Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

3.3.2. МЕДИЦИНСКИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Организация производства и контроль качества моноклональных антител

Методические рекомендации
МР 3.3.2.2359—08

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

3.3.2. МЕДИЦИНСКИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Организация производства и контроль качества моноклональных антител

Методические рекомендации
МР 3.3.2.2359—08

ББК 51.9
О64

О64 **Организация** производства и контроль качества моноклональных антител: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—36 с.

ISBN 5—7508—0759—2

1. Разработаны Федеральным государственным учреждением науки Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича (Ж. И. Авдеева, Т. А. Бектимиров, Р. А. Волкова, Н. В. Медуницын, В. Г. Петухов).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 3 апреля 2008 года № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 4 мая 2008 года. Введены в действие с 1 августа 2008 года.

4. Введены впервые.

ББК 51.9

Редакторы Е. В. Емельянова, Н. В. Кожока
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 28.04.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,25

Тираж 500 экз. Заказ 29

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные и методические ссылки 4
3. Сокращения, термины и определения 6
4. Общие положения 8
5. Основные положения, которые необходимо учитывать в производстве 9
6. Источник клеток 10
7. Линия клеток, продуцирующая моноклональные антитела 12
8. Линия клеток, продуцирующая рекомбинантные моноклональные антитела 12
9. Система банков клеток 15
10. Характеристика моноклональных антител 17
11. Производство 17
12. Очистка антител 21
13. Конечный полуфабрикат 22
14. Стабильность производства и рутинный контроль конечного полуфабриката 24
15. Спецификации и стандартные материалы 25
16. Модифицированные моноклональные антитела 26
17. Конечный продукт и разработка готового лекарственного продукта 27
18. Эквивалентность продукта 27
Приложение 1. Оценка вирусной контаминации 29
Приложение 2. Ткани человека, используемые при оценке перекрестной реактивности моноклональных антител 33
Приложение 3. Общие сведения о моноклональных антителах 34

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
4 мая 2008 г.
Дата введения: 1 августа 2008 г.

3.3.2. МЕДИЦИНСКИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Организация производства и контроль качества моноклональных антител

Методические рекомендации МР 3.3.2.2359—08

1. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации разработаны на основании международных регламентирующих документов по качеству ICH и CPMP, и содержат единые подходы к организации производства и контролю качества генно-инженерных моноклональных антител, предназначенных для терапевтического и диагностического (*in vivo*) использования у человека.

1.2. Методические рекомендации предназначены для органов и учреждений государственного санитарно-эпидемиологического надзора, специалистов организаций, независимо от их организационно-правовой формы, разрабатывающих условия производства и производящих препараты моноклональных антител, составляющих нормативно-техническую документацию на указанные препараты, а также для организаций, осуществляющих инспектирование условий производства и контроль качества препаратов моноклональных антител.

2. Нормативные и методические ссылки

2.1. Закон РФ от 22 июня 1998 г. № 86-ФЗ «О лекарственных средствах».

2.2. Приказ Минздрава РФ «О совершенствовании системы экспертизы и испытаний медицинских иммунобиологических препаратов» № 129 от 15 апреля 1999 г.

2.3. Приказ Минздрава РФ «Правила лабораторной практики» № 267 от 19 июня 2003 г.

2.4. ГОСТ 24297—87 «Входной контроль продукции».

2.5. ГОСТ Р ИСО 14644-1—00 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды».

2.6. ОСТ 42-510—98 (GMP) «Правила организации производства и контроля лекарственных средств».

2.7. СП 3.3.2.561—96 «Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов».

2.8. СП 1.2.011—94 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности».

2.9. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2.10. СП 3.3.2.1288—03 «Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов».

2.11. СП 3.3.2.1248—03 «Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов».

2.12. МУ 3.3.2-1886—04 «Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: организация, порядок проведения и представления результатов».

2.13. МУ 3.3.2.056—96 «Определение класса чистоты производственных помещений и рабочих мест».

2.14. МУ 44-116 «Асептическое производство медицинских иммунобиологических препаратов», 1997.

2.15. МУ 45-116 «Определение класса чистоты производственных помещений и рабочих мест. Приборы и методы», 1997.

2.16. МУ 3.3.2.684—98 «Сертификация медицинских иммунобиологических препаратов».

2.17. МУ-78-113 «Приготовление, хранение и распределение воды очищенной и воды для инъекций», 1998.

2.18. МУ 3.3.2.1081—01 «Порядок государственного надзора за качеством медицинских иммунобиологических препаратов».

2.19. МУК 4.1/4.2.588—96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям», 1996.

2.20. МУК 4.2.734—99 «Микробиологический мониторинг производственной среды».

2.21. РД 42-28-29—87 «Требования к моноклональным антителам для клинических целей».

2.22. РДИ 42-505—00 «Порядок проведения контроля параметров воздушной среды в «чистых» помещениях и методы их измерений при производстве лекарственных средств».

2.23. Нифантьев О. Е., Нифантьев Е. О. «Руководство по организации самоинспекции систем качества на фармацевтическом предприятии», 2000.

2.24. Технический доклад ВОЗ, серия № 822 («GMP для биологических продуктов», прилож. 1), 1992.

2.25. Технический доклад ВОЗ, серия № 822 («Руководство по обеспечению качества моноклональных антител, используемых для человека», прилож. 3), 1992.

2.26. Технический доклад ВОЗ, серия № 823 («GMP для лекарственных продуктов»), 1992.

2.27. «Правила производства лекарственных средств GMP Европейского сообщества (GMP ЕС)». М., 1997.

2.28. «Производство и контроль качества лекарственных продуктов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК», Европейская Комиссия. Директива для предприятий – Общая – Лекарственные средства, 1994.

2.29. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements Part 1: Standart operating procedures and master formulae WHO, Geneva, 1999.

2.30. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements Part 2: Validation WHO, Geneva, 1999.

3. Сокращения, термины и определения

МИБП – медицинские иммунобиологические препараты

МУ – методические указания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рДНК – рекомбинантная дезоксирибонуклеиновая кислота

ССП – свободные от специфических патогенов

EBV – вирус Эпштейна-Барр

CDR – области, определяющие комплементарность связывания молекулы иммуноглобулина

HAMA – человеческие антимышиные антитела

GMP – Надлежащая производственная практика

Банки клеток:

а) **Основной банк клеток (ОБК)** – гомогенная суспензия исходных клеток, на которых базируется производство, расфасованная порциями в индивидуальные емкости с целью хранения, например, в резервуаре с жидким азотом. Исходная линия клеток не обязательно должна быть получена производителем.

Для инженерных продуктов клетки в Основном банке клеток уже трансформированы вектором экспрессии, содержащим желаемый ген. В некоторых случаях существует необходимость создания отдельных банков клеток – для вектора экспрессии и клеток хозяина.

б) **Рабочий банк клеток (РБК)** производителя – гомогенная суспензия клеток, полученная из ОБК на определенном уровне пассажа, расфасованная порциями в индивидуальные емкости с целью хранения, например, в резервуаре с жидким азотом.

В обоих банках клеток все емкости во время хранения находятся в идентичных условиях. Емкость после взятия из места хранения в общий банк клеток не возвращается.

в) **Послепроизводственные клетки (ПК)** – клетки, культивированные до 10 или более удвоений популяции свыше максимального уровня удвоения, используемого для рутинного производства (производство однократного сбора продукта), или клетки, культивированные в период, который превышает используемую продолжительность культивирования на одну треть (производство многократного сбора продукта).

