

**Производство лекарственных средств
ВАЛИДАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ИНАКТИВАЦИИ И
УДАЛЕНИЯ ВИРУСОВ**

**Вытворчасць лекавых сродкаў
ВАЛІДАЦЫЯ ДАСЛЕДВАННЯЎ ІНАКТЫВАЦЫІ І
ЎДАЛЕННЯ ВІРУСАЎ**

Издание официальное

Департамент фармацевтической
промышленности Министерства
здравоохранения Республики
Беларусь

Минск

Ключевые слова: лекарственное средство, производство, вирусная безопасность, методики испытаний, инактивация и удаление вирусов

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 РАЗРАБОТАН Республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр ЛОТИОС» (Государственное предприятие «НПЦ ЛОТИОС»).

ВНЕСЕН Департаментом фармацевтической промышленности Министерства здравоохранения Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Департаментом фармацевтической промышленности Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 20 декабря 2014 г. № 84.

3 Настоящий технический кодекс гармонизирован с международным нормативным документом ЕС CEN/ISO/TC 251/SC 4/WG 1/2014/1/FDIS «Note for Guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses» (Дополнение к Руководству по валидации вирусных исследований: разработка, проведение и интерпретация исследований по валидации инактивации и удаления вирусов).

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий технический кодекс установившейся практики не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Департамента фармацевтической промышленности

Издан на русском языке

ТЕХНИЧЕСКИЙ КОДЕКС УСТАНОВИВШЕЙСЯ ПРАКТИКИ

**Производство лекарственных средств
ВАЛИДАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ИНАКТИВАЦИИ И УДАЛЕНИЯ ВИРУСОВ**
**Вытворчасць лекавых сродкаў
ВАЛІДАЦЫЯ ДАСЛЕДВАННЯЎ ІНАКТЫВАЦЫІ І УДАЛЕННЯ ВІРУСАЎ**

Manufacture of medicinal products
Validation studies for inactivation and removal of viruses

Дата введения 2015-04-01

1 Область применения

Настоящий технический кодекс установившейся практики (далее – технический кодекс) распространяется на все процедуры вирусной инактивации или удаления вирусов **для всех категорий медицинской продукции для использования человеком, за исключением живых вирусных вакцин, содержащих генетически модифицированные векторы.**

Настоящий технический кодекс может быть также применён для:

- продукции, произведенной *in vitro* из культуры клеточных **линий человеческого или животного происхождения;**

- продукции, произведенной *in vivo* из культуры клеточных линий или из органов и тканей **человеческого или животного происхождения;**

- продукции, произведенной из крови, мочи или других биологических **жидкостей человеческого или животного происхождения.**

Настоящий технический кодекс устанавливает общие требования к разработке, проведению и интерпретации результатов исследований инактивации и удаления вирусов при производстве лекарственных средств.

Настоящий технический кодекс применим к лекарственным средствам, производимым в Республике Беларусь, а также к импортируемым лекарственным средствам.

Настоящий технический кодекс может быть использован в производстве ветеринарных препаратов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем техническом кодексе использованы ссылки на следующие технические нормативные правовые акты в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА):

ТКП 030-2013 (02040) Надлежащая производственная практика

ТКП 515-2013 (02041) Производство лекарственных средств. Вирусная безопасность лекарственных средств, произведенных биотехнологическим способом с использованием клеток человеческого и животного происхождения.

ТКП 559-2014 (02041) Производство лекарственных средств. Лекарственные средства на основе плазмы крови.

ТКП 554-2014 (02041) Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний для биологических и биотехнологических лекарственных средств

Примечание – При пользовании настоящим техническим кодексом целесообразно проверить действие ТНПА по каталогу, составленному на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящим техническим кодексом следует руководствоваться замененными (измененными) ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем техническом кодексе применяют термины с соответствующими определениями, установленные в [1], ТКП 030, ТКП 515, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 вирулентность: Мера патогенности, степень болезнетворности микробов, обусловленная набором факторов инвазивности и токсичности. Инвазивность (проникновение) – способность возбудителей

Подобное рассмотрение применимо и к испытаниям лекарственных средств.

