения продукта.

Градиенты плотности хлорида цезия и бромистого этидия не используют в производстве, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа.

ОЧИСТКА ПЛАЗМИДЫ

Производственный процесс должен быть оптимизирован для последовательного удаления примесей при сохранении активности продукта. Требования к испытанию на наличие определенной примеси зависят от следующих факторов:

- способности стадии очистки удалять или инактивировать примеси, подтвержденной методами количественного определения при валидации производственного процесса;
- потенциальной токсичности, обусловленной примесью;
- потенциального снижения эффективности продукта с генетической вставкой, обусловленного примесью.

Если для отбора плазмид с генетической вставкой использовали селективную резистентность к антибиотикам (гены антибиотикорезистентности), для подтверждения возможности процесса удалять остаточные антибиотики необходимо проводить валидацию процедур очистки.

Для обеспечения постоянства и надлежащего качества процесса очистки устанавливают внутрипроизводственный контроль для соответствующих параметров (перечень контролируемых параметров), например, количества и формы плазмид, содержания бактериальных эндотоксинов после этапов экстракции.

В дальнейшем, можно использовать в производственном процессе только серию очищенных плазмид, которая выдерживает требования следующих испытаний.

Идентификация и целостность очищенной плазмиды. Подлинность и целостность очищенной плазмиды устанавливают с помощью подходящих методов, например, методов секвенирования или амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21); рестрикционный анализ используют в случаях, где его применения достаточно для обнаружения потенциальных критических модификаций плазмиды и подтверждения ее подлинности.

ДНК плазмиды. Следующие указания приведены в качестве примеров. Концентрацию ДНК более 500 нг/мл можно определять с помощью измерения поглощения (оптической плотности) при длине волны 260 нм. Раствор 50 мкг/мл двуцепочечной ДНК имеет коэффициент поглощения 1 (удельный коэффициент поглощения 200).

Концентрацию ДНК менее 500 нг/мл определяют после инкубации с флуоресцентными красителями, специфически связывающихся с двуцепочечной ДНК, используя стандартный образец ДНК для построения калибровочной кривой. Жидкостную хроматографию также можно использовать для определения концентрации ДНК плазмиды с использованием стандартного образца. В некоторых случаях, допустимо использование капиллярного электрофореза.

Формы ДНК. ДНК плазмиды характеризуют по соотношениям суперскрученных (суперспиральных), мультимерных, релаксированных мономерных и линейных форм, с помощью подходящих аналитических методов, примеры которых приведены ниже в разделе данной общей фармакопейной статьи. Для количественного определения суперскрученных форм можно использовать анионообменную высокоэффективную жидкостную хроматографию или капиллярный электрофорез. Капиллярный электрофорез также подходит для количественного определения других форм ДНК.

Остаточная ДНК клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточной ДНК клетки-хозяина определяют с использованием подходящего метода. Подходящим методом считают количественную ПЦР, как специфичный метод с высокой чувствительностью, но могут быть использованы и другие методы.

Остаточная РНК. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, определяют содержание остаточной РНК. Если необходимо определение нижней границы предела обнаружения, можно использовать методы высокоэффективной жидкостной хроматографии или ПЦР с обратной транскрипцией (2.6.21).

Остаточные белки клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточных белков клетки-хозяина определяют с помощью стандартных методов определения общего белка (2.1.5.14), электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом и последующим окрашиванием серебром или специфичных иммунологических методов, например, вестерн-блоттинга или твердофазного иммуноферментного анализа.

Микробиологический контроль. В зависимости от конкретного используемого готового продукта (лекарственного препарата), продукт должен или выдерживать требования испытания на стерильность (2.1.6.1) или необходимо определение бионагрузки (2.1.6.6).

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предельное содержание, установленное для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

ГОТОВЫЙ НЕРАСФАСОВАННЫЙ ПРОДУКТ

Для получения готового нерасфасованного продукта могут быть объединены несколько серий очищенной плазмиды. В процессе его получения могут быть добавлены подходящие стабилизаторы или другие вспомогательные вещества. Готовый нерасфасованный продукт фильтруют через фильтр, не пропускающий бактерии. При подготовке серии готового продукта (лекарственного препарата) может быть использован только готовый нерасфасованный продукт, соответствующий следующим требованиям.

Стерильность (2.1.6.1). Готовый нерасфасованный продукт должен выдерживать требования испытания на стерильность.

ГОТОВЫЙ ПРОДУКТ (ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ)

К выпуску может быть допущена серия готового продукта (лекарственного препарата), выдерживающая требования следующих испытаний, приведенных ниже в разделах *Идентификация*, *Испытания* и *Количественное определение* данной общей фармакопейной статьи.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Определение подлинности плазмидного вектора проводят с помощью методов рестрикционного анализа или секвенирования. Методы используемые при определении активности, также можно использовать для идентификации плазмидного вектора.

ИСПЫТАНИЯ

Испытания, проводимые на серии готового продукта (лекарственного препарата) включают в себя следующее.

рН (2.1.2.3). Значение рН должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Извлекаемый объем (2.1.9.9). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на извлекаемый объем.

Вода (2.1.5.12). Содержание воды должно соответствовать пределам, установленным для конкретного лиофилизированного готового продукта (лекарственного препарата).

Формы ДНК. Процентное содержание специфичной мономерной суперскрученной формы определяют так, как описано для очищенной плазмиды в данной общей фармакопейной статье.

Стерильность (2.1.6.1). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на стерильность.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предельное содержание, установленное для конкретного готового продукта (лекарственного препарата.)

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

ДНК плазмиды. Должно быть не менее количественного содержания, указанного на этикетке, определенного, например, одним из следующих методов. Концентрацию ДНК более 500 нг/мл определяют с помощью измерения поглощения (оптической плотности) при длине волны 260 нм. Раствор 50 мкг/мл двуцепочечной ДНК имеет коэффициент поглощения 1 (удельный коэффициент поглощения 200).

Концентрацию ДНК менее 500 нг/мл определяют после инкубации с флуоресцентными красителями, специфически связывающихся с двуцепочечной ДНК, используя стандартный образец ДНК для построения калибровочной кривой. Жидкостную хроматографию также можно использовать для определения концентрации ДНК плазмиды с применением стандартного образца. В некоторых случаях также допустимо использование капиллярного электрофореза.

Биологическая активность. В соответствующих случаях, биологическую активность определяют с помощью методов *in vitro* или *in vivo*. В качестве положительного контроля для испытания необходим хорошо зарекомендовавший себя репрезентативный стандартный образец. Биологические испытания, используемые для определения активности плазмидных векторов, обычно включают трансфекцию соответствующей клеточной линии *in vitro* с последующей оценкой функциональности экспрессии генетической вставки. Оценка функциональности предоставляет информацию об активности целевого продукта, кодируемого генетической вставкой, а не об уровне экспрессии самой генетической вставки.

Для определения целостности и количества экспрессируемого продукта могут потребоваться дополнительные испытания с помощью методов вестерн-блоттинга и твердофазного иммуноферментного анализа.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- количественное содержание ДНК плазмиды;
- рекомендуемую терапевтическую дозу для медицинского применения;
- дополнительно, для лиофилизированных лекарственных препаратов:
 - название и объем добавляемой жидкости для восстановления;
 - время, в течение которого продукт должен быть использован после восстановления.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРОВ

Производство плазмидных векторов для медицинского применения основано на системе бактериальных посевных материалов с использованием ГБК, РБК и банка производственных клеток.

Главный банк бактериальных клеток для производства плазмидных векторов представляет собой набор емкостей, содержащих гомогенную суспензию из бактериальных клеток, полученных из одного клона трансформированной клетки-хозяина, хранящийся в заданных условиях. ГБК должен иметь задокументированную историю; предпочтительно его получение из квалифицированного источника (хранилища). РБК получают культивированием клеток из одной или нескольких емкостей ГБК. Необходимо документировать всю информацию о методах, реактивах, материалах и компонентах, используемых для получения банка клеток и условия их хранения.

ГБК и РБК квалифицируют путем испытания аликвоты, хранящегося в банке материала или испытания субкультуры банка клеток.

В следующей таблице указаны испытания, необходимые на каждом этапе производственного процесса.