г) **Послепроизводственный банк клеток (ПБК)** – гомогенная суспензия клеток, полученная из ПК, расфасованная порциями в индивидуальные емкости с целью хранения.

Генно-инженерные моноклональные антитела – моноклональные антитела человека, в которых критические аминокислотные остатки заменены с помощью методов молекулярной технологии.

Готовый продукт – это активная субстанция, сведенная с компонентами готовой формы, расфасованная, укупоренная; каждая емкость содержит продукт в его окончательной дозированной форме. Емкости, заполненные одной серией продукта, обработаны одновременно, имеют одинаковый состав и одинаковую биологическую активность.

Конечный полуфабрикат активной субстанции – это конечный продукт после завершения производственного процесса, полученный из объединенного сбора продукта. Он содержится в одной или более емкостях и используется для приготовления готовой лекарственной формы.

Формирование этой конечной серии продукта должно быть четко установлено и документировано производителем.

***Метод производства*:**

а) **Однократный сбор** (производство на уровне определенного пассажа) – этот метод культивирования определяется ограниченным количеством пассажей или удвоений популяции клеток, число которых не может быть превышено во время производства.

б) **Многократный сбор** (производство с использованием перевиваемых культур) – количество удвоений популяции определяется на основе информации, касающейся стабильности системы и постоянства критериев качества продукта; производитель должен установить критерии окончания процесса культивирования.

Мышиные антитела – антитела получены от животных, принадлежащих семейству *Muridae*, которое включает в себя мышей и крыс.

Объединенный сбор – это гомогенный пул индивидуальных сборов продукта, лизатов или асцитных жидкостей, которые произведены в течение одного производственного цикла.

Партнер слияния – линия клеток, с которой осуществляют слияние клеток, продуцирующих антитела, для того, чтобы сделать эти клетки «бессмертными».

Фидерные клетки – культура клеток, культивируемых совместно с линией клеток, продуцирующих антитела, чтобы обеспечить оптимальные условия их роста.

4. Общие положения

В этом документе рассматриваются требования для мышиных, человеческих и генно-инженерных моноклональных антител, предназначенных для терапевтического (включая применение *ex vivo*) и диагностического (*in vivo*) использования у человека.

Моноклональные антитела, предназначенные для очистки других медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), должны быть очищены и свободны от контаминирующих агентов, что достигается описанными ниже методами.

Моноклональные антитела, предназначенные для диагностических целей *in vitro*, не являются предметом рассмотрения данного документа.

Целью введения в действие настоящих методических рекомендаций (далее – МР) является систематизация и унификация требований к организации производства и надзора за качеством на предприятиях, осуществляющих разработку и производство генно-инженерных моно-

клональных антител, предназначенных для терапевтического и диагностического (*in vivo*) использования у человека, а также осуществляющих разработку нормативно-технической документации на указанные препараты.

Методические рекомендации предусматривают требования к инспектированию условий производства и контроля качества моноклональных антител на соответствие их требованиям GMP и регламенту производства на конкретный препарат.

Методические рекомендации разработаны для всех организаций, производящих и разрабатывающих нормативно-техническую документацию на препараты моноклональных антител.

5. Основные положения, которые необходимо учитывать в производстве

Основные положения GMP и требования к производству медицинских биологических продуктов применимы и для производства моноклональных антител. Особое внимание должно быть обращено на положения, изложенные ниже.

5.1. Производственный процесс

Многие из общих требований к контролю качества МИБП, такие как специфическая активность, тестирование на аномальную токсичность, отсутствие контаминантов, стабильность и отсутствие определяемых количеств антибиотиков, применимы также и к моноклональным антителам. Нежелательно использование реагентов, которые могут спровоцировать у отдельных лиц развитие аллергических реакций, таких как пенициллин или другие бета-лактамные антибиотики.

5.2. Биологические материалы, используемые в производстве

Любые реагенты биологического происхождения (такие как бараньи эритроциты, сыворотка эмбрионов телят, бычий сывороточный альбумин, человеческий трансферрин, инсулин, трипсин), используемые при культивировании линии клеток, продуцирующих моноклональные антитела, и/или во время рутинного производства, должны быть свободны от микробиологических загрязнений, таких как микоплазмы, грибы и бактерии. Особое внимание необходимо уделять возможной вирусной контаминации, необходимо выполнять соответствующие контрольные

тесты по определению вирусов (например, трипсин должен тестироваться на парвовирус свиней).

Необходим контроль сыворотки крупного рогатого скота, она не должна содержать потенциально опасные вирусы (как минимум, вирус бычьей диареи, инфекционного бычьего ринотрахеита и парагриппа 3). Кроме того, бычья сыворотка и другие биологические продукты, полученные от крупного рогатого скота, должны соответствовать требованиям, исключающим риск передачи агентов, вызывающих губчатую энцефалопатию.

6. Источник клеток

При использовании тканей мышей и самих животных, в качестве исходного материала, необходимо доказать, что они свободны от вирусов, указанных в прилож. 1(а), табл. 2.

Моноклональные антитела, полученные из клеток человека, требуют особого внимания в плане безопасности. Человеческие моноклональные антитела уникальны в том, что их часто получают из клеток человека, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр (EBV), т. е. линии клеток, которая потенциально онкогенна. Наличие контаминации этими вирусами в данном случае является причиной настороженности, поскольку они способны инфицировать человека. Клетки человеческого происхождения должны быть свободны от вирусов, указанных в прилож. 1 (а), табл. 3.

6.1. Характеристика неспецифических клеток

6.1.1. Фидерные клетки

По возможности необходимо определить источник фидерных клеток. Фидерные клетки должны быть получены от свободных от специфических патогенов (SPF) животных. Необходимо доказать, что посевной банк клеток свободен от микробиологического загрязнения, такого как микоплазмы, бактерии и грибы. Особое внимание должно быть уделено возможной экзогенной вирусной контаминации клеток.

6.1.2. Партнер(ы) слияния

Используемые партнеры слияния (миеломные клетки, линия лимфобластоидных В-клеток человека и др.) требуют подробного описания и документирования. Необходимо представить источник, название и характеристику родительской линии клеток. Следует показать, что линия клеток является чистой культурой, не контаминированной клетками

других типов. Если возможно, в качестве партнера слияния должна быть выбрана такая линия клеток, которая не синтезирует никаких иммуноглобулиновых цепей. Криоконсервированные образцы линии клеток, используемой в качестве партнера слияния, необходимо сохранять на случай необходимости ретроспективных исследований.

6.1.3. Клетки хозяина для экспрессии рекомбинантных моноклональных антител

Необходимо дать описание исходного штамма или линии клеток хозяина, включая историю штамма или линии клеток, их идентификационные характеристики и потенциальные вирусные контаминанты. Особое внимание следует уделить возможности случайного перекрестного загрязнения клетками других линий или вирусами, не эндогенными для данной линии клеток.

Используемая линия клеток не должна синтезировать никаких эндогенных иммуноглобулиновых цепей как до, так и после трансфекции.

Криоконсервированные образцы линии клеток хозяина необходимо сохранять на случай необходимости ретроспективных исследований.