5.6 Обеспечение чистоты биологического средства в отношении инфекционного вируса во многих случаях будет достигнуто не только прямым испытанием *на их присутствие, но также демонстрацией того, что производственный процесс способен удалять или инактивировать их.*

5.7 *Валидация процесса вирусного удаления (инактивации) может играть важную и решающую роль в установлении безопасности биологических лекарственных средств, особенно когда существует высокая вероятность загрязнения источника материала вирусами, известными как патогены для человека, например, лекарственного средства, произведенного из плазмы.*

5.8 *Процесс производства может обеспечить измеряемую степень достоверности в том, что удаляется (инактивируется) широкий спектр вирусов, включая неизвестные опасные вирусы.*

5.9 Настоящий технический кодекс содержит основные требования, которые необходимо использовать при выполнении валидации исследований удаления и (или) инактивации вирусов.

5.10 Производители должны применять рекомендации, представленные в настоящем документе, к своей специфической продукции, *принимая во внимание природу источника материала, процедуры, используемые при производстве и очистке, и другие факторы, которые могут отражаться на безопасности.*

5.11 *Подход, применяемый производителем в испытаниях по разработке стадий удаления вирусов, должен быть обоснован.*

6 Источники вирусной контаминации

Вирусная контаминация биологических препаратов может происходить следующими путями:

- источник материала может быть загрязнен вирусом, свойственным виду источника;

Примеры

1 *Кровь может содержать многие вирусы, и использованные препараты из плазмы человеческой крови служат источником инфекций вирусами HBV, HCV, HIV, парвовирусом B19 и иногда HAV.*

2 *Мышечные вирусы, некоторые из которых патогенны для человека, могут загрязнять мышечные гибридомы.*

3 *Клеточные линии, предполагаемые для использования в генетических манипуляциях, могут быть загрязнены вирусами и, вследствие этого, их следует тщательно выбирать и проверять на чистоту от обнаруживаемых случайных агентов даже перед генетической манипуляцией, с тем, чтобы начать с хорошо охарактеризованной клеточной линии.*

- клетки могут иметь латентную или персистентную инфекцию вирусом, например, вирусом герпеса или ретровирусом, который может переноситься вертикально от одной клеточной популяции к следующей как вирусный геном, и который может экспрессироваться периодически как инфекционный агент;

- процесс конструирования клеточной линии может включать контаминантную человеческую лимфобластоидную клеточную линию, секретирующую моноклональные антитела, и может инфицировать её мышечными ретровирусами после интеграции с мышечной миеломой;

- случайные вирусы могут появиться при использовании загрязненных животных препаратов в производственном процессе, например, клеточные культуры могут быть загрязнены коровьими вирусами через применение коровьей сыворотки или мышечные моноклональные антитела, использованные в аффинной хроматографии, могут загрязнять препарат мышечным вирусом;

- другие источники контаминации, например, производственный персонал или редкие материалы небиологической природы, также следует рассматривать как возможные пути попадания контаминантов.

7 Валидация процесса

7.1 Целью исследований по вирусной валидации является:

- предоставление доказательства того, что процесс производства будет эффективно инактивировать (удалять) вирусы, как известные контаминанты исходных материалов, так и те, что предположительно могут загрязнять их;

- предоставление непрямого доказательства того, что процесс производства будет эффективно инактивировать (удалять) принципиально новые вирусные контаминанты.

7.2 Цель исследований по вирусной валидации достигается преднамеренным добавлением вируса в материал на различных этапах производства и измерением его удаления (инактивации) при переходе от стадии к стадии.

7.3 При валидации процесса идентифицируются производственные стадии, которые являются эффективными в уменьшении степени инфицирования вирусом и определяется способность процесса в целом элиминировать контаминирующую вирусную инфекционность.

7.4 Исследования по вирусной валидации, такие как общее исследование материалов на соответствующих этапах, определяет степень достоверности вирусологической безопасности продукции.

Однако все исследования по вирусной валидации должны быть рассмотрены как приближенная модель реальной способности процесса до тех пор, пока трудно или невозможно провести полные испытания по валидации процесса из-за большого количества вариаций.

Результаты должны показывать, что даже незначительные модификации процедур или отдельный использованный штамм лабораторного вируса может оказывать большое влияние на удаление (инактивацию) вируса.

7.5 В тех случаях, когда исходный материал или источник материала недостаточно хорошо охарактеризован, (например, при использовании крови, тканей и органов человека и животных, или когда клетки были культивированы *in vivo*), существует высокая вероятность вирусной контаминации, и производственный процесс должен обычно включать одну или более стадий удаления (инактивации) вирусов.

7.6 Лекарственные средства, произведенные из человеческой плазмы, требуют повышенных требований вирусной безопасности и должны соответствовать требованиям ТКП 559 и [2].