Таблица -номер.1

Испытание	Штамм клетки-хозяина	ГБК	РБК	БПК*
Идентификация и чистота				
Жизнеспособность	+	+	+	+
Характеристика бактериального штамма	+	+	—	+
Генотипирование	+	+	—	+
Наличие плазмиды				
Последовательность нуклеотидов ДНК плазмиды	—	+	—	+
Количество копий	—	+	+	+
Карта рестрикции	—	+	+	+
Процент клеток, сохраняющих плазмиду	—	+	+	+
Посторонние агенты				
Микробиологическая чистота	+	+	+	+
Наличие бактериофага	+	+	—	+

**БПК – банк производственных клеток, клетки с номером пассажа, по крайней мере, эквивалентным используемым в производственном процессе. Испытание должно быть проведено один раз для подтверждения каждого нового БПК, за исключением чистоты, которая должна проверяться для каждого этапа культивирования.*

ИСПЫТАНИЯ ИДЕНТИЧНОСТИ И ЧИСТОТЫ

Жизнеспособность. Количество жизнеспособных клеток определяют путем нанесения разбавленной аликвоты бактериальных клеток на соответствующую среду и подсчета отдельных колоний.

Биохимическая и физиологическая характеристика штаммов бактерий. В зависимости от используемого бактериального штамма в производственном процессе проводят соответствующие биохимические и физиологические испытания для подтверждения идентичности клеток на видовом уровне.

Генотипирование. Генотип бактериальных клеток верифицируют путем соответствующего генетического анализа.

Наличие плазмиды

Секвенирование. Верифицируют всю нуклеотидную последовательность плазмиды.

Количество копий. ДНК плазмиды выделяют и очищают из известного числа бактерий и количество копий определяют подходящим методом, например, количественной ПЦР (2.6.21).

Карта рестрикции. Для подтверждения неизменности состава плазмиды в бактериальных клетках проводят расщепление рестрикционной эндонуклеазой с достаточной разрешающей способностью.

Количество клеток, сохраняющих плазмиду. Бактериальные компоненты, присутствующие в плазмиде, например, маркеры селекции, используют для определения количества бактерий, удерживающих плазмиду.

ПОСТОРОННИЕ АГЕНТЫ И ЭНДОГЕННЫЕ ВИРУСЫ

Микробиологическая чистота. Бактериальные клетки высевают на подходящую твердую среду и инкубируют в необходимых условиях для обнаружения потенциальной контаминации. Для проверки ингибирования роста контаминирующих микроорганизмов проводят дополнительные испытания в присутствии определенного количества соответствующих контрольных бактерий (положительный контроль). Исследуют необходимое количество колоний; контаминация не должна обнаруживаться.

Наличие бактериофага. Для проверки наличия бактериофагов бактериальные клетки высевают и инкубируют в питательной среде, обеспечивающей рост бактериофагов. Испытание подтверждают использованием стандартного штамма бактериофага и пермиссивных клеток в качестве положительного контроля. Исследуют необходимое количество колоний; контаминация не должна обнаруживаться.

АДЕНОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Аденовирусные векторы для медицинского применения представляют собой лекарственные средства, состоящие из рекомбинантных аденовирусов, генетически модифицированных для доставки генетического материала в соматические клетки человека *in vivo* или *ex vivo*, в лекарственной форме растворы или лиофилизаты.

ПРОИЗВОДСТВО

КОНСТРУКЦИЯ ВЕКТОРА

Существуют различные подходы к проектированию и конструированию аденовирусного вектора. Какой подход будет оптимальным определяется целью клинического применения. Выбирают метод, который минимизирует риск получения репликативно-компетентных аденовирусных векторов или эффективно устраняет вирусы-помощники, которые могут быть использованы в производственном процессе.

ПРОИЗВОДСТВО ВЕКТОРА

Необходимо подтвердить постоянство получения вектора надлежащего качества в производственном процессе. Вектор в готовом продукте (лекарственном препарате) должен пройти не больше пассажей из посевного материала, чем было использовано для получения вектора, признанного удовлетворительным с точки зрения безопасности и эффективности в клинических испытаниях, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа.

Генетическую и фенотипическую стабильность вектора, используемого в производственном процессе, оценивают подходящими методами на максимальном пассаже или выше.

СУБСТРАТ ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ ВЕКТОРА

Вектор накапливают в непрерывных клеточных линиях (5.2.3) с использованием системы банка клеток. Возникновение репликативно-компетентных вирусных векторов наиболее вероятно при наличии крупных гомологичных областей между геномом вирусного вектора и геномом пакующих клеток. Свести к минимуму появление вирусов способных к репликации можно устранив гомологию между обоими геномами. Для производственного процесса рекомендуется использование клеток не имеющих гомологических областей с вектором.

ПОСЕВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ВЕКТОРА

Производство вектора основано на системе посевных материалов. Используемый штамм аденовируса идентифицируют по информации о его истории, происхождении и последующих манипуляциях с ним, в частности, об удаленных или измененных участках генома. Необходимо предоставить подробное описание вставок и фланкирующих контрольных областей, включая нуклеотидную последовательность. Метод, с помощью которого генетическая вставка была введена в вектор, документируют.

Для производства вектора можно использовать только серию посевных материалов, которая выдерживает требования следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность вектора определяют в серии главного посевного материала и каждой серии рабочего посевного материала с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

Генетическая и фенотипическая характеристика. Проводят следующие испытания.

– Весь геном вектора секвенируют на уровне пассажа, сопоставимом с производственной серией; аналитически установленную нуклеотидную последовательность сравнивают с теоретической последовательностью, установленной по конструкции вектора и доступным базам данных.

– Рестрикционный анализ проводят на ДНК вектора из серии главного посевного материала, каждой серии рабочего посевного материала и серии производственных клеток.

Вирусную ДНК выделяют, очищают и подвергают действию эндонуклеаз рестрикции. Полученные фрагменты разделяют с помощью гель-электрофореза или капиллярного электрофореза и сравнивают наблюдаемую картину рестрикции с теоретической картиной, основанной на конструкции вектора.

– Подходящее количество выделенных субклонов испытывают на экспрессию продукта (продуктов) генетической вставки и биологическую активность на уровне пассажа, сопоставимом с производственной партией. Субклоны, дающие более низкие уровни экспрессии или биологической активности, нуждаются в дальнейшей проверке.

Концентрация вектора. Определяют инфекционный титр вектора или концентрацию вирусных частиц в серии главного посевного материала и каждой серии рабочего посевного материала.

Посторонние агенты (2.6.16). Серию главного посевного материала и каждую серию рабочего посевного материала испытывают на наличие посторонних агентов.

Репликативно-компетентные аденовирусы. Аденовирусы, способные к репликации (репликативно-компетентные) образуются при гомологичной рекомбинации между рекомбинантной вирусной ДНК и нуклеотидными последовательностями аденовирусов, интегрированными в геном пакующих клеток.

Обнаружение репликативно-компетентных аденовирусов проводят подходящим методом, утвержденным уполномоченным органом. Обычно, это делают с помощью испытания инфекционности на восприимчивых индикаторных клеточных культурах, не способных к комплементации генов, удаленных из вектора. Если необходимо, можно использовать другие показатели вирусной репликации.

Если репликативно-компетентные аденовирусы не должны присутствовать в испытуемом образце, учитывая конструкцию вектора и используемые клеточные линии, выполняют по меньшей мере 2, но предпочтительно 3 или 4 последовательных пассажа на индикаторных клеточных линиях, если применимо. Обнаружение цитопатического эффекта в конце пассажей свидетельствует о наличии в образце репликативно-компетентных аденовирусов. Положительные контроли включают в каждое испытание для контроля его чувствительности.

Если ожидается присутствие репликативно-компетентных аденовирусов в испытуемом образце, проводят испытания с помощью методов бляшкообразования или предельного разведения на индикаторной клеточной линии.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СБОР

Должно быть полностью исключено проведение манипуляций с банками клеток и клеточными культурами в одних и тех же помещениях или зонах одновременно с проведением манипуляций с другими банками клеток или векторами. Любой материал человеческого или животного происхождения, используемый при получении клеточных суспензий и культуральных сред должен быть квалифицирован.

Культуральная среда может содержать индикатор pH, такой как феноловый красный, и подходящие антибиотики в минимальной эффективной концентрации, но предпочтительно в производственном процессе использовать субстрат, не содержащий антибиотиков. При отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа, ни на одном этапе производства не используют пенициллин или стрептомицин. Часть производственной клеточной культуры клеток-продуцентов оставляют в качестве контрольных клеток (неинфицированные клетки). Каждый отдельный сбор, соответствующий требованиям следующих испытаний, может быть использован для приготовления очищенного сбора.