6.2. Получение и характеристика специфических родительских клеток (моноклональные антитела мыши и человека)

Необходимо представить документы на источник иммунных родительских клеток. В случае использования определенного антигена, необходимо представить информацию о его источнике, условиях приготовления и процедуре иммунизации.

Если иммунные родительские клетки получены от донора человека, необходимо представить информацию, касающуюся здоровья донора (все клинические данные о доноре, особенно данные о возможных вирусных инфекциях). Описание состояния здоровья донора должно охватывать период в несколько месяцев до и после получения клеток, чтобы удостовериться, что вирусы, передающиеся через кровь, такие как ВИЧ (HIV 1,2), гепатит В (HBV) и гепатит С (HCV), не находились в периоде инкубации. Если эти условия не могут быть полностью выполнены, необходимо дать для этого обоснование. Также должно быть показано, что система банков клеток не содержит подобных вирусов (таких как HIV 1,2; HBV; HCV).

Для производства моноклональных антител, имеющих особую терапевтическую значимость, может возникнуть необходимость использовать клетки, потенциально контаминированные вирусом. В таком случае

необходимо рассмотреть возможность определения вируса в банке клеток и ввести дополнительно один или несколько этапов, обеспечивающих инактивацию этого вируса в процессе получения моноклональных антител.

7. Линия клеток, продуцирующая моноклональные антитела

7.1. Получение линии клеток

Должно быть приведено полное описание получения линии клеток, секретирующей моноклональные антитела, включая детали слияния клеток, трансформации вирусом Эпштейна-Барр и процедуры клонирования, в случае необходимости. Должна быть предоставлена достаточная информация для оценки эффективности процедуры клонирования.

Необходимо дать описание реагентов, используемых при слиянии клеток и процедуре селекции, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

7.2. Характеристика линии клеток

Необходимо дать подробную характеристику линии клеток, продуцирующей моноклональные антитела. Она должна включать указание на специфичность, класс и, при необходимости, подкласс секретируемого иммуноглобулина, наряду с другими отличительными признаками, такими как изоэнзимные/иммунохимические маркеры. Необходимо установить способность клеток – партнеров слияния – продуцировать иммуноглобулиновые цепи. Секреция антител должна быть стабильной по отношению к обоим типам антител (переключение класса) и уровню экспрессии до и после удвоения популяции при рутинной продукции. Необходимы меры предосторожности для предупреждения перекрестного загрязнения другими клетками.

8. Линия клеток, продуцирующая рекомбинантные моноклональные антитела

8.1. Клонирование и характеристика ДНК, кодирующей неспецифические участки рекомбинантных моноклональных антител

Как для химерных, так и для гуманизированных моноклональных антител необходимо описать источник, способ выделения и стратегию клонирования генов тяжелых и легких цепей. Необходима также следующая информация:

• последовательность встроенных участков, используемых для замены в гуманизированных моноклональных антителах для улучшения CDR – конформации (где применимо);

• обоснование выбора изотипа иммуноглобулина;

• характеристика генов константных доменов иммуноглобулина человека (например, путем картирования с помощью рестриктаз).

8.2. Селекция, клонирование и характеристика ДНК, кодирующей специфические участки рекомбинантных моноклональных антител

Необходимо указать источник линии клеток гибридомы и дать характеристику моноклональных антител грызунов.

Необходимо дать описание клонирования генов вариабельных участков тяжелых и легких цепей иммуноглобулина грызунов из гибридомной линии клеток и дать характеристику кодирующих регионов клонированных генов.

Для гуманизированных моноклональных антител необходимо представить описание способов идентификации, методов выделения, которые могут быть выполнены либо путем клонирования, либо синтеза, а также охарактеризовать гены CDR для обеих тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов грызунов.

8.3. Конструкция гена, кодирующего рекомбинантное моноклональное антитело

Необходимо дать описание стратегии присоединения вариабельного фрагмента иммуноглобулина грызуна к константному региону иммуноглобулина человека либо, в случае гуманизированных антител, встраивания CDR генов (областей, определяющих комплементарность) грызуна в соответствующие последовательности иммуноглобулина человека.

В документации должны быть следующие сведения:

• информация о линии клеток и векторах, используемых в продуцировании моноклональных антител, а также описание векторов экспрессии, используемых для трансфекции генов рДНК антител в линию клеток млекопитающих, используемых в качестве клеток хозяина, включая их источник, структуру и выбранные маркеры;

• нуклеотидные последовательности интересующих генов и фланкирующих регуляторных областей векторов экспрессии как для тяжелых, так и для легких цепей. Детальная карта последовательностей, на которой показаны области, секвенированные в процессе конструирова-

ния, а также области, последовательности которых указаны на основании данных литературы. Последовательности мест соединения, созданные за счет лигирования в процессе конструирования, должны быть подтверждены секвенированием;

• четкая идентификация всех известных экспрессирующих последовательностей;

• индикация любых дополнительных модификаций.

8.4. Получение линии клеток, экспрессирующей рекомбинантные моноклональные антитела

В дополнение к документации, касающейся исходного штамма или линии клеток хозяина, необходимо представить следующую информацию:

• методы, используемые для введения вектора в клетку хозяина, отбор и клонирование трансформантов;

• состояние вектора внутри клетки хозяина;

• материалы детального исследования, с использованием различных рестриктаз и метода саузерн-блот (Southern blot analysis), для представления убедительных данных о включении вектора в клетку хозяина – информация об экспрессионной системе может быть получена и с помощью метода норзерн-блот (Northern blot analysis);

• детальное описание стратегии, при помощи которой экспрессия соответствующего гена начинается и контролируется (в процессе производства).

8.5. Генетическая стабильность

Стабильность генетических и фенотипических характеристик системы хозяин/вектор должна исследоваться до и после соответствующего уровня количества удвоений популяции или количества пассажей клеток, ожидаемых при полномасштабном производстве. Такие исследования стабильности должны обеспечить следующую детальную информацию:

• копийность гена с точки зрения продуктивности культуры;

• характеристика моноклональных антител; для этого может быть использован анализ на уровне белка и/или на уровне ДНК (какой бы метод ни использовался, он должен быть валидирован и указаны пределы обнаружения);

• уровень и постоянство экспрессии как тяжелых, так и легких цепей.

9. Система банков клеток

9.1. Создание системы банков клеток (ОБК и РБК)

Необходимо, чтобы производство базировалось на хорошо организованной системе банков клеток. Обычно она включает Основной банк клеток (ОБК) и Рабочий банк клеток (РБК) производителя. Во время создания банка клеток не следует одновременно работать с другими линиями клеток, в тех же лабораторных помещениях или при участии одного и того же персонала. Источник, форма, хранение, использование и сведения, касающиеся жизнеспособности клеток в течение предполагаемого периода использования, должны быть подробно описаны для всех банков клеток. Новые рабочие банки клеток должны быть полностью охарактеризованы.

Образцы рабочего банка клеток необходимо хранить, как минимум, до истечения срока годности последней выпущенной партии продукта.

9.2. Контроль вирусной и микробной контаминации

Клетки различных уровней, включающие ОБК, РБК и ПБК (Послепроизводственный банк клеток; см. раздел 3), необходимо исследовать на наличие посторонних агентов (вирусных, бактериальных, грибковых или микоплазменных). Особое внимание следует обращать на вирусы, которые часто контаминируют те виды животных, от которых получена линия клеток. С помощью соответствующих тестов следует доказать отсутствие вирусной контаминации, как описано в прилож. 1.