7.7 Следует рассмотреть возможность, разработать и реализовать специфические стадии удаления (инактивации) вирусов в производственном процессе.

Пример – Некоторые производства моноклональных антител включают такие стадии, так как клеточные линии, производящие моноклональные антитела, имеют происхождение от мышей, постоянно секретируют разные количества ретровирусов, которые могут быть инфекционными.

7.8 Следует принять во внимание тот факт, что системам клеточных линий присуще поддерживать вирусную репликацию. По этой причине четкий низкий уровень риска вирусной контаминации в культуре сохраняется вопреки высокому уровню описания клеточного банка, и сообщается о происходящих случаях случайной вирусной контаминации.

7.9 Обоснование и степень требуемых испытаний по валидации будет в значительной степени зависеть от производственного процесса и типа продукции (например, происхождения исходного материала, является ли исходный материал переменным или определенным, стабильности активного материала и т.д.).

Пригодность испытаний должна быть рассмотрена для каждого конкретного случая.

8 Выбор вирусов для валидации

8.1 Вирусы для валидации следует выбирать, во-первых, как можно более похожие на вирусы, которые могут загрязнять продукт, и, во-вторых, чтобы они представляли широкий спектр физико-химических свойств с тем, чтобы испытать способность системы к элиминации вирусов в общем.

8.2 В большинстве валидационных исследований применяют лабораторные штаммы вирусов, которые удобно нарабатывать и анализировать. Однако, опыт показывает, и производители должны быть предупреждены, что различные лабораторные штаммы вирусов могут иметь свойства, отличные как друг от друга, так и от других, обычно встречающихся вирусов. Соответственно, каждый вирус, используемый в испытаниях по валидации, фактически модельный вирус.

8.3 Производителю следует обосновать выбор вирусов в соответствии с целями исследований по валидации и принципами, изложенными ниже в данном руководстве. Если не предоставлен обзор, где два подобных вируса могут быть использованы для исследований по валидации, то из-за их равной аналогии с возможным контаминантом или из-за подобия в их свойствах, необходимо использовать вирус, который считается более устойчивым.

Примеры

1 Концентраты человеческого свертывающего фактора, произведенного из плазмы, контаминированы HIV. Таким образом, процесс производства для таких материалов должен быть разработан с тем, чтобы быть способным к удалению (инактивации) инфекционного HIV.

2 Клеточные линии, полученные из грызунов, обычно содержат эндогенные ретровирусные частицы, которые могут быть инфекционными (частицы С-типа) или неинфекционными (частицы А-типа). Если источник материала получен из клеточных линий грызунов, производственный процесс должен быть оценен с точки зрения способности удаления (инактивации) одного из близкородственных лабораторных мышиных ретровирусов.

3 Примеры вирусов, представляющих ряд физико-химических свойств, которые используются для оценки способности процесса в общем удалять (инактивировать) вирусную инфективность, включают:

- SV40, полиовирус или животный парвовирус как маленькие вирусы без оболочки;
- вирус парагриппа или мышинный ретровирус как РНК-вирусы с оболочкой;
- вирус герпеса как крупный ДНК-вирус с оболочкой.

8.4 Примеры вирусов, использованных ранее на стадиях валидации, представлены в таблице В.1. Использование любого из них не обязательно, и производителями вносятся на рассмотрение другие вирусы, особенно те, которые могут быть более присущи данному производственному процессу.

8.5 Необходимо использовать эффективные, чувствительные и валидированные методики испытаний на вирусы. Желательны вирусы, которые могут культивироваться до высоких титров, хотя это не всегда возможно.

8.6 Лекарственные средства, произведенные из овечьей, козьей и коровьей тканей, создают проблему из-за возможной контаминации вирусными возбудителями трансмиссивной губчатой энцефалопатии, такой как скрепи, которые аккумулируются в центральной нервной системе и лимфоидной ткани. Такие агенты являются объектом рассмотрения отдельного Руководства [3].

9 Проведение исследований по валидации

9.1 Исследования по валидации включают преднамеренное внесение вирусов на различных стадиях производства и измерение степени их удаления (инактивации) во время последующих отдельных стадий.

9.2 Предметом валидационных исследований будут только те стадии производственного процесса, которые вносят вклад в удаление (инактивацию) вирусов.

9.3 Надлежащая производственная практика ограничивает включение любых вирусов в производственные условия. Поэтому валидация исследуется в отдельной лаборатории, оборудованной для работы с вирусами, в масштабированной версии производственного процесса и осуществляется персоналом вирусологического подразделения совместно с производственным персоналом.