Идентификация. Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

Концентрация вектора. Определяют инфекционный титр вектора и концентрацию векторных частиц в отдельных сборах.

Посторонние агенты (2.6.16). Отдельный сбор должен соответствовать требованиям испытания на посторонние агенты.

Контрольные клетки. Контрольные клетки должны выдерживать требования испытания на идентификацию (5.2.3) и испытания на посторонние агенты (2.6.16).

СБОР ОЧИЩЕННОГО ВЕКТОРА

Перед процессом очистки могут быть объединены несколько серий одиночных сборов. Процесс очистки должен быть валидирован, для подтверждения надлежащего удаления примесей. Очищенные сборы могут быть использованы при подготовке готового нерасфасованного продукта при соответствии требованиям следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

Целостность генома. Целостность генома вектора проверяют подходящими методами, например, с помощью рестрикционного анализа.

Концентрация вектора. Определяют инфекционный титр вектора и концентрацию вирусных частиц в очищенных сборах.

Остаточные белки клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточных белков клетки-хозяина определяют подходящим иммунохимическим методом (2.7.1).

Остаточная ДНК клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточной ДНК клетки-хозяина определяют с использованием подходящего метода. Подходящим методом считают количественную ПЦР, как специфичный метод с высокой чувствительностью, но могут быть использованы и другие методы.

Остаточные реактивы. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, при использовании реактивов в производственном процессе испытания на их остаточное количество проводят на очищенном сборе.

Остаточные антибиотики. При использовании антибиотиков в производственном процессе, их остаточное содержание определяют микробиологическими методами (адаптированные из общего метода 2.7.2) или другими подходящими методами (например, с помощью жидкостной хроматографии), если только производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки.

ГОТОВЫЙ НЕРАСФАСОВАННЫЙ ПРОДУКТ

Для получения готового нерасфасованного продукта могут быть объединены несколько серий сборов. В процессе получения готового нерасфасованного продукта могут быть добавлены подходящие стабилизаторы или другие вспомогательные вещества. Полученный продукт фильтруют через фильтр, не пропускающий бактерии. При подготовке серии готового продукта (лекарственного препарата) может быть использован только готовый нерасфасованный продукт, соответствующий требованиям следующих испытаний

Стерильность (2.1.6.1). Готовый нерасфасованный продукт должен выдерживать требования испытания на стерильность.

ГОТОВЫЙ ПРОДУКТ (ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ)

К выпуску может быть допущена серия готового продукта (лекарственного препарата), выдерживающая требования следующих испытаний, приведенных ниже в разделах *Идентификация, Испытания и Количественное определение*. При условии, что испытания на сывороточный альбумин крупного рогатого скота (если сыворотку крупного рогатого скота используют для производства вектора) и наличие репликативно-компетентных аденовирусов были выполнены с приемлемым результатом на готовом нерасфасованном продукте, испытания на готовом продукте (лекарственном препарате) можно не проводить.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

ИСПЫТАНИЯ

Осмоляльность (2.1.2.32). Значение осмоляльности должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

pH (2.1.2.3). Значение pH должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Извлекаемый объем (2.1.9.9). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на извлекаемый объем.

Вода (2.1.5.12). Содержание воды должно соответствовать пределам, установленным для конкретного лиофилизированного готового продукта (лекарственного препарата).

Сывороточный альбумин крупного рогатого скота. Содержание сывороточного альбумина крупного рогатого скота не должно превышать предел, установленный для конкретного готового продукта (лекарственного препарата), определенного подходящим иммунохимическим методом (2.7.1), если в процессе производства использовалась сыворотка крупного рогатого скота.

Концентрация репликативно-компетентного аденовируса. Должна соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Векторные частицы. Концентрацию векторных частиц определяют подходящими методами (например, нефелометрии).

Стерильность (2.1.6.1). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на стерильность.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предельное содержание, установленное для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Температурная стабильность. Необходимо провести испытания серии готового продукта (лекарственного препарата) при температуре в течение времени, установленного для конкретного готового продукта (лекарственного препарата). Определяют общую концентрацию инфекционного вектора после нагревания, как описано ниже в разделе *Количественное определение*. Параллельно определяют концентрацию вектора в образце без нагревания. Разница между общей концентрацией вектора без нагревания и после нагревания должна находиться в пределах, установленных для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Концентрация векторных частиц. Титрование проводят с помощью подходящих методов (например, жидкостной хроматографии, измерением поглощения (оптической плотности) или амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21)). Для проверки каждого испытания используют соответствующий стандартный образец вектора. Концентрация векторных частиц в испытуемом готовом продукте (лекарственном препарате) должна быть не менее концентрации, указанной на этикетке.

Инфекционный титр вектора. Определяют инфекционный титр вектора испытуемого готового продукта (лекарственного препарата) после инокуляции в клеточные культуры. Титруют соответствующий стандартный образец вектора для проверки каждого испытания.

Испытание признают неудовлетворительным, если:

- доверительный интервал ($P=0,95$) логарифма концентрации вектора больше значения, утвержденного уполномоченным органом;
- титр стандартного образца вектора находится за пределами предельных значений, определенных спецификацией на стандартный образец вектора.

Соотношение концентрации векторных частиц к инфекционному титру вектора. Должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Экспрессия продукта генетической вставки. Экспрессию продукта генетической вставки определяют, если применимо, после инокуляции клеточных культур с конкретным

готовым продуктом (лекарственным препаратом) при заданной кратности инфицирования, определенной с помощью подходящих иммунохимических (2.7.1) или биохимических методов или с помощью проточной цитометрии (2.7.24).

Биологическая активность. При отсутствии других указаний, биологическую активность определяют подходящим испытанием *in vitro* или *in vivo*.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- содержание действующего (активного) вещества;
- рекомендуемую терапевтическую дозу для медицинского применения, выраженную как концентрацию векторных частиц;
- для лиофилизированных лекарственных препаратов, дополнительно:
 - наименование (или состав) и объем восстанавливающей жидкости;
 - время, в течение которого продукт должен быть использован после восстановления.

ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ ПОКСВИРУСОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Векторы на основе поксвирусов для медицинского применения представляют собой лекарственные средства, содержащие рекомбинантные поксвирусы, генетически модифицированные для доставки генетического материала в соматические клетки человека *in vivo* или *ex vivo*, представленные в лекарственной форме раствора или лиофилизаты.

ПРОИЗВОДСТВО

КОНСТРУКЦИЯ ВЕКТОРА

Общая конструкция вектора поксвируса в настоящее время выглядит следующим образом: целевой ген встраивают под контроль промотора поксвируса. Экспрессионную кассету встраивают в геном поксвируса вместо генов, несущественных для репликации вируса, или размещают между двумя открытыми рамками считывания в геноме вируса. В большинстве используемых стратегий для создания вектора, экспрессионную кассету сначала вставляют в целевой сайт фрагмента ДНК вируса, встраиваемого в бактериальную плазмиду. Затем плазмиду вводят в клетки хозяина, культивируемые *in vitro*, которые одновременно заражают родительским штаммом поксвируса. Рекомбинация ДНК происходит внутри инфицированных клеток между гомологичными последовательностями в вирусном геноме и вирусными последовательностями в плазмиде, в результате осуществляется перенос экспрессионной кассеты в целевой сайт вирусного генома. Точность встраивания ДНК проверяют с помощью методов рестрикционного картирования, амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) и секвенирования. Для очистки рекомбинантного поксвируса из смеси родительского (исходного) и рекомбинантного поксвирусов проводят последовательные этапы клонирования бляшек, образованных

вирусом. Для облегчения распознавания и (или) выделения рекомбинантного поксвируса от родительского вируса используют различные методы, например, методы чужеродных маркерных генов, гибридизации ДНК, фенотипических изменений в вирусе, иммунологические методы. Если чужеродные маркерные гены использовали временно, их удаляют соответствующими методами из конечного рекомбинантного поксвируса.

Альтернативная стратегия создания поксвирусных векторов начинается с построения *in vitro* полноразмерного вирусного генома, содержащего экспрессионную кассету в выбранном целевом участке. Рекомбинантный геном затем вводят в клетки хозяина, одновременно инфицированные поксвирусом-помощником, не способным к размножению. Вирусом-помощником может быть поксвирус того же вида, чья способность к размножению была инактивирована, или другой вид поксвируса, который не размножается в клетках-хозяина. Конструирование нереплицирующихся (репликативно-некомпетентных) поксвирусных векторов основано на использовании или определенных клеточных линий клеток-хозяина или первичных клеток, изначально пермиссивных, или клеточных линий, которые были модифицированы для экспрессии необходимых генов поксвируса. Клеточные линии должны соответствовать общим требованиям для производства лекарственных препаратов (5.2.3) и не допускать образования репликативно-компетентных векторов.