Следует учитывать, что определенные линии клеток содержат эндогенные вирусы, например, ретровирусы, которые не так легко удалить. Более того, потенциальное вирусное загрязнение может привести к формированию полных вирусных геномов или субгеномных фрагментов, приводящих к экспрессии инфекционных вирусных частиц.

Необходимо учитывать возможность мутации эндогенных вирусов во время продолжительного культивирования. Присутствие нуклеотидных последовательностей вирусных геномов не исключает возможности использования клеток, но любая выявленная экзогенная вирусная нуклеиновая кислота должна быть идентифицирована. Если для создания линии клеток, секретирующей антитела, использована гетерогибридома, банк клеток следует контролировать на присутствие мышиных и человеческих вирусов.

Линия клеток, которая продуцирует какие-либо инфекционные вирусы, способные инфицировать клетки человека, может быть использо-

вана только при наличии исключительных обстоятельств. Все продукты, получаемые при использовании таких линий клеток, должны рассматриваться индивидуально в каждом конкретном случае. Если линия клеток секретирует инфекционные вирусы, должны быть предприняты соответствующие меры предосторожности, чтобы защитить от заражения персонал, участвующий в производстве.

Особую настороженность вызывает использование в производстве моноклональных антител человека линий клеток, трансформированных путем преднамеренного введения вируса Эпштейна-Барр (EBV). EBV-трансформированные В-клетки человека в целом не секретируют вирусные частицы, однако эти клетки содержат комплекс копий вирусного генома и нуклеотидные последовательности EBV, которые могут быть определены с помощью ПЦР или путем совместного культивирования с соответствующей индикаторной линией клеток.

9.3. Характеристика

Критическим разделом контроля качества является полная характеристика клеток. Подлинность клеток устанавливается путем оценки отличительных маркеров клеток, таких как специфические изоэнзимы, иммунологические, а также фенотипические характеристики.

Если процедура EBV-трансформации используется исключительно с целью генерации линии клеток для производства моноклональных антител человека, могут возникнуть сложности во время процедуры клонирования. В этом случае необходимо представить убедительные доказательства того, что линия клеток моноклональна.

9.4. Секреция цитокинов

Следует учитывать, что лимфоциты и/или фидерные клетки могут секретировать биологически активные медиаторы, которые имеют различные функции и могут быть причиной побочных эффектов при введении человеку. В процессе производства возможно удаление эндогенных медиаторов, таких как интерфероны и другие цитокины.

9.5. Создание Послепроизводственного банка клеток

С целью валидации процесса должен быть создан Послепроизводственный банк клеток (ПБК). При использовании в производстве однократного сбора, для создания банка должны быть использованы клетки на уровне 10 или более удвоений популяции сверх максимального уровня удвоения, используемого для рутинного производства. При использовании в производстве многократных сборов время сбора клеток для соз-

дания банка должно на одну треть превышать общую продолжительность периода культивирования.

10. Характеристика моноклональных антител

Моноклональные антитела должны быть тщательно охарактеризованы. Характеристика должна включать оценку как биохимических/физико-химических, так и биологических/иммунологических свойств антител. Кроме того, необходимо оценивать специфичность и перекрестную реактивность моноклональных антител.

10.1. Биохимическая/физико-химическая характеристика

Биохимические/физико-химические свойства антител должны быть описаны подробно. Необходимо, как минимум, определить следующие параметры: класс, подкласс (в случае необходимости) и строение легких цепей, молекулярную массу, а также N- и С-концевые последовательности, вторичную и третичную структуры иммуноглобулина.

10.2. Биологическая/иммунологическая характеристика

Иммунологические свойства антител должны быть описаны подробно. Биологическая/иммунологическая характеристика должна включать антигенную специфичность, т. е. характеристику эпитопа, распознаваемого антителом, связывающую способность, возможность связывания и активации комплемента, цитотоксические свойства, антителозависимую цитотоксичность, способность модифицировать соответствующие антигены, способность стимулировать иммунокомпетентные клетки, индуцировать секрецию цитокинов или других медиаторов.

10.3. Специфичность и перекрестная реактивность

В анализ необходимо включить определение непредусмотренной реактивности или цитотоксичности по отношению тканей человека, отличных от ожидаемой исследователем мишени, и перекрестной реактивности с широким спектром тканевых антигенов человека (перечисленных в прилож. 2) с помощью иммуногистохимических методов.

11. Производство

Метод производства в условиях *in vitro* является более предпочтительным. Производство моноклональных антител в условиях *in vitro* позволяет обеспечить контроль производства, стандартизацию, а также имеет важные преимущества над производством в условиях *in vivo* в отношении вирусной безопасности, постоянства производства и отсут-

ствия контаминирующих иммуноглобулинов в неочищенных сборах. Другие преимущества этого метода производства заключаются в использовании культуральных сред без сыворотки, а также в значительном сокращении использования животных. Выбор производства в условиях *in vivo* должен быть обоснован.

Необходимо дать четкое определение понятия «серия» продукта, предназначенного для дальнейшей обработки. Производственная серия обычно должна начинаться с новой ампулы Рабочего банка клеток (РБК) производителя. Необходимо представить детали культивирования клеток и методы контроля процесса производства. Следует определить критерии для отбраковки сборов и преждевременного прекращения культивирования клеток.

11.1. Производство в условиях in vitro

При каждом производственном цикле, до объединения сборов, должно быть тщательно проверено присутствие, степень и природа любого микробного загрязнения в каждой емкости для культивирования клеток. Необходимо представить детальную информацию для подтверждения чувствительности методов, используемых для определения контаминации, а также указать допустимые пределы контаминации. Полуфабрикат культуральной жидкости должен быть свободен от контаминации микоплазмами, грибами и бактериями, также должно быть проведено тестирование на присутствие вирусов путем использования общепринятого теста, включающего инокуляцию в соответствующие клеточные субстраты (прилож. 1 (б).

Должны быть указаны состав и источник среды для культуры клеток, используемой в производстве. Если используются добавки из сыворотки животных, должно быть показано, что они свободны от контаминантов (раздел 5.2).

Оптимальными являются условия, при которых в одной производственной зоне в одно и то же время культивируется только одна линия клеток. Если параллельно культивируются другие линии клеток, должна быть документированная информация о линиях клеток, находящихся в работе, и представлены доказательства, что между ними отсутствует перекрестная контаминация.

11.1.1. Производство с однократным сбором продукта

Должно быть установлено максимальное количество возможных генераций для производства, основываясь на информации, касающейся

стабильности линии клеток до момента достижения уровня производства и выше него. Необходимо представить данные о постоянстве роста культуры и стабильности выхода («урожая») в указанных пределах. Необходимо проводить соответствующий мониторинг характеристик линии клеток в конце производственного цикла. Следует представить доказательства того, что выход продукции не нарушает установленные пределы, а природа и качество продукта соответствуют параметрам спецификации.

11.1.2. Производство с многократным сбором продукта

Должен быть определен период непрерывного культивирования, установленный на основе информации, касающейся стабильности системы и постоянства качества продукта до и выше установленного предела. В течение всего периода культивирования клеток необходим мониторинг системы. Требуемая частота и тип мониторинга будут зависеть от нескольких факторов, включающих природу системы экспрессии и моноклональных антител, а также общую продолжительность непрерывного культивирования. Приемлемость сборов для дальнейшей переработки должна быть четко связана с результатами проводимого мониторинга. Необходимо представить доказательства того, что выход продукта не нарушает установленные пределы, а природа и качество моноклональных антител соответствуют параметрам спецификации.