9.4 Исследования должны проводиться в соответствии с требованиями ТКП 554.

9.5 Сравнение модельной и полностью масштабированной процедуры может быть исходным условием, для которого с целью обеспечения вирусной безопасности продукции могут быть использованы результаты, полученные из масштабированной системы. Поэтому должна быть продемонстрирована воспроизводимость масштабирования путем сравнения параметров, таких как pH, температура, концентрация белка и других компонентов, время реакции, колоночная высота слоя сорбента, линейная скорость потока, соотношение скорости потока к высоте слоя, свойства элюирования и показателей стадии (например, производительность, равновесие, специфическая активность, композиция). Отклонения, которые могут быть недопустимы, следует рассматривать в отношении к потенциальному влиянию на результат.

9.6 Производственный процесс должен включать необходимое количество этапов инактивации вирусов, которые позволяют редуцировать содержание вирусов до безопасного уровня, не вызывающего инфекционный процесс у реципиента полученного лекарственного средства. При этом должны быть использованы методы инактивации вирусов разных групп (содержащих и не содержащих оболочку) с эффективностью редукции около 10^4 на одном этапе и не менее 10^6 суммарно на двух этапах инактивации вирусов.

9.7 Где возможно, необходимо показать, достигается ли редукция вирусной инфекционности с инактивацией вируса или удалением вирусных частиц. Это может достигаться установлением кинетики равновесия и (или) исчезновения инфекционности. Процесс, который удаляет вирусную инфекционность путем инактивации, потенциально более просто моделируется, чем тот, который физически удаляет частицы.

9.8 Для стадии инактивации вирусов должна быть изучена кинетика инактивации и включена как в табличный, так и в графический отчеты. Там, где инактивация является слишком быстрой для составления кинетики в условиях процесса, будущие исследования следует планировать таким образом, чтобы доказать, что инфекционность действительно утрачивается в результате инактивации. Таким образом, следует ввести соответствующий контроль для обнаружения возможного искажения исследования из-за образца, в который оно вносится, и установить пределы обнаружения.

9.9 Необходимо исследовать параметры производства, которые влияют на результативность стадий процесса удаления (инактивации) вирусов и результаты использовать при определении соответствующих внутрипроизводственных критических параметров.

Критические параметры включают:

- механические параметры, такие как скорость потока, скорость перемешивания, размеры колонки, кратность использования колонки, и т. д.;
- физико-химические параметры, такие как содержание белка, pH, температура, содержание влаги и т.д.

9.10 Антитела, присутствующие в исходном материале, могут воздействовать на поведение вируса на стадиях разделения или инактивации. Это необходимо принять во внимание при проведении исследований по валидации.

9.11 Валидирование учета достигнутой редукции должно быть установлено из исследований эффектов изменений на критических производственных параметрах, использованных для определения внутрипроизводственных ограничений (лимитов).

9.12 Опубликованные работы, касающиеся способности сопряженных или стандартных процессов по удалению (инактивации) вирусов, могут предоставить указания, на каких стадиях они, вероятно, эффективны. Однако, вариабельность, свойственная исследованиям по валидации, возникающая из необходимости моделирования процесса, выбор вируса для использования и изучения полномасштабных производственных параметров на лабораторных масштабах, означает, что данные по валидации должны быть основаны на экспериментальных тестах.

9.13 Количество вирусов, добавленное к исходному материалу на стадии производства, которое исследуется, должно быть так велико, как возможно, с целью определения возможности стадий производства к удалению (инактивации) вирусов, соответственно.

Однако, вирус, который нужно добавить, вводят так, чтобы состав произведенного продукта изменялся не существенно (обычно, если объем введенного вируса менее чем 10%).

9.14 Если возможно, расчет факторов редукции должен быть основан на использовании вируса, который может быть определен при введении исходного материала, а не на количестве добавленного вируса.

9.15 Если возможно, количество вируса в образцах экспериментальных моделей доводят до определенного значения перед последующими манипуляциями, такими как ультра-центрифугирование, диализ и хранение.

Где последующее внесение не является недопустимым, например, удаление ингибиторов или токсичных субстанций, или хранение в данный период с гарантией, что образцы титрованы вместе, должен быть введен соответствующий контроль для определения, какой эффект имеют процедуры на результат исследований.

9.16 Влияние образцов на систему определения, включая токсические эффекты, должно быть оформлено документально, потому что они влияют на пределы обнаружения.