ПРОИЗВОДСТВО ВЕКТОРА

Необходимо подтвердить постоянство получения вектора надлежащего качества в производственном процессе. Вектор в готовом продукте (лекарственном препарате) должен пройти не больше пассажей из посевного материала, чем было использовано для получения вектора, признанного удовлетворительным с точки зрения безопасности и эффективности в клинических испытаниях, при отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа.

Генетическую и фенотипическую стабильность вектора, используемого в производственном процессе, оценивают подходящими методами на максимальном пассаже или выше.

СУБСТРАТ ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ ВЕКТОРА

Вектор накапливают в асептических условиях в диплоидных клетках человека (5.2.3), в непрерывных клеточных линиях (5.2.3) или культурах клеток куриных эмбрионов, полученных из стад кур категории SPF (5.2.2). Если вектор накапливают в непрерывной клеточной линии или в диплоидных клетках человека, создают систему банка клеток.

ПОСЕВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ВЕКТОРА

Производство вектора основано на системе посевных материалов. Используемый штамм поксвируса идентифицируют по данным о его происхождении и последующих манипуляциях с ним, в частности, об удаленных или измененных участках. Необходимо представить подробное описание вставок и фланкирующих контрольных областей, включая нуклеотидную последовательность. Метод, с помощью которого генетическая вставка была внедрена в вектор, документируют.

Для производства вектора можно использовать только серию посевных материалов, которая выдерживает требования следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность вектора определяют в серии главного посевного материала и каждой серии рабочего посевного материала с помощью иммунохимических методов (2.7.1) и метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21).

Генетическая и фенотипическая характеристика. Проводят следующие испытания.

- Весь геном вектора секвенируют на уровне пассажа, сопоставимом с производственной серией; аналитически установленную нуклеотидную последовательность сравнивают с теоретической последовательностью, основанной на конструкции вектора и доступным базам данных.

- Рестрикционный анализ проводят на ДНК вектора из главной серии посевного материала, каждой серии рабочего посевного материала и серии производственных клеток.

Вирусную ДНК выделяют, очищают и подвергают действию эндонуклеаз рестрикции. Полученные фрагменты разделяют с помощью гель-электрофореза или капиллярного электрофореза и сравнивают наблюдаемую картину рестрикции с теоретической картиной, основанной на конструкции вектора.

- Подходящее количество выделенных субклонов испытывают на экспрессию продукта генетической вставки и биологическую активность на уровне пассажа, сопоставимом с производственной партией. Субклоны, дающие более низкие уровни экспрессии или биологической активности, нуждаются в дальнейшей проверке.

- Диапазон хозяев проверяют путем определения репликативных свойств вектора и сравнения их с репликативными свойствами родительского вируса на уровне пассажа, сопоставимом с производственной серией.

Инфекционный титр вектора. Определяют инфекционный титр вектора в серии главного посевного материала и каждой серии рабочего посевного материала.

Посторонние агенты (2.6.16). Серию главного посевного материала и каждую серию рабочего посевного материала испытывают на наличие посторонних агентов, за исключением случаев, когда цитопатические штаммы не могут быть нейтрализованы, а вектор вызывает интерференцию. Если испытание не может быть проведено, используют подходящую валидированную альтернативу.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СБОР

Необходимо исключить одновременное проведение манипуляций с банками клеток и клеточными культурами с другими банками клеток или векторами в одном помещении или зоне. Любой материал человеческого или животного происхождения, используемый при получении клеточных суспензий и культуральных сред должен быть квалифицирован.

Культуральная среда может содержать индикатор pH, такой как феноловый красный, и подходящие антибиотики в минимальной эффективной концентрации, но предпочтительно использовать в производственном процессе субстрат, не содержащий антибиотиков. При отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа, ни на одном этапе производства не используют пенициллин или стрептомицин. Часть производственной клеточной культуры клеток-продуцентов оставляют в качестве контрольных клеток (неинфицированные клетки). Каждый отдельный сбор, соответствующий требованиям следующих испытаний, может быть использован для приготовления очищенного сбора.

Идентификация. Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

Инфекционный титр вектора. Определяют инфекционный титр вектора в отдельных сборах.

Посторонние агенты (2.6.16). Отдельные сборы должны выдерживать требования испытания на посторонние агенты, за исключением случаев, когда цитопатические штаммы не могут быть нейтрализованы, а вектор вызывает интерференцию. Если испытание не может быть проведено, используют подходящую валидированную альтернативу.

Контрольные клетки. Если в производственном процессе используют диплоидные клетки человека или непрерывную клеточную линию, контрольные клетки должны выдерживать требования испытания на идентификацию (5.2.3) и испытания на посторонние агенты (2.6.16).

СБОР ОЧИЩЕННОГО ВЕКТОРА

Обработку проводят в асептических условиях. Перед процессом очистки могут быть объединены несколько серий одиночных сборов. Сбор сначала освещают для удаления клеток, а затем, если применимо, проводят очистку. Процесс очистки должен быть валидирован. Очищенные сборы могут быть использованы при подготовке готового нерасфасованного продукта при соответствии требованиям следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1) и метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21).

Целостность генома. Геномную целостность вектора проверяют подходящими методами, например, с помощью рестрикционного анализа.

Инфекционный титр вектора. Определяют инфекционный титр вектора в очищенных сборах.

Отношение инфекционного титра вектора к содержанию общего белка. Содержание общего белка определяют подходящим методом (2.1.5.14). Рассчитывают соотношение между инфекционным титром вектора и содержанием общего белка.

Остаточные белки клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточных белков клетки-хозяина определяют подходящим иммунохимическим методом (2.7.1).

Остаточная ДНК клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточной ДНК клетки-хозяина определяют с использованием подходящего метода. Подходящим методом считают количественную ПЦР, как специфичный метод с высокой чувствительностью, но могут быть использованы и другие подходящие методы.

Остаточные реактивы. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, при использовании реактивов в производственном процессе испытания на их остаточное количество проводят на очищенном сборе.

Остаточные антибиотики. При использовании антибиотиков в производственном процессе, их остаточное содержание определяют микробиологическими методами (адаптированные из общего метода 2.7.2) или другими подходящими методами (например,

с помощью жидкостной хроматографии), если только производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки.

ГОТОВЫЙ НЕРАСФАСОВАННЫЙ ПРОДУКТ

Для получения готового нерасфасованного продукта могут быть объединены несколько серий сборов. В процессе получения готового нерасфасованного продукта могут быть добавлены подходящие стабилизаторы или другие вспомогательные вещества. Полученный продукт фильтруют через фильтр, не пропускающий бактерии. При подготовке серии готового продукта (лекарственного препарата) может быть использован только готовый нерасфасованный продукт, соответствующий следующим требованиям.

Стерильность (2.1.6.1). Готовый нерасфасованный продукт должен выдерживать требования испытания на стерильность.

ГОТОВЫЙ ПРОДУКТ (ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ)

К выпуску может быть допущена серия готового продукта, выдерживающая требования следующих испытаний, приведенных ниже в разделах *Идентификация, Испытания и Количественное определение*. При условии, что испытания на сывороточный альбумин крупного рогатого скота (если сыворотку крупного рогатого скота используют для производства вектора) были выполнены с приемлемым результатом на готовом нерасфасованном продукте, испытания на готовом продукте можно не проводить.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1) и метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21).

ИСПЫТАНИЯ

Осмоляльность (2.1.2.32). Значение осмоляльности должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

pH (2.1.2.3). Значение pH должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Извлекаемый объем (2.1.9.9). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на извлекаемый объем.

Вода (2.1.5.12). Содержание воды должно соответствовать пределам, установленным для конкретного лиофилизированного готового продукта (лекарственного препарата).

Сывороточный альбумин крупного рогатого скота. Содержание сывороточного альбумина крупного рогатого скота не должно превышать предел, установленный для конкретного готового продукта (лекарственного препарата), определенного подходящим иммунохимическим методом (2.7.1), если в процессе производства использовалась сыворотка крупного рогатого скота.

Векторные частицы. Концентрацию векторных частиц определяют подходящими методами (например, нефелометрии).