11.2. Производство in vivo

Производство в условиях *in vivo* должно отвечать дополнительным требованиям, описанным ниже.

11.2.1. Характеристика используемых животных

Род и источник животных, используемых для производства, должны быть определены, включая генотип и возраст. Животные должны быть взяты из закрытых, свободных от специфических патогенов (ССП) хозяйств, которые постоянно проверяются на наличие вирусов, перечисленных в прилож. 1 (табл. 2). Для подтверждения статуса хозяйства нужны долговременные записи об отсутствии вирусной контаминации разводимой колонии. Должны быть представлены доказательства, что животные содержатся в ССП условиях в период всего времени транспортирования и использования.

11.2.2. Сбор и работа с асцитной жидкостью

Каждая производственная серия должна брать начало от свежей ампулы Рабочего банка клеток (РБК) производителя. Максимальное количество возможных серийных пассажей *in vivo* во время нормального производства должно быть определено и ограничено. Подтверждение этого предела должно включать информацию, касающуюся выхода моноклональных антител и стабильности характеристик гибридомы в пассажах *in vivo* до и выше уровня, используемого в производстве. Неограниченное количество пассажей на животных неприемлемо. Необходимо представить схему праймирования, инокуляции и сбора продукта.

Количество животных и процедура, используемая для приготовления полуфабриката асцитных сборов, должны быть указаны максимально подробно. Необходимо дать полное описание всех веществ, используемых для предварительной обработки мышей или крыс с целью стимуляции роста гибридомы. Должно быть дано описание с указанием объема и концентрации клеточного инокулята. Необходимо представить данные, касающиеся титров антител и условий хранения полученной асцитной жидкости (температура, продолжительность, подробности о любых добавленных ингибиторах протеолитических ферментов).

Особое внимание должно быть обращено на степень и природу любого микробиологического загрязнения (бактериального, микотического или микоплазменного) в полуфабрикате асцитной жидкости. Процедуры тестирования, способные выявить все вирусы мышей, перечисленные в прилож. 1 (табл. 2), должны быть выполнены в соответствии с указаниями прилож. 1 (а) и (б), по меньшей мере, на первых пяти полуфабрикатах продукта. Общие методы тестирования на вирусы могут оказаться достаточными по мере накопления опыта производства, поэтому после первых пяти выпусков продукции общее тестирование на вирусы может быть ограничено тестами, описанными в прилож. 1 (б). Следует идентифицировать любой инфекционный агент, тесты на вирусы из группы I (табл. 2) должны быть отрицательными. Если источник получения мышей меняется на другое хозяйство или поставщика, тесты, определенные в прилож. 1 (а), должны быть выполнены, по меньшей мере, на первых пяти полуфабрикатах продукта, чтобы заново установить, что продукт свободен от контаминирующих агентов.

11.3. Вирусологические аспекты: контроль в процессе производства

Полуфабрикат сборов продукта должен проверяться на присутствие вирусов с использованием общепринятого теста, включающего инокуляцию в соответствующие клеточные субстраты, как указано в прилож. 1 (б).

12. Очистка антител

12.1. Методы

Методы очистки продукта и методы контроля степени очистки в процессе производства, включая требования по контролируемым показателям, должны быть подробно описаны, обоснованы и валидированы. Следует убедиться в том, что процессы очистки не оказывают отрицательного влияния на иммунобиологические свойства иммуноглобулина. При применении методов, включающих аффинную хроматографию с использованием моноклональных антител, необходимо принять меры, гарантирующие, что эти и другие материалы, используемые в производстве, являющиеся потенциальными контаминантами, не ухудшат качество и безопасность конечного продукта.

Критерии для повторной переработки любого промежуточного или конечного полуфабриката продукта должны быть тщательно установлены, валидированы и обоснованы.

Включение процедур по инактивации/удалению потенциальных вирусных контаминантов не должно снижать биологическую активность продукта.

12.2. Валидация очистки

Необходимо тщательно исследовать способность процедур очистки к удалению примеси белков клетки хозяина, нуклеиновых кислот, углеводов, вирусов и других примесей, включая белковые примеси, связанные с продуктом. Следует показать, что любой используемый процесс инактивации является эффективным и не ухудшает биологическую активность продукта. Необходимо также продемонстрировать воспроизводимость процессов очистки в отношении их способности удалять специфические контаминанты. Необходимо проводить испытания методом добавок, используя, например, тщательно выбранную группу вирусов, обладающих диапазоном физико-химических характеристик, важных с точки зрения оценки процесса очистки, белки клеток-хозяина, другие потенциальные примеси, появляющиеся в процессе производста (например, фрагменты тяжелых или легких цепей иммуноглобулина), ДНК,

специально добавляя их к неочищенному препарату. Результаты этих исследований дадут возможность оценить степень удаления таких контаминантов на этапах очистки.

Выбор нуклеотидной пробы для выявления контаминации ДНК должен соответствовать используемой системе. Должен быть установлен фактор удаления таких контаминантов на каждой стадии очистки путем использования концентраций вирусов, белков клеток-хозяина, других потенциальных примесей и ДНК, превышающих ожидаемые концентрации во время нормального производства.

Если линия клеток содержит субгеномные вирусные фрагменты (раздел 9.2), необходимо обратить особое внимание на использование в методе добавок для ДНК подходящей вирусной нуклеиновой кислоты. Если линия гибридомы создана при помощи трансформации вирусом Эпштейна-Барр, для выявления специфических EBV последовательностей необходимо использовать чувствительные методики, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Валидация процесса очистки должна включать также обоснование рабочих условий, таких как нагрузка на колонку, регенерация колонки, очистка и длительность ее использования.

13. Конечный полуфабрикат

13.1. Моноклональные антитела

Необходимо дать тщательную характеристику очищенных моноклональных антител химическими и биологическими методами. По меньшей мере, необходимо определить следующие параметры: класс, подкласс и строение легких цепей, точки гликозилирования, целостность молекулы путем анализа соотношения тяжелых/легких цепей, микрогетерогенность, молекулярную массу, N- и С-концевые последовательности, а также вторичную и третичную структуры антитела. По мере накопления опыта, тестирование на подкласс и строение легких цепей, N- и С-концевые последовательности, вторичную и третичную структуры можно не проводить. Следует определять также общее содержание белка, агрегаты и фрагменты иммуноглобулина. Необходимо установить соответствующие спецификации для этих параметров с включением допустимых пределов. Достаточная информация для адекватной характеристики последовательности генетического продукта, особенно для генно-инженерных и гуманизированных антител, может

быть получена путем пептидного картирования или установления аминокислотной последовательности.

Особое внимание следует уделять использованию широкого спектра аналитических методов, основываясь на различных физико-химических свойствах молекулы. Примерами таких методов служат электрофорез в полиакриламидном геле с SDS в редуцирующих и нередуцирующих условиях, изоэлектрическое фокусирование, колоночная хроматография (включая ВЭЖХ), пептидное картирование, аминокислотный анализ, круговой дихроизм и углеводное картирование. В документацию на препарат должны быть включены фотографии гелей и т. д.

Следует оценить иммунореактивность антител. Необходимо определить специфическую удельную активность очищенных моноклональных антител (соотношение единиц активности/масса продукта).