9.17 Количественные исследования эффективности должны проводиться в соответствии с требованиями ТКП 554, и должны включать распространение бактерий, определение других патогенных эффектов, образование синцитий и очагов, конечных точек титрования (например, PD_{50}), определение синтеза вирусных антигенов, или другие методы.

Метод должен иметь соответствующую чувствительность и воспроизводимость, выполняться с необходимым повторением и контролем для достижения требуемой статистической достоверности результата (см. приложение А).

9.18 Методы, применимые к нуклеиновым кислотам, например, ПЦР, обеспечивают достижимую высокую чувствительность в определении вирусных геномов, и также могут обнаруживать вирусы, такие как вирусы гепатита В и С, для которых культуральные системы непригодны.

Однако, важным ограничением этой технологии является то, что инактивированные вирусы могут еще считаться положительными в анализах определения генома и таким образом, могут занижать процент вирусной инактивации, полученным в результате потенциально эффективных стадий.

С другой стороны, ПЦР может быть ценной на стадиях процесса, которые зависят от удаления вируса. Использование такой технологии создает главные проблемы в отношении количественного определения, стандартизации, контроля качества и интерпретации результатов.

Валидация и стандартизация этих исследований должны быть однозначно продемонстрированы перед их применением, и необходимо проявлять предельную предосторожность, используя интерпретацию как положительных, так и отрицательных результатов.

9.19 Должна быть предоставлена гарантия, что каждый вирус, потенциально оставшийся в системе производства, будет соответственно разрушен до повторного использования системы, например, дезинфекцией колонок, и т.д.

10 Интерпретация результатов

10.1 Необходимо рассматривать комбинацию факторов при вынесении решения об эффективности стадий удаления (инактивации) вирусов. Оценка стадии, основанная единственно на количестве инактивированных (удаленных) вирусов, может привести к выводу, что процесс с определенным уровнем вирусной редукции будет производить безопасный продукт. Это не обязательно так. В каждом случае необходимо тщательно рассмотреть следующие факторы, влияющие на эффективность стадий:

- удобство используемых вирусных тестов (см. раздел 8);
- проведение исследований по валидации (раздел 9);
- достижимость редукции \log_{10} . Логарифмическое уменьшение порядка 4 \log или больше является показательным для очевидного эффекта, особенно вирусных тестов до исследования. Однако,

становлено, что определение \log числа редукции не используется как самостоятельное, абсолютное измерение эффективности стадии.

- кинетика инактивации. Будет показательным или нет, измерение \log редукции является консервативным определением. Инактивация вируса – обычно не простая реакция первого порядка и часто имеет быструю начальную фазу с последующей медленной фазой. Однако, резкое уменьшение скорости

инактивации со временем предполагает меньшую эффективность инактивирующего агента и вывод, что стадия высокоэффективна, не обоснован;

- природа инактивации (удаления) может быть селективна только для одного определенного класса вирусов. Производственная стадия может быть высокоэффективна для одних вирусов, но неэффективна для других, например, обработка «растворитель (детергент)» эффективна против липидосодержащих вирусов, но неэффективна для вирусов, не содержащих липиды;

- чувствительность вирусной инактивации (удаления) к небольшим вариациям в параметрах процесса будет сказываться на степени достоверности, имеющей место на данной стадии;

- пределы чувствительности анализов;

Комплексное рассмотрение вышеприведенных факторов приведет к выводу, является ли производственная стадия эффективной, относительно эффективной или неэффективной для инактивации (удаления) вирусов.

10.2 Следующие примеры даны для иллюстрации некоторых из этих принципов и не являются ни исчерпывающими, ни заключительными:

- когда на производственной стадии вводится концентрация вирусов в 6 логарифмических значений, но обнаруживается только 4 из них, стадия не может считаться эффективной, хотя она может вносить вклад в общую элиминацию;

- когда на производственной стадии вводится концентрация вирусов в 6 логарифмических значений, но из-за цитотоксичности промежуточного продукта предел чувствительности испытания обнаруживает только 4 из них, должны быть продемонстрированы только 2 логарифмических значений удаления, и стадия не может быть признана эффективной. Производственная стадия может в действительности быть способной удалять намного большие количества вирусов, что может быть показано различными экспериментальными разработками;

- когда на производственной стадии вводится концентрация вирусов в 6 логарифмических значений, но обнаруживается только 2 из них, основное количество вирусов удалено. Промежуточный продукт не является вирусологически стерильным. Однако если редукция является воспроизводимой и не подверженной влиянию вариабельности процесса, стадия будет иметь некоторую эффективность. Она пригодна для проведения общей редукции вирусов и может использоваться;

- когда на производственной стадии вводится концентрация вирусов в 6 логарифмических значений но в промежуточном продукте не обнаруживается ни один из них, с пределом чувствительности порядка 2 логарифмических значений продемонстрировано удаление примерно 4 логарифмических значений, то это существенно, и стадия в действительности может удалять намного большие количества вирусов, чем может быть определено или признано.