Стерильность (2.1.6.1). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на стерильность.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предельное содержание, установленное для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Температурная стабильность. Необходимо провести испытания серии готового продукта (лекарственного препарата) при температуре в течение длительного времени, установленных для конкретного готового продукта (лекарственного препарата). Определяют общую концентрацию инфекционного вектора после нагревания, как описано ниже в разделе *Количественное определение* данной общей фармакопейной статьи. Параллельно определяют концентрацию вектора в образце без нагревания. Разница между общей концентрацией вектора без нагревания и после нагревания должна находиться в пределах, установленных для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Инфекционный титр вектора. Титруют не менее трех упаковок испытуемого готового продукта (лекарственного препарата) после инокуляции в клеточные культуры. Титруют соответствующий стандартный образец вектора для проверки каждого испытания. Титр вектора испытуемого готового продукта (лекарственного препарата) должен быть не менее минимального титра, указанного на этикетке.

Экспрессия продукта генетической вставки. Экспрессию продукта генетической вставки определяют, если применимо, после инокуляции клеточных культур конкретным готовым продуктом (лекарственным препаратом) при заданной кратности инфицирования, определенной с помощью подходящих иммунохимических (2.7.1) или биохимических методов или с помощью проточной цитометрии (2.7.24).

Биологическая активность. При отсутствии других указаний, биологическую активность определяют подходящим испытанием *in vitro* или *in vivo*.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- содержание активного вещества;
- рекомендуемую терапевтическую дозу для медицинского применения, выраженную как концентрацию векторных частиц;
- для лиофилизированных лекарственных препаратов, дополнительно:
 - наименование (или состав) и объем восстанавливающей жидкости;
 - время, в течение которого препарат должен быть использован после восстановления.

ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ РЕТРОВИРУСОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Векторы семейства ретровирусов (*Retroviridae*) для медицинского применения представляют собой лекарственные средства, состоящие из рекомбинантных ретровирусов, лентивирусов или спумавирусов для доставки генетического материала в соматические клетки человека *in vivo* или *ex vivo*, в лекарственной форме растворы или лиофилизаты.

Лекарственные средства для медицинского применения с использованием доставки генов стр22

Рекомбинантные препараты генетически модифицированы для получения вирусов некомпетентных к репликации.

Данный раздел общей фармакопейной статьи распространяется только на репликативно-некомпетентные векторы.

ПРОИЗВОДСТВО

КОНСТРУКЦИЯ ВЕКТОРА

Структура типичного ретровирусного вектора:

- минимальный набор генов родительских вирусов, содержащий структурные генетические участки, доказавшие свою незаменимость для производства векторов. Например, гены *gag*, *pol* и *env*, кодирующие матричный, капсидный и нуклеокапсидный белки, протеазу, обратную транскриптазу и интегразу или белки оболочки;
- необходимые регуляторные генетические участки для экспрессии генетической вставки (например, длинные терминальные повторы);
- генетическая вставка.

Конструкция вектора предназначена для предотвращения появления вирусов, способных к репликации.

ПРОИЗВОДСТВО ВЕКТОРА

Необходимо подтвердить постоянство получения вектора надлежащего качества в производственном процессе. Пакующие линии клеток или клетки-продуценты должны подвергаться не более чем двукратному удвоению клеток из ГБК, чем было использовано для получения вектора, признанного удовлетворительным с точки зрения безопасности и эффективности в клинических испытаниях, при отсутствии другого обоснования или разрешения уполномоченного органа.

Генетическую и фенотипическую стабильность пакующих клеток или клеток-продуцентов, используемых в производственном процессе, оценивают подходящими методами на максимальном количестве удвоений популяции клеток или выше.

Векторы получают в непрерывных клеточных линиях (5.2.3) с использованием системы банков клеток. Для производства могут использоваться стабильно или транзигентно трансфицированные клетки.

Определения

Пакующие клеточные линии. Пакующие клеточные линии представляют собой исходную клеточную линию, трансфицированную плазмидами, содержащими ретровирусные гены *gag*, *pol*, *env*, необходимые для образования пустых векторных частиц (капсид) лишенных РНК. Пакующие клеточные линии созданы для упаковки полноразмерной РНК ретровирусного вектора в интактные капсиды, которые с высокой частотой проникают в клетку и гарантированно встраиваются в геном клетки-хозяина. В двух разных участках хромосом таких клеток внедрены ретровирусные гены, не способные паковаться в вирусную частицу. При трансфекции РНК вирусного вектора в пакующие клетки вектор встраивается в хромосомную ДНК и транскрибируется с образованием полноразмерной РНК ретровируса, и в таких условиях в капсидах пакуется только РНК

вектора. Образующиеся интактные вирусные частицы используют для эффективной доставки ретровирусного вектора в клетки-мишени.

Клетки-продуценты. Клетки-продуценты представляют собой клетки, содержащие гены вирусов и экспрессионную кассету, необходимые для производства вектора.

– При производстве с использованием стабильной трансфекции клетки-продуценты получают путем постоянной трансфекции пакующей линии транспортной плазмидой, содержащей интересующую геномную последовательность.

– При производстве с использованием транзientной трансфекции клетки-продуценты получают путем одновременной трансфекции исходной клеточной линии вирусными генами и плазмидой для экспрессии трансгена, или путем транзientной трансфекции пакующей клеточной линии транспортной плазмидой, содержащей интересующую нуклеотидную последовательность.

Промежуточные продукты

Пакующие клетки

Количество копий. Геномную ДНК выделяют и очищают из известного количества клеток и определяют количество копий генов *gag*, *pol* и *env* подходящим методом, например, с помощью количественной ПЦР (2.6.21).

Целостность последовательности вирусных генов. Проводят полное нуклеотидное секвенирование вставленных генов вирусов и их регуляторных участков.

Генетическая стабильность. Генетическую стабильность пакующих клеток, используемых в производственном процессе, оценивают подходящими методами на максимальном количестве удвоений популяции клеток или выше.

Плазмиды

Для получения векторов необходимо использование плазмид в качестве промежуточных продуктов. Для каждой ДНК плазмиды необходимо предоставить полное описание, включая идентификацию, источник, способ выделения и нуклеотидную последовательность. Документируют источник и функции составных частей этих плазмид, таких как ориджин репликации, вирусные и эукариотические промоторы и гены, кодирующие маркеры селекции.

Получение промежуточных плазмид основано на системе бактериальных клеточных банков. Бактериальный клеточный банк должен соответствовать требованиям раздела *Бактериальные клетки, используемые для производства плазмидных векторов* данной общей фармакопейной статьи. Плазмиды очищают с помощью подходящих методов.

Для производства вектора можно использовать только серии плазмид, которые выдерживают требования следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность плазмиды определяют с помощью методов рестрикционного анализа, секвенирования или амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21).

Целостность генома. Целостность генома плазмиды проверяют подходящими методами, такими как рестрикционный анализ генов вируса, генетической вставки и соответствующих им регуляторных участков.

ДНК плазмиды. Следующие указания приводятся в качестве примеров.

Концентрацию ДНК более 500 нг/мл можно определить с помощью измерения поглощения (оптической плотности) при длине волны 260 нм. Раствор 50 мкг/мл

двухцепочечной ДНК имеет коэффициент поглощения 1 (удельный коэффициент поглощения 200).

Концентрацию ДНК менее 500 нг/мл определяют после инкубации с флуоресцентными красителями, специфически связывающихся с двухцепочечной ДНК, используя стандартный образец ДНК для построения калибровочной кривой. Жидкостную хроматографию также можно использовать для определения концентрации ДНК плазмиды с использованием стандартного образца. В некоторых случаях также допустимо использование капиллярного электрофореза.

Остаточная ДНК клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточной ДНК клетки-хозяина определяют с использованием подходящего метода. Подходящим методом считают количественную ПЦР, как специфичный метод с высокой чувствительностью, но могут быть использованы и другие методы.

Стерильность (2.1.6.1). Плазмиды должны выдерживать требования испытания на стерильность.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предельное содержание, установленное для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Клетки-продуценты, применяемые в производстве с использованием стабильной трансфекции

Количество копий. Количество копий интегрированных генов вирусов и экспрессионной кассеты определяют подходящим методом.

Генетическая стабильность. Генетическую стабильность клеток-продуцентов, используемых в производственном процессе, подтверждают подходящими методами при максимальном количестве удвоений популяции клеток или выше.