Необходимо проводить четкое различие между аналитическими методами, выполненными в процессе разработки для полной характеристики моноклональных антител, и методами, выполняемыми рутинно для каждой партии полуфабриката очищенного продукта. Методы рутинного контроля качества следует проводить для каждой партии полуфабриката продукта в соответствии с Руководством по GMP.

13.2. Чистота

Необходимо представить данные о контаминантах, которые могут присутствовать в конечном полуфабрикате. Следует установить степень контаминации, которая считается приемлемой, а также критерии принятия или отбраковки производственной серии. Важно, чтобы методы, используемые для доказательства чистоты, включали широкий спектр физико-химических и иммунологических методик. Сюда необходимо включить методы, позволяющие выявлять контаминацию вирусами, нуклеиновыми кислотами и белками родительских клеток, гибридомных клеток или клеток хозяина, а также компонентами культуральной среды или материалами, добавленными во время производства или на стадии очистки.

Для конечного продукта необходимо установить допустимую концентрацию общего белка и клеточной ДНК, уровень специфической активности, показатели микробиологической и химической чистоты, а также проводить исследование уровня эндотоксинов.

13.3. Посторонние агенты

Необходимо показать, что конечный полуфабрикат свободен от бактериальных, грибковых и микоплазменных загрязнений. Необходимо представить доказательства, что любая возможная вирусная контаминация полученного продукта была удалена или инактивирована (прилож. 1).

14. Стабильность производства и рутинный контроль конечного полуфабриката

Необходимо провести исчерпывающий анализ первоначальных серий продукта, чтобы установить их стабильность в отношении показателей подлинности, чистоты и специфической активности. Далее возможно использование более ограниченного набора тестов, которые приведены ниже.

14.1. Стабильность производства

Следует представить доказательства стабильности производства на примере, по меньшей мере, пяти последовательных полномасштабных производственных серий. Они должны включать информацию об объединенных сборах, о конечном дозированном продукте, а также о контроле в процессе производства. В случае производства, где используются многократные сборы, необходимы исследования серий от различных циклов ферментации. Исследования должны включать использование биологических, химических и иммунологических методов для характеристики и количественного определения моноклональных антител, а также методов для определения и идентификации примесей. Необходимо отмечать любые различия, выявленные между сериями.

14.2. Рутинный контрольный анализ серии

14.2.1. Подлинность

Необходимо использовать набор тестов для характеристики очищенных моноклональных антител, чтобы подтвердить подлинность продукта каждой серии. Используемый набор тестов должен включать методы оценки биологической активности, а также физико-химические и иммунологические методы. Генно-инженерные антитела требуют постоянного подтверждения пептидной последовательности с помощью адекватных методов, таких как пептидное картирование.

14.2.2. Чистота

Желательная и достигаемая степень чистоты будут зависеть от нескольких факторов, которые включают природу и назначение продукта, методы производства и очистки, а также степень стабильности производственного процесса. Необходимо определять чистоту каждой серии, показатели чистоты должны находиться в установленных пределах. Для генно-инженерных моноклональных антител анализ должен включать чувствительные и надежные испытания на ДНК клеток хозяина и применяемых векторов для каждой серии продукта. Должен быть установлен строгий верхний допустимый предел количества ДНК в продукте.

Необходимо показать, что продукт свободен от микробных загрязнений. Следует представить доказательства того, что любая вирусная контаминация, присутствующая в обьединенных сборах, была удалена или инактивирована (прилож. 1). Следует провести оценку пирогенности.

Особое внимание следует уделять определению степени агрегации или молекулярной фрагментации иммуноглобулина. Необходимо предпринять все возможные меры, чтобы предотвратить агрегацию. Необходимо обосновать установленные допустимые пределы присутствия олигомеров иммуноглобулина.

14.2.3. Тестирование активности

Если возможно, биологическая активность моноклональных антител должна быть установлена путем биологических испытаний. Дополнительная информация по специфической активности будет весьма ценной и должна быть предоставлена. Для стандартизации оценки специфической активности необходимо использовать полностью охарактеризованный стандартный препарат (раздел 15).

15. Спецификации и стандартные материалы

Результаты исследований, проведенных в соответствии с указаниями разделов 10 и 11, могут быть использованы для составления окончательных спецификаций на препарат.

В качестве стандартного препарата (образца) необходимо использовать подходящую серию продукта, которая была использована при клинических испытаниях и полностью охарактеризована с точки зрения химического строения, чистоты, эффективности и биологической активности. Необходимо установить критерии для стандартного препарата, критерии для повторного тестирования и продления срока годности.

16. Модифицированные моноклональные антитела

В некоторых случаях препараты субфрагментов антитела (Fab- или $F(ab')_2$-фрагменты) имеют определенные преимущества для применения. Если такие фрагменты предпочтительнее для клинического использования, необходимо определить их молекулярные и антигенные свойства. Необходимо выполнить соответствующие аналитические тесты. Следует определить допустимые пределы примесей, таких как фрагменты, отличные от ожидаемых, или цельные молекулы иммуноглобулина. Должна быть дана спецификация с указанием пределов каждой примеси (например, остатков использованных ферментов, таких как пепсин или папаин), специфической активности, иммунореактивности и перекрестной реактивности. Необходимо подготовить стандартную серию препарата. Все методики должны быть валидированы.

Терапевтическое и диагностическое воздействие, при использовании моноклональных антител или субфрагментов антител, иногда может быть усилено путем химических модификаций (например, радиоактивная метка, конъюгация с токсином, присоединение к специфическим веществам для достижения «мишени», химическое связывание двух молекул антител или их производных для создания антител с двойной специфичностью). Должно быть представлено детальное описание их подготовки и очистки. Каждый этап производственного процесса требует валидации и контроля качества, включая исходные материалы, установление пределов для примесей, появляющихся в процессе производства, подтверждение стабильности и т. д. Модификации могут изменить свойства моноклональных антител. Основные требования для таких продуктов должны включать информацию, касающуюся периода полураспада биологически активных антител, лекарственного продукта или токсина, а также конъюгатов после введения реципиенту. Должна быть представлена информация о специфичности, токсичности и стабильности конъюгата.

В спецификации следует указать критерии и пределы для показателей чистоты и активности готового продукта, следует также определить иммунореактивность и перекрестную реактивность. Могут потребоваться дополнительные специфические контрольные процедуры, но они рассматриваются индивидуально в каждом конкретном случае.

Необходимо подготовить стандартную серию. Все методы должны быть валидированы.

17. Конечный продукт и разработка готового лекарственного продукта

Разработка рецептуры должна быть подробно описана и обоснована, особенно в отношении присутствия и количества стабилизаторов, таких как альбумин и/или детергенты. Необходимо показать, что продукт в конечных емкостях соответствует требованиям Фармакопеи. При обстоятельствах, где не представляется возможным выполнить все тесты, производитель должен обосновать этот факт.

18. Эквивалентность продукта

Изменения или адаптация производства моноклональных антител в период клинических испытаний или регистрации продукта могут привести к получению измененных форм антител с идентичной специфичностью. Примеры таких изменений – переход от производства *in vivo* к производству *in vitro*, изменения в процедуре культивирования или условий культивирования, изменения в процедуре очистки или дополнительные модификации молекулы моноклонального антитела. В этих случаях необходимо выполнить исследования по подтверждению эквивалентности продукта, чтобы показать, что обе формы антител обладают необходимой идентичностью.