10.3 Когда вирусы инаktivированы, важна кинетика наименьшей инфекционности. Если производственная стадия включает пролонгированную инкубацию, например, нагревание в течении 10 часов, и инфекционность быстро достигает пределов обнаружения, процесс, вероятно, имеет больший эффект инаktivации вирусов, чем обычно может быть показано. С другой стороны, если инфекционность растет медленно, и предел обнаружения достигается только к концу периода обработки, стадия признается менее пригодной для вирусной безопасности.

10.4 В общем, процессы разделения не считаются эффективными стадиями вирусного удаления, хотя обнаружено, что они могут вносить вклад в удаление вирусов. Процессы разделения имеют обычно ряд различий, трудно контролируемы, и представляет трудность оценить их последствия для целей валидации.

Более того, разделение зависит от крайне специфических физико-химических свойств вируса, которые влияют на поведение в матрице геля и свойства выделения. Модельный вирус может быть отделен совершенно иным способом, чем целевой вирус, благодаря относительно малой разнице в поверхностных свойствах, таких как гликозилирование.

Даже пригодный вирус, выращенный в лаборатории, может вести себя отлично от вируса дикого типа в этом отношении.

Однако если процесс разделения дает воспроизводимую редукцию вируса, если производственный процесс, включающий разделение, может быть детально описан и проконтролирован, и если требуемая фракция может быть гарантированно отделена от предполагаемой вирусосодержащей фракции, тогда это может удовлетворять критериям эффективной стадии.

10.5 Предметом валидации является идентификация стадий, эффективных в инаktivации (удалении) вирусов, и определение общей способности производственного процесса к их инаktivации (удалению).

10.6 Полный фактор редукции в основном определяется как сумма индивидуальных факторов (см Приложение Б). Однако, простое суммирование минимума факторов минимальной редукции может быть неправильным. Редукция титра вируса порядка 1 log и ниже считается ненадежной из-за ограничений испытаний по вирусной валидации и ее не следует учитывать.

10.7 Производство должно отделять эффективные стадии от производственных стадий, которые могут делать вклад в удаление вирусов, но на которые можно сделать меньший упор.

10.8 Следует также рассмотреть, будут ли вирусы, сохранившиеся на одной стадии, устойчивы на последующих, или, напротив, имеют пониженную чувствительность.

10.9 В основном, одна стадия, имеющая большую эффективность, дает лучшие гарантии вирусной безопасности, чем несколько стадий, имеющих тот же общий эффект.

10.10 Если в производственном процессе достигается небольшая редукция инфекционности, и удаление вирусов рассматривается как главный фактор безопасности лекарственного средства, то должны быть включены дополнительные специфические стадии инактивации (удаления).

10.11 Для всех вирусов производители должны быть готовы обосновать приемлемость полученных факторов редукции. Результаты рассматриваются для каждого индивидуального случая.

10.12 Должны тщательно соблюдаться принципы ТКП 030 в том, что материалы, которые подвергались эффективной инактивации (удалению) вирусов, должны быть отделены от необработанного материала.

11 Ограничение исследований по валидации

11.1 Исследования по валидации дают гарантию, что достигнут приемлемый уровень безопасности конечной продукции.

11.2 Множество факторов при разработке и исполнении экспериментов по вирусной валидации могут привести к неправильному определению способности процесса удалять естественным путем получаемую вирусную инфекционность. Эти факторы включают следующие:

- различные лабораторные штаммы вирусов могут отличаться по чувствительности к той же самой обработке. Поэтому отдельный выбранный вирус может не походить на вирус, который был выбран как модель. Природные вирусы могут иметь непредвиденные свойства, например, ассоциацию с липидом, что может отражаться на его свойствах;

- вирусные препараты, используемые для валидации производственного процесса, могут быть произведены в клеточной культуре. Поведение вирусов клеточной культуры на стадиях производства может отличаться от такового для природного вируса, например, если природный и выращенный в культуре вирусы различаются по чистоте или степени агрегации. Штаммы вируса, его культивирование и испытания, также детали выборки образцов и хранения необходимо документировать;

- существуют несколько ситуаций, в которых может быть не оправдано применение логарифмической редукции;

Пример – Если матрица способна адсорбировать 10^4 инфекционных частиц вируса и затем не способна адсорбировать следующий материал подобной тропности, тогда она будет удалять все вирусы при достижении количества до 10^4 инфекционных частиц, но только 1%, если ввести их 10^6 . Измеренный плинренс может соответственно изменяться с введенным титром.