Целостность последовательности генов вируса и экспрессионной кассеты. Проводят полное секвенирование вставленных генов вируса, экспрессионной кассеты и соответствующих им регуляторных участков (например, длинных терминальных повторов, промоторов, последовательности *psi*, сигнала полиаденилирования).

Репликативно-компетентные вирусы. Обнаружение вирусов, способных к репликации, осуществляют с помощью подходящих методов. Обнаружение может быть основано на совместном культивировании в течение нескольких клеточных дупликаций клеток-продуцентов с перmissiveй линией клеток, с последующим определением (путем наблюдения цитопатического или гемоадсорбирующего эффекта на индикаторных клетках, таких как PG4 S+L-, или с использованием линий индикаторных клеток методом амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или с помощью испытания «спасения» или восстановления маркера).

Положительные контроли включают в каждое испытание для контроля его чувствительности. Репликативно-компетентные вирусы не должны обнаруживаться.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СБОР

Необходимо исключить одновременное проведение манипуляций с банками клеток и клеточными культурами с другими клетками или векторами в одном помещении или зоне. Любой материал человеческого или животного происхождения, используемый при

получении клеточных суспензий и культуральных сред должен быть квалифицирован. Предпочтительно во время производственного процесса использовать субстрат, не содержащий антибиотиков. При отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа, ни на одном этапе производства не используют пенициллин или стрептомицин. Каждый отдельный сбор, соответствующий требованиям следующих испытаний, может быть использован для приготовления очищенного сбора.

Идентификация. Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

Титр вектора. Определяют инфекционный титр вектора и (или) концентрацию векторных частиц в отдельных сборах.

Посторонние агенты (2.6.16). Каждый отдельный сбор должен выдерживать требования испытания на посторонние агенты.

Контрольные клетки. При использовании транзientного процесса трансфекции контрольные клетки должны выдерживать требования испытания на идентификацию (5.2.3) и испытания на посторонние агенты (2.6.16).

ОЧИЩЕННЫЙ СБОР

Перед процессом очистки сбора могут быть объединены несколько серий одиночных сборов. Очищенные сборы могут быть использованы при подготовке готового нерасфасованного продукта при соответствии требованиям следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1) или рестрикционного анализа.

Целостность генома. Целостность генома вектора проверяют подходящими методами.

Концентрация вектора. Инфекционный титр частиц определяют с помощью подходящих методов, например, инфицированием перmissive клеток с амплификацией нуклеиновых кислот (количественной ПЦР), Саузерн-блоттинга или экспрессией белка. Для лентивирусных векторов титр определяют, например, методом твердофазного иммуноферментного анализа (антиген p24).

Репликативно-компетентные вирусы. Определение наличия репликативно-компетентных вирусов осуществляют подходящими методами. Обычно используют амплификацию на перmissive клетках с проведением ПЦР (2.6.21), обнаружением вирусного антигена (например, антигена p24 методом твердофазного иммуноферментного анализа) или метода «спасения» или восстановления маркера. Положительные контроли включают в каждое испытание для контроля его чувствительности. Обнаружение репликативно-компетентных вирусов проводят на очищенном сборе или на серии готового продукта. Репликативно-компетентные вирусы не должны обнаруживаться.

Остаточные белки клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточных белков клетки-хозяина определяют подходящим иммунохимическим методом (2.7.1).

Остаточная ДНК клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточной ДНК клетки-хозяина определяют с использованием подходящего метода. Подходящим методом

считают количественную ПЦР, как специфичный метод с высокой чувствительностью, но могут быть использованы и другие подходящие методы.

Остаточные реактивы. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, при использовании реактивов в производственном процессе испытания на их остаточное количество проводят на очищенном сборе.

Остаточные антибиотики. При использовании антибиотиков в производственном процессе, их остаточное содержание определяют микробиологическими методами (адаптированные из общего метода 2.7.2) или другими подходящими методами (например, с помощью жидкостной хроматографии), если только производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки.

Остаточные плазмиды. При использовании транзientного процесса, содержание остаточных контаминирующих плазмид должно быть количественно определено.

ГОТОВЫЙ НЕРАСФАСОВАННЫЙ ПРОДУКТ

Для получения готового нерасфасованного продукта могут быть объединены несколько серий очищенных сборов. В процессе получения готового нерасфасованного продукта могут быть добавлены подходящие стабилизаторы или другие вспомогательные вещества. Полученный продукт фильтруют через фильтр, не пропускающий бактерии. При подготовке серии готового продукта (лекарственного препарата) может быть использован только готовый нерасфасованный продукт, который выдерживает требования следующих испытаний.

Стерильность (2.1.6.1). Готовый нерасфасованный продукт должен выдерживать требования испытания на стерильность.

ГОТОВЫЙ ПРОДУКТ (ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРОДУКТ)

К выпуску может быть допущена серия готового продукта (лекарственного препарата), выдерживающая требования следующих испытаний, приведенных ниже в разделах *Идентификация, Испытания и Количественное определение*.

Если испытания на сывороточный альбумин крупного рогатого скота (при использовании сыворотки крупного рогатого скота в производстве вектора) и наличие репликативно-компетентных вирусов были выполнены с приемлемым результатом на очищенном сборе, испытания на готовом продукте можно не проводить.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность вектора из семейства ретровирусов (*Retroviridae*) определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

ИСПЫТАНИЯ

Осмоляльность (2.1.2.32). Значение осмоляльности должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

pH (2.1.2.3). Значение pH должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Извлекаемый объем (2.1.9.9). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на извлекаемый объем.

Вода (2.1.5.12). Содержание воды должно соответствовать пределам, установленным для конкретного лиофилизированного готового продукта (лекарственного препарата).

Сывороточный альбумин крупного рогатого скота. Если в производственном процессе использовали сыворотку крупного рогатого скота, содержание сывороточного альбумина крупного рогатого скота не должно превышать предел, установленный для конкретного готового продукта (лекарственного препарата), определенного подходящим иммунохимическим методом (2.7.1).

Репликативно-компетентные вирусы. Определение репликативно-компетентных вирусов осуществляют подходящими методами. Обычно используют амплификацию на пермиссивных клетках с проведением ПЦР (2.6.21), обнаружением вирусного антигена (например, антигена *p24* методом твердофазного иммуноферментного анализа) или «спасения» или восстановления маркера. Положительные контроли включают в каждое испытание для контроля чувствительности. Обнаружение репликативно-компетентных вирусов проводят на очищенном сборе или на конечной серии. Репликативно-компетентные вирусы не должны обнаруживаться.

Стерильность (2.1.6.1). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на стерильность.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предельное содержание, установленное для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Концентрация векторных частиц. Титрование проводят с помощью подходящих методов (например, иммунохимические методы (2.7.1) или метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21). Для проверки каждого испытания используют соответствующий стандартный образец вектора.

Инфекционный титр вектора. Титруют испытуемый образец готового продукта (лекарственного препарата) после инокуляции в клеточные культуры. Титруют соответствующий стандартный образец вектора для проверки каждого испытания. Инфекционный титр вектора испытуемого лекарственного препарата должен быть не менее минимального титра, указанного на этикетке.

Испытание признают неудовлетворительным, если:

- доверительный интервал ($P=0,95$) логарифма концентрации вектора больше значения, утвержденного уполномоченным органом;
- инфекционный титр стандартного образца находится за границей предельных значений, определенных спецификацией на стандартный образец вектора.

Соотношение концентрации векторных частиц к инфекционному титру вектора. Соотношение должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Экспрессия продукта генетической вставки. Экспрессию продукта генетической вставки определяют, по возможности, после инокуляции клеточных культур с конкретным

готовым продуктом (лекарственным препаратом) при заданной кратности инфицирования, определенной с помощью подходящих иммунохимических (2.7.1) или биохимических методов или с помощью проточной цитометрии (2.7.24).

Биологическая активность. При отсутствии других указаний, биологическую активность определяют подходящим испытанием *in vitro* или *in vivo*.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- минимальный титр вектора на дозу для медицинского применения;
- рекомендуемую терапевтическую дозу для медицинского применения;
- для лиофилизированных лекарственных препаратов, дополнительно:
 - наименование (или состав) и объем восстанавливающей жидкости;
 - время, в течение которого продукт должен быть использован после восстановления.

АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Векторы на основе аденоассоциированного вируса для медицинского применения представляют собой лекарственные средства, состоящие из рекомбинантных аденоассоциированных вирусов, генетически модифицированных для доставки генетического материала в соматические клетки человека *in vivo* или *ex vivo*, в лекарственной форме раствора или лиофилизаты.