Во всех случаях в такие исследования необходимо включить полную физико-химическую и биологическую характеристику обоих антител.

18.1. Исследования эквивалентности продукта in vitro

Необходимо определить физико-химические параметры моноклональных антител, такие как изотип, подкласс, микрогетерогенность, молекулярная масса, первичная и вторичная структуры, точки гликозилирования, структурная целостность. Биологическая характеристика должна включать оценку иммунореактивности и перекрестную реактивность, определение соответствующих функциональных свойств, а также исследование связывающей способности антител для определения аффинитета.

Если имеются изменения в процедуре культивирования/условиях культивирования без изменений ОБК, необходимо проанализировать такие параметры, как морфология, рост клеток, жизнеспособность, изоферменты и стабильность продукции.

18.2. Исследования эквивалентности продукта in vivo

Решение о выборе методов исследования *in vivo* зависит от результатов аналитических исследований. В случае идентичности аналитических результатов, касающихся обеих форм антител, должна быть определена, по крайней мере, фармакокинетика, биодоступность и период полураспада антител.

18.3. Клинические исследования

Если показано, что оба моноклональных антитела имеют идентичные физико-химические, биологические и фармакологические характеристики, клинические исследования могут быть выполнены с использованием первых моноклональных антител. Однако необходимым условием является то, что производство базируется на том же самом Основном банке клеток хозяина. В противном случае, клинические испытания необходимо проводить и со второй формой антител.

18.4. Производственный процесс

Необходимо продемонстрировать стабильность процесса производства моноклональных антител, включая валидацию производственного процесса и контроль качества продукта, выполненные в соответствии с необходимыми требованиями.

Приложение 1

Оценка вирусной контаминации

Тестирование на вирусы необходимо выполнять в лабораториях, где имеется опыт рутинного тестирования вирусов, и его необходимо проводить в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (GLP).

В табл. 1 перечислены тесты на вирусы, которые необходимо выполнять на различных стадиях производства.

В табл. 2 перечислены вирусы, которые необходимо рассматривать как потенциальные контаминанты в производстве моноклональных антител, полученных при использовании линий клеток мышиного происхождения.

В табл. 3 перечислены вирусы, которые необходимо рассматривать как потенциальные контаминанты в производстве моноклональных антител, полученных при использовании линий клеток человеческого происхождения.

Тестирование на вирусную контаминацию

а) Тесты для определения специфических вирусов.

• *Моноклональные антитела, полученные на линиях клеток мышиного происхождения.* Тесты для определения специфических вирусов перечислены в табл. 2, например, тесты антителообразования у мышей (MAP) и антителообразования у крыс (RAP) или другие тесты, по меньшей мере, с эквивалентной чувствительностью и надежностью. Может потребоваться проведение специфических тестов на вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), цитомегаловирус мышей, ротавирус мышей (EDIM), тимический вирус и вирус лактат дегидрогеназы. Необходимо включить тесты, способные определить ретровирус мышей, например, пробы на XC тромбоциты или пробы на S+L-фокус для определения экотропных или ксенотропных ретровирусов, соответственно.

• *Моноклональные антитела, полученные на линиях клеток человеческого происхождения.* Для моноклональных антител человека наличие вирусов, которые могут быть обнаружены в линии клеток, в некоторой степени зависит от происхождения, а также от здоровья донора. Они могут иметь специфическую способность инфицировать В-лимфоциты. Как минимум, необходимо провести тесты на вирусы, о которых известно, что они сохраняются в лимфоцитах. Эти вирусы перечислены в табл. 3. Вирусы следует выявлять при помощи культуральных методов, исполь-

зуя линии клеток, включающие свободные от вирусов лимфобластоидные клетки, также как и исследования самой линии лимфоцитов с использованием иммунохимических процедур, электронной микроскопии, «саузерн блот», полимеразной цепной реакции или других чувствительных методик.

• *Генно-инженерные моноклональные антитела, продуцируемые линиями клеток млекопитающих.* Для генно-инженерных моноклональных антител наличие вирусов, которые могут быть выявлены в линии клеток, зависит от происхождения линии клеток. Необходимо провести тесты на соответствующие вирусы.

б) Методы инокуляции культур клеток.

Данные методы способны выявить широкий спектр вирусов мышей, человека и, если необходимо, крупного рогатого скота.

Примеры используемых типов клеток (субстраты):

• культура фибробластов мышей, например, культура мышиных эмбрионов;

• культура фибробластов человека, например, диплоидные клетки человека, такие как MRC5;

• перевиваемые линии клеток человеческого, мышиного или бычьего происхождения.

Индикаторные клеточные линии в конце периода наблюдения должны быть дополнительно протестированы на гемадсорбирующие вирусы (с эритроцитами крови человека группы 0, морской свинки, цыплят). В исследования должны быть включены тесты на ретровирусы.

с) Тесты на контаминирующие агенты, выполняемые на животных.

Указанные тесты должны проводиться путем внутримышечных инъекций исследуемого материала или разрушенных посевных клеток, выращенных на максимальном уровне (или удвоения популяции (пассажей), если это уместно), используемом при производстве каждой из указанных ниже групп животных:

• не менее 10 новорожденных мышей от 2 пометов в возрасте до 24 ч;

• 10 взрослых мышей;

• 5 морских свинок.

Исследуемый материал 10 взрослым мышам вводится интрацеребрально.

За животными необходимо наблюдать в течение, по меньшей мере, 4-х недель. Животное, которое заболевает или у которого появляются какие-либо отклонения, исследуется для установления причины болез-

ни. Исследуемый материал считается приемлемым для производства, если, по меньшей мере, 80 % испытуемых животных остаются здоровыми и живыми в течение периода наблюдения, и ни одно из животных не проявляет признаков присутствия в исследуемом материале каких бы то ни было контаминирующих агентов.

Субстратом для исследования могут служить и оплодотворенные яйца. Исследуемый материал вводится на хориоаллантоисную оболочку, в амниотическую полость или желточный мешок каждого из 10 куриных эмбрионов в возрасте 9—11 дней. Эти яйца необходимо исследовать не менее чем через 5 дней инкубации. Аллантоисная жидкость тестируется на наличие гемагглютининов на эритроцитах морской свинки, эритроцитах кур или других видов птиц.

Таблица 1

Схема тестирования на вирусную контаминацию

Стадия производства	Применяемые тесты (в соответствии с разделами прилож. 1)		
Основной банк клеток хозяина (ОБК) или Рабочий банк клеток (РБК) производителя	(а)	(б)	(с)
Колония мышей	(а)		
Сборы асцитной жидкости	(а)*	(б)	
Обьединенные сборы продукта, полученного *in vitro*		(б)	
Конечный полуфабрикат продукта	Выполнение тестов из группы (б) осуществляется в случае, если вирусная контаминация была определена в объединенном сборе продукта		
Примечание: знаком «*» помечены тесты, выполнение которых предлагается, по крайней мере, на первых пяти производственных сериях продукта.			