- инактивация вирусной инфекционности проходит по двухфазной кривой, на которой быстрая начальная фаза сменяется медленной фазой. Возможно, что вирус, избежавший первой стадии инактивации, может быть более устойчив к последующим стадиям. Как следствие, общий фактор редукции не обязательно является суммой факторов редукции, рассчитанных из каждой индивидуальной стадии, в которой используется добавочная суспензия вируса;

Пример – Если устойчивая фракция содержит форму агрегированного вируса, инфекционность может быть устойчива к ряду различных химических обработок и нагреванию.

- модельный масштабированный процесс, вероятно, отличается от полномасштабного процесса, несмотря на меры, принятые при разработке масштабирования процесса;

- присутствие антител к природным вирусам может сказаться на разделении вирусов или их чувствительности к химической инактивации; это также может осложнять разработку стадий нейтрализации инфекционности. Соответственно, может быть сложным обосновать разработку стадии. Можно рассматривать различный уровень присутствующих антител для значимых процессов;

- небольшие различия производственных параметров, например, содержание белка или температура, могут вызывать большие различия в редукции вирусной инфекционности независимо от механизма.

12 Повторные валидационные исследования

12.1 При внесении изменений в производственный процесс могут понадобиться новые исследования по валидации.

12.2 С целью накопления научного опыта, процесс валидации будет требовать перепроверки для обеспечения соответствия новым необходимым нормативным документам.

Приложение А

(справочное)

Статистическая обработка результатов

Проблемы с титрованием вирусов испытывают в общем и целом все анализы биологических систем. Поэтому является необходимой оценка достоверности титрования вируса и фактора редукции, полученного из него, и обоснованность исследований, для определения надежности испытаний.

Необходимы разработка технических требований и проведение статистического анализа для установления, что исследования проводятся на соответствующем уровне вирусологической надежности.

Методы контроля могут быть как качественными (метод определения наличия или отсутствия вирусов), так и количественными.

Качественные методы включают исследования инфекционности на животных, или анализы инфекционной дозы на культуре клеток (концентрация ПД), в которых животное или клеточная культура устанавливается инфицированной или нет. Титры инфекционности измеряются пропорцией инфицированных животных или культуры.

В количественных методах измеряемая инфекционность постоянно изменяется в зависимости от используемого вируса. Количественные методы включают анализ пятен, где каждое пятно считается соответствующим одной инфекционной частице.

Качественные и количественные методы подлежат статистической обработке.

Изменения могут происходить в пределах исследования как результат ошибок разведения, статистических эффектов и различий, внутри системы исследований, которые или неизвестны, или трудно контролируемы.

Эти эффекты, являются, вероятно, более значительными, когда сопоставляются исследования различных серий (отклонения между исследованиями), чем когда сопоставляются результаты одной серии опытов (отклонения внутри исследования).

95% доверительный интервал для отклонения внутри исследования и для отклонения между исследованиями должен быть порядка $\pm 0,5 \log_{10}$ или точнее. Отклонения между исследованиями могут контролироваться почасовым сравнением состава продукта, определением его активности, которая должна быть приблизительно $0,5 \log_{10}$ к основному определению, установленному в лаборатории, чтобы эксперимент был в диапазоне приемлемых значений. Отклонения внутри исследования могут быть оценены стандартными научными методами. В каждом отдельном эксперименте, если мера точности титрования меньше, чем эти контрольные цифры, испытания, тем не менее, должны быть соответственно обоснованы.

Редукцию дозы вируса следует рассчитывать из экспериментально определенных титров вируса.

Где возможно, необходимо получить 95 % доверительный интервал факторов редукции. Это может быть выражено как

$$\pm \sqrt{(s^2 + a^2)}, \quad [A.1]$$

где $\pm s$ -- 95% доверительный интервал для исходного материала,

$\pm a$ -- фактор редукции для вирусных исследований материала после очередной стадии.