Геном аденоассоциированного вируса представлен линейной одноцепочечной ДНК с двумя инвертированными терминальными повторами. Вирус не кодирует полимеразу и поэтому использует клеточные полимеразы для репликации генома. Инвертированные терминальные повторы фланкируют два вирусных гена — *rep* и *cap*, кодирующие неструктурные и структурные белки, соответственно.

ПРОИЗВОДСТВО

КОНСТРУКЦИЯ ВЕКТОРА

Векторы на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса получают заменой генов важных для репликации вируса, например, генов *rep* и *cap*, на интересующую генетическую вставку. Инвертированные терминальные повторы остаются в векторе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, поскольку это единственные элементы аденоассоциированного вируса, необходимые в *cis*-последовательностях в качестве ориджина репликации. Гены *rep* и *cap* необходимы для *trans*-последовательности, функционируют они, соответственно, для репликации и упаковки. Вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса содержит инвертированные терминальные повторы и генетическую вставку.

Аденоассоциированный вирус дикого типа обычно реплицируются только при наличии коинфицирования аденовирусом или вирусом герпеса (вирусов-помощников). Существуют разные подходы к получению (конструкции) вектора аденоассоциированного вируса. Выбранные стратегии направлены на минимизацию риска появления

репликативно-компетентных векторов аденоассоциированного вируса и эффективное устранение вирусов-помощников, которые могут быть использованы в производственном процессе.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЕКТОРА

Необходимо доказать получение вектора надлежащего качества и стабильности в производственном процессе. Для создания векторов аденоассоциированного вируса в настоящее время используют несколько стратегий, например:

- транзистентная (временная) котрансфекция клеточной линии плазмидами, содержащими инвертированные терминальные повторы, генетическую вставку, гены *her* и *car* и вспомогательные компоненты;
- инфицирование репликативно-некомпетентным вирусом-помощником клеток-продуцентов *her* и *car*, содержащих инвертированные терминальные повторы и генетическую вставку;
- трансфекция пермиссивной клеточной линии одним или несколькими вирусами, кодирующими *her* и (или) *car* и (или) генетическую вставку и инвертированные терминальные повторы, которые могут выполнять или не выполнять вспомогательные функции помощников (вирусы-помощники и бакуловирусы, соответственно).

В зависимости от стратегии, используемой для получения векторов аденоассоциированного вируса, необходимы различные промежуточные продукты (плазмиды, вирусы, используемые для производства, пакующие клетки). Вероятность появления репликативно-компетентного аденоассоциированного вируса высока, если существуют гомологичные области между геномами промежуточных продуктов и вектором рекомбинантного аденоассоциированного вируса. Минимизация гомологии между геномами предотвращает вероятность появления репликативно-компетентных вирусов. В производственном процессе рекомендуется использовать промежуточные продукты без гомологии последовательностей. Генетическую стабильность вектора, используемого в производственном процессе, оценивают подходящими методами на максимальном пассаже или выше.

Промежуточные продукты

Вирусы, используемые в производственном процессе и вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, получают в непрерывных клеточных линиях (5.2.3) с использованием системы посевного материала и системы банка клеток.

Пакующие клетки и клетки-производители

Количество копий. Геномную ДНК выделяют и очищают из известного количества клеток, а количество копий встроенных генов вирусов и экспрессионной кассеты определяют с помощью подходящего метода, например, количественной ПЦР (2.6.21).

Целостность генома вирусов и экспрессионной кассеты. Проводят полное секвенирование встроенных генов вирусов, их регуляторных элементов и, если применимо, экспрессионной кассеты.

Генетическая стабильность. Генетическую стабильность клеток, используемых в производственном процессе, оценивают подходящими методами на максимальном количестве удвоений популяции клеток или выше.

Аденоассоциированный вирус дикого типа. Отсутствие аденоассоциированного вируса дикого типа подтверждают с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21).

Плазмиды

Для получения вектора аденоассоциированного вируса путем транзientной котрансфекции необходимо использовать промежуточные плазмиды. Для каждой ДНК плазмиды, используемой в производственном процессе необходимо полное описание, включая идентификацию, источник происхождения, способ выделения и последовательность нуклеотидов. Документируют источник и функцию составных частей плазмид: ориджин (начало репликации), вирусные и эукариотические промоторы и гены, кодирующие маркеры селекции.

Получение промежуточных плазмидных векторов основано на системе бактериальных банков клеток. ГБК должен соответствовать требованиям раздела *Бактериальные клетки, используемые для производства плазмидных векторов* данной общей фармакопейной статьи. Плазмиды очищают подходящими методами. Для получения вектора аденоассоциированного вируса можно использовать только серии плазмид, соответствующие требованиям следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность устанавливают с помощью подходящих методов, например, рестрикционного анализа, секвенирования или амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21).

Целостность генома. Целостность генома плазмиды проверяют подходящими методами, например, рестрикционным анализом фрагментов, соответствующих *rep*, *cap* и экспрессионной кассете.

ДНК плазмиды. Представленные ниже указания даны в качестве примеров.

Концентрацию ДНК более 500 нг/мл определяют с помощью измерения поглощения (оптической плотности) при длине волны 260 нм. Раствор 50 мкг/мл двуцепочечной ДНК имеет коэффициент поглощения (оптической плотности) 1 (удельный коэффициент поглощения 200).

Концентрацию ДНК менее 500 нг/мл определяют после инкубации с флуоресцентными красителями, специфически связывающихся с двуцепочечной ДНК, используя стандартный образец ДНК для построения калибровочной кривой. Жидкостную хроматографию также можно использовать для определения концентрации ДНК плазмиды с применением стандартного образца. В некоторых случаях также допустимо использование капиллярного электрофореза.

Остаточная ДНК клетки-хозяина. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения подходящей очистки, содержание остаточной ДНК клетки-хозяина определяют с использованием подходящего метода. Подходящим методом считают количественную ПЦР в реальном времени, как специфичный метод с высокой чувствительностью, но могут быть использованы и другие методы.

Стерильность (2.1.6.1). Готовый нерасфасованный продукт должен выдерживать требования испытания на стерильность.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предельное содержание, установленное для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Вирусы, используемые в производственном процессе

Получение вирусов, используемых в производственном процессе, основано на системе посевного материала и банка клеток или, если применимо, (например, для бакуловирусов) на транзистентной системе. Подлинность штамма вируса устанавливают по информации о его истории, происхождении и последующих манипуляциях с ним, в частности, об удаленных или измененных участках. Необходимо документировать нуклеотидную последовательность вирусов.

Для производства вектора можно использовать только серию посевных материалов, соответствующую требованиям следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность вектора, используемого в производственном процессе, определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

Целостность генома. Целостность генома вируса, используемого в производственном процессе, проверяют подходящими методами, например, с помощью рестрикционного анализа. Если вирусы модифицированы для экспрессии генов *rep* или *cap* или экспрессионной кассеты, целостность генома оценивают с помощью методов секвенирования или количественной ПЦР этих фрагментов.

Генетическая стабильность. Если используют стабильный процесс трансфицирования, генетическую стабильность оценивают на максимальном количестве удвоений популяции клеток или выше.

Титр вируса. Инфекционный титр вектора определяют с помощью подходящих методов.

Аденоассоциированный вирус дикого типа. Если применимо, отсутствие аденоассоциированного вируса дикого типа в сериях посевного материала вируса-помощника подтверждают с помощью метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21).

Репликативно-компетентные вирусы. Выявление способных к репликации вирусов осуществляют подходящими методами. Репликативно-компетентные вирусы не должны обнаруживаться.

Посторонние агенты (2.6.16). Должны соответствовать испытанию на посторонние агенты. Если применимо, проводят испытания для обнаружения потенциальной контаминации конкретными вирусами насекомых.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И СБОР

Проведение манипуляций с банками клеток и клеточными культурами осуществляют в надлежащих зонах (или помещениях) с соответствующим уровнем изоляции. Должно быть полностью исключено проведение одновременных манипуляций с другими банками клеток, вирусами или векторами в одних и тех же помещениях. Любой материал человеческого или животного происхождения, используемый при получении клеточных суспензий и культуральных сред должен быть квалифицирован.