Таблица 2

Вирусы мышей

Группа	Вирус	Поражаемые виды животных
I	Хантавирус (Геморрагическая лихорадка с почечным сидромом)*	М, К
	Вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV)	М
	Ротавирус крыс*	К
	Реовирус типа 3 (reo 3)*	М, К
	Вирус Сендай *	М, К
II	Вирус эктромелии (оспы белых мышей)*	М
	К вирус	М
	Вирус крыс Килхема (KRV)	К
	Вирус лактат дегидрогеназы (LDH)	М
	Мельчайший вирус мышей (MVM)	М, К
	Аденовирус мышей (MAV)	М
	Цитомегаловирус мышей (MCMV)	М
	Вирус энцефаломиелита мышей (MEV, Тейлора или GDVII)	М
	Вирус гепатита мышей (mhv)	М
	Ротавирус мышей (EDIM)	М
	Вирус пневмонии мышей (PVM)	М, К
	Вирус полиомы	М
	Коронавирус крыс (RCV)	К
	Ретровирус*	М, К
	Вирус сиалодакриоаденита (SDA)	К
	Тимический вирус	М
	Вирус Тулана (HI)K	К

Примечание:

- М – мыши;
- К – крысы;
- в группу I включены вирусы, которые, согласно имеющимся фактам, способны инфицировать человека или приматов;
- в группу II включены вирусы, для которых не существует доказательств относительно их способности инфицировать человека, но которые, тем не менее, могут представлять потенциальную опасность, например, для лиц с иммунодефицитными состояниями;
- звездочкой (*) помечены вирусы, о которых известно, что они способны к репликации в клетках человеческого или обезьяньего происхождения в условиях *in vitro*

Таблица 3

Вирусы человека

Перечень вирусов
Вирус иммунодефицита человека (Типов 1 и 2)
Вирус Т- клеточной лейкемии человека (Типов I и II)
Цитомегаловирус
HHV6
Вирус Эпштейна-Барр
Вирус гепатита В
Вирус гепатита С

Приложение 2

Ткани человека, используемые при оценке перекрестной реактивности моноклональных антител

Ниже приведен перечень тканей человека, используемых для иммуногистохимических или цитохимических исследований при оценке перекрестной реактивности моноклональных антител. Этот перечень должен отражать специфичность антител и особенности их использования.

- Миндалины, тимус, лимфатические узлы
- Костный мозг, клетки крови
- Легкие, печень, почки, желчный пузырь, селезенка, желудок, кишечник
- Поджелудочная железа, околоушная железа, щитовидная железа, паращитовидная железа, надпочечник, гипофиз
- Головной мозг, периферические нервы
- Сердце, поперечно-полосатые мышцы
- Яичник, яичко
- Кожа
- Кровеносные сосуды

Приложение 3

Общие сведения о моноклональных антителах

Моноклональные антитела – это антитела с определенной специфичностью, полученные из клонированных клеток или организмов животных. Они могут быть получены из «бессмертных» В-лимфоцитов, которые клонируют и выращивают в виде перевиваемой культуры (мышиные и человеческие моноклональные антитела), из линий клеток млекопитающих или бактерий, с введенной рекомбинантной ДНК (генно-инженерные моклональные антитела).

1. Моноклональные антитела мышиного происхождения

Мышиные моноклональные антитела получают из гибридов, созданных путем слияния В-лимфоцитов иммунизированных мышей или крыс с клетками миеломы мышей.

Основная проблема при терапевтическом использовании мышиных моноклональных антител у человека заключается в возможности формирования антител к иммуноглобулину мыши (человеческие антимышиные антитела, или *HAMA – ответ*) у реципиента. Это может вызывать побочные реакции и ограничивать длительность эффективного терапевтического воздействия моноклональных антител. Период полураспада мышиных моноклональных антител *in vivo* сравнительно короток. Для максимального снижения количества мышиного белка, вводимого пациенту, целесообразно использовать родительские миеломные линии клеток, которые сами не синтезируют иммуноглобулиновые цепи.

2. Человеческие моноклональные антитела

Преимущество человеческих моноклональных антител, по сравнению с мышиными, заключается в том, что существует низкая вероятность формирования антител к ним у реципиента, однако антиидиотипические и, возможно, антиаллотипические антитела могут продуцироваться. Они обладают полным спектром биологических функций, в частности такими, как функции, связанные с Fc-регионом, которые являются видоспецифическими. Существуют и другие преимущества, такие как выбор подкласса иммуноглобулинов со специфическими свойствами.

Основная сложность в получении моноклональных антител человека связана с генерацией гибридомных линий с приемлемой стабильностью, поскольку нет удовлетворительного партнера для получения гибридомы на основе клеток миеломы человека. Также во многих случаях сложно получить антиген-сенсибилизированные лимфоциты, пригодные для слияния.

Существует несколько альтернативных подходов для получения человеческих моноклональных антител:

• слияние лимфоцитов человека (обычно извлеченных из периферической крови или лимфатических узлов) с клетками миеломы мышей или клетками гибридной миеломной линии человек–мышь. Эта процедура обычно схожа с гибридомной технологией, используемой для получения мышиных моноклональных антител, однако имеются некоторые технические проблемы, такие как более низкая эффективность слияния и потеря, в первую очередь человеческих хромосом. Указанный подход может рассматриваться как альтернативный из-за отсутствия подходящего партнера для слияния – миеломной линии человека;

• трансформация лимфоцитов человека вирусом Эпштейна-Барр (EBV), указанная процедура использовалась многие годы для получения перевиваемых быстро растущих В-клеток человека;

• слияние В-лимфоцитов человека с линией лимфобластоидных В-клеток человека;

• слияние клеток линии EBV-трансформированных В-лимфоцитов человека с клетками линии миеломы мышей.

3. Генно-инженерные моноклональные антитела.

Альтернативный подход для исключения *HAMA – ответа* и сокращения продолжительности эффективного действия терапии при использовании мышиных антител, а также многочисленных производственных проблем, связанных с продукцией человеческих моноклональных антител, заключается в получении так называемых химерных или гуманизированных моноклональных антител с использованием технологии рекомбинантной ДНК (рДНК) и методов экспрессии генов эукариот. Оба типа генно-инженерных моноклональных антител с использованием технологии рДНК содержат последовательности, присущие человеку.

В химерных антителах различные домены тяжелых и легких цепей антитела человека замещаются таковыми, взятыми от антител грызунов (обычно крыс или мышей) и обладающими требуемой антигенной специфичностью.

В гуманизированных антителах только три короткие гипервариабельные последовательности (регионы, определяющие комплементарность, или CDR's) вариабельных доменов каждой цепи от антитела грызунов встраивают в вариабельный домен антитела человека, что обусловливает продуцирование мозаичных вариабельных регионов. Гуманизированные антитела содержат минимум последовательностей грызунов.

Для экспрессии рекомбинантных генов моноклональных антител приемлемыми являются линии клеток млекопитающих, в частности линии миеломных клеток, не продуцирующие иммуноглобулины, способные к высокому уровню экспрессии генов экзогенных тяжелых и легких цепей и гликозилированию, сборке и секреции функционально активных антител.

Генно-инженерные моноклональные антитела могут иметь преимущества в плане снижения иммуногенности, увеличения продолжительности периода полураспада в условиях *in vivo* в сочетании с высокой специфичностью и функциональной активностью.

Определенные аспекты требований, предъявляемых к контролю химерных и гуманизированных антител на основе рекомбинантной ДНК, подобны требованиям контроля, которые указаны для продуктов, полученных с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Эти требования контроля касаются, в частности, положения рДНК внутри клетки хозяина, регулирования экспрессии и стабильности экспрессирующей системы, процедуры очистки.

gost.e-ecolog.ru