Если после стадии удаления (инактивации) вируса ни один образец не показывает инфекционности, фактор редукции может не быть получен статистическими методами.

Чтобы получить доказательство минимума фактора редукции, титр должен быть выражен значением меньшим или равным одной инфекционной частице в объеме высокой концентрации.

Особенно после потенциального процесса инактивации можно ожидать, что ни один образец не покажет признаков инфекционности.

Чтобы сделать доказанный минимум фактора эффективного инактивационного процесса максимально большим, как возможно, необходимо использовать для анализа максимально неразбавленные обра

Приложение Б

(обязательное)

Расчет фактора редукции

Для индивидуальной стадии удаления (инактивации) вируса фактор редукции R представлен следующим выражением:

$$R = \log \frac{V_1 \times T_1}{V_2 \times T_2}, \quad (\text{Б.1})$$

где R – фактор редукции,

V_1 – объем исходного материала,

T_1 – концентрация вируса в исходном материале,

V_2 – объем материала в конце стадии,

T_2 – концентрация вируса в конце стадии.

Формула (Б.1) принимает в расчет как титр, так и объем материала до и после проведения стадии.

Редукционный фактор обычно выражается в логарифмическом виде, который значит, что, по мере того, как остаточная вирусная инфективность может сильно снижаться, он никогда не может быть сведен к нулю. Европейская Фармакологическая Конвенция в отношении методов стерилизации установила, что процессы, которые представили приемлемый уровень стерильности (ПУС) порядка 10^{-6} или ниже для бактерий, плесневых грибов и дрожжей, считаются подходящими. ПУС порядка 10^{-6} показывает вероятность нахождения не более одного жизнеспособного микроорганизма в 10^6 объема стерилизованного конечного продукта.

Приложение В

(рекомендуемое)

Таблица В.1 – Примеры вирусов, которые используются в исследованиях по вирусной валидации

Вирус	Вирус визикулярного стоматита	Вирус парагриппа	Вирус человеческого иммунодефицита	Вирус лейкемии мышей (MuLV)	Вирус Синдбис	Вирус диареи крупного рогатого скота
Семейство	рабдо	парамиксо	ретро	ретро	тога	тога
Род	везикуло-вирус	парамиксо-вирус	лентивирус	онковирус тип С	альфавирус	пестивирус
Естественный хозяин	крупный рогатый скот	различный	человек	мыши	человек ?	крупный рогатый скот
Геном	РНК	РНК	РНК	РНК	РНК	РНК
Ген env	да	да	да	да	да	да
Размер, нм	70-175	100-200	80-100	80-110	60-70	50-70
Форма	пулевидная	плеоморфная/сферическая	сферическая	сферическая	сферическая	плеоморфная сферическая
Устойчивость к физико-химической обработке	низкая	низкая	низкая	низкая	низкая	низкая

Библиография

- [1]. Государственная фармакопея Республики Беларусь, 2 издание, том 1
Общие методы контроля качества лекарственных средств. Молодечно, 2012
- [2] Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К., – 2012. – 944 с.
- [3] EMA/410/01 rev.3
2011/C 73/01
Official Journal of European Union,
05.03.2011
(Официальный журнал Европейского Союза,
05.03.2011)
- Note for Guideline on Minimizing the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medicinal Products
(Примечание к руководству по минимизации риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии через лекарственные средства и ветеринарные препараты)
Неофициальный перевод УП «ЛОТИОС»
Перевод с английского языка (en)

ТКП 557-2014 (02041)

Директор Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС», д.м.н., профессор
Научный руководитель разработки, заведующий
отделом промышленной биотехнологии
Государственного предприятия «НПЦ ЛОТИОС», к.б.н.
Научный руководитель разработки, зам. директора по
научной работе Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС», к.б.н.
Заместитель заведующего отделом промышленной
биотехнологии Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС»
Старший научный сотрудник отдела промышленной
биотехнологии Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС»
Старший научный сотрудник отдела промышленной
биотехнологии Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС»
Научный сотрудник отдела промышленной
биотехнологии Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС»
Научный сотрудник отдела промышленной
биотехнологии Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС»
Младший научный сотрудник аналитической
лаборатории Государственного предприятия
«НПЦ ЛОТИОС»

Гапанович В.Н.

Белявский К.М.

Андреев С.В.

Карпович Н.В.

Семашко И.В.

Квятковская Н.В.

Костюк И.Н.

Худобченко Л.Г.

Бакуменко А.А.