Культуральная среда может содержать индикатор pH, такой как феноловый красный, и подходящие антибиотики в минимальной эффективной концентрации, но предпочтительно использовать субстрат, не содержащий антибиотиков во время производственного процесса. При отсутствии другого обоснования и разрешения уполномоченного органа, ни на одном из этапов производственного процесса не

используют пенициллин или стрептомицин. Часть производственной культуры клеток-продуцентов оставляют в качестве контрольных клеток (неинфицированные клетки). Каждый отдельный сбор, соответствующий требованиям следующих испытаний, может быть использован для приготовления очищенного сбора.

Идентификация. Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

Концентрация вектора. Определяют инфекционный титр вектора и концентрацию векторных частиц в отдельных сборах.

Посторонние агенты (2.6.16). Отдельный сбор вектора соответствует испытанию на посторонние агенты.

Контрольные клетки. Контрольные клетки должны выдерживать требования испытания на идентификацию (5.2.3), испытания на посторонние агенты (2.6.16) и конкретные вирусы насекомых, если в производственном процессе используют клеточные линии насекомых.

СБОР ОЧИЩЕННОГО ВЕКТОРА

Перед процессом очистки могут быть объединены несколько серий одиночных сборов. Процесс очистки должен быть валидирован для подтверждения надлежащего удаления примесей. Очищенные сборы могут быть использованы при подготовке готового нерасфасованного продукта при соответствии требованиям следующих испытаний.

Идентификация. Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

Целостность генома. Целостность геном вектора проверяют подходящими методами, например, с помощью рестрикционного анализа.

Концентрация вектора. Определяют инфекционный титр вектора и концентрацию вирусных частиц в очищенных сборах.

Генетическая характеристика. Для определения генетической характеристики проводят следующие испытания:

- геном вектора секвенируют в течение соответствующего количества производственных этапов на уровне очищенного сбора или конечной массы. Аналитически установленную нуклеотидную последовательность сравнивают с теоретической последовательностью, основанной на конструкции вектора и доступных базах данных;
- целостность генома проверяют на ДНК вектора, например, с помощью методов на основе ПЦР.

Концентрация вектора. Определяют инфекционный титр вектора или концентрацию вирусных частиц в основной серии посевного материала и каждой рабочей серии посевного материала.

Посторонние агенты (2.6.16). Серию главного посевного материала и каждую серию рабочего посевного материала испытывают на наличие посторонних агентов.

Концентрация вектора. Определяют инфекционный титр вектора и концентрацию вирусных частиц.

Остаточные вирусы, используемые в производственном процессе. Остаточные вирусы, используемые в производственном процессе, оценивают с помощью метода бляшкообразования или метода определения средней инфекционной дозы 50% в культуре тканей (медианной цитопатогенной дозы, TCID₅₀) на перmissive клеточных линиях или с помощью количественной ПЦР в соответствии с используемой системой производства.

Остаточные белки. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточных белков клетки-хозяина и (или) белков вируса определяют подходящим иммунохимическим методом (2.7.1).

Остаточная ДНК клетки-хозяина. Содержание остаточной ДНК клетки-хозяина и остаточной ДНК промежуточных продуктов, плазмиды и вирусов-продуцентов определяют с использованием подходящего метода, если только производственный процесс не был валидирован для подходящей очистки. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, содержание остаточной ДНК клетки-хозяина и остаточной ДНК промежуточных продуктов (плазмиды и вирусов-продуцентов), определяют с использованием подходящего метода. Подходящим методом считают количественную ПЦР, как специфичный метод с высокой чувствительностью, но могут быть использованы и другие подходящие методы.

Остаточные реактивы. Если производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки, при использовании реактивов в производственном процессе испытания на их остаточное количество проводят на очищенном сборе.

Остаточные антибиотики. При использовании антибиотиков в производственном процессе, их остаточное содержание определяют микробиологическими методами (адаптированные из общего метода 2.7.2) или другими подходящими методами (например, с помощью жидкостной хроматографии), если только производственный процесс не был валидирован для подтверждения соответствующей очистки.

ГОТОВЫЙ НЕРАСФАСОВАННЫЙ ПРОДУКТ

Для получения готового нерасфасованного продукта могут быть объединены несколько серий сборов. В процессе получения готового нерасфасованного продукта могут быть добавлены подходящие стабилизаторы или другие вспомогательные вещества. Полученный продукт фильтруют через бактериальный фильтр, не пропускающий бактерии. При подготовке серии готового продукта (лекарственного препарата) может быть использован только готовый нерасфасованный продукт, выдерживающий требования следующих испытаний.

Стерильность (2.1.6.1). Готовый нерасфасованный продукт должен выдерживать требования испытания на стерильность.

ГОТОВЫЙ ПРОДУКТ (ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ)

К выпуску может быть допущена серия готового продукта (лекарственного препарата), выдерживающая требования следующих испытаний, приведенных ниже в разделах *Идентификация, Испытания и Количественное определение*. Если испытания на сывороточный альбумин крупного рогатого скота (если сыворотку крупного рогатого скота использовали для получения вектора), репликативно-компетентные аденоассоциированные вирусы и остаточные вирусы производственного процесса, были выполнены с приемлемым

результатом на готовом нерасфасованном продукте, то испытания на готовом продукте (лекарственном препарате) можно не проводить.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Подлинность вектора определяют с помощью иммунохимических методов (2.7.1), метода амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) или рестрикционного анализа.

ИСПЫТАНИЯ

Осмоляльность (2.1.2.32). Значение осмоляльности должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

pH (2.1.2.3). Значение pH должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Извлекаемый объем (2.1.9.9). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на извлекаемый объем.

Вода (2.1.5.12). Содержание воды должно соответствовать пределам, установленным для конкретного лиофилизированного готового продукта (лекарственного препарата).

Сывороточный альбумин крупного рогатого скота. Если в производственном процессе использовали сыворотку крупного рогатого скота, содержание сывороточного альбумина крупного рогатого скота не должно превышать предел, установленный для конкретного готового продукта (лекарственного препарата), определенного подходящим иммунохимическим методом (2.7.1).

Концентрация репликативно-компетентного аденоассоциированного вируса. Концентрация должна соответствовать пределу, установленному уполномоченным органом. Обнаружение репликативно-компетентного аденоассоциированного вируса осуществляют путем анализа репликации на пермиссивной клеточной линии, ранее инфицированной вирусом-помощником, и анализа репликативных форм с помощью Саузерн-блоттинга на низкомолекулярной ДНК или путем обнаружения гена *rep* с помощью метода количественной ПЦР.

Векторные частицы. Концентрацию векторных частиц определяют подходящими методами (например, с помощью нефелометрии).

Стерильность (2.1.6.1). Готовый продукт (лекарственный препарат) должен выдерживать требования испытания на стерильность.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов не должно превышать предельное содержание, установленное для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Концентрация векторных частиц. Содержание векторных частиц определяют подходящим методом, например, количественной ПЦР, путем сравнения со стандартной калибровочной кривой, полученной с использованием рекомбинантной плазмиды с аденоассоциированным вирусом или стандартного образца аденоассоциированного вируса. Содержание векторных частиц не должно превышать предел, установленный для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Инфекционный титр вектора. Титруют испытуемый образец готового продукта (лекарственного препарата) после инокуляции в клеточные культуры. Титруют соответствующий стандартный образец вектора для проверки каждого испытания. Титр вектора испытуемого готового продукта (лекарственного препарата) должен составлять не менее минимального титра, указанного на этикетке.

Испытание признают неудовлетворительным, если:

- доверительный интервал ($P=0,95$) логарифма концентрации вектора больше значения, утвержденного уполномоченным органом;
- инфекционный титр стандартного образца находится за границей предельных значений, определенных спецификацией на стандартный образец вектора.

Соотношение концентрации векторных частиц к инфекционному титру вектора. Соотношение должно соответствовать пределам, установленным для конкретного готового продукта (лекарственного препарата).

Экспрессия продукта генетической вставки. Экспрессию продукта генетической вставки определяют, если возможно, после инокуляции клеточных культур с конкретным готовым продуктом (лекарственным препаратом) при заданной кратности инфицирования, определенной с помощью подходящих иммунохимических (2.7.1) или биохимических методов или с помощью проточной цитометрии (2.7.24).

Биологическая активность. При отсутствии других указаний, биологическую активность определяют с помощью подходящего испытания *in vitro* или *in vivo*.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- содержание активного вещества (активной фармацевтической субстанции);
- рекомендуемую терапевтическую дозу для медицинского применения;
- для лиофилизированных препаратов, дополнительно:
 - наименование (или состав) и объем добавляемой восстанавливающей жидкости;
 - время, в течение которого продукт должен быть использован после восстановления.