

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

АНАЛИЗА ПРОИВОДА (ИСПИТИВАЊЕ ПОТЕНТНОСТИ И БЕЗБЕДНОСТИ)

6. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

Анализа производа

- Фармацеутски производи подлежу ригорозним контролама квалитета како би се утврдило да ли њихове особине одговарају претходно дефинисаним спецификацијама. Међутим, аналитички тестови за биофармацеутике су обимнији и комплекснији у односу на тестове који се користе за конвенционалне лекове добијене органским синтезама, јер су структурно сложенији и волуминознији молекули који се производе у биолошким системима, па је и ризик од потенцијалне контаминације већи. Тестови за биофармацеутике подразумевају:
 1. анализу активне супстанце (идентификација и концентрација)
 2. тестирање потентности (ефикасност лека) и
 3. испитивање безбедности (присуство различитих потенцијално контаминирајућих супстанци - нечистоћа).

Тестови за одређивање потентности производа

- Биофармацеутици морају задовољити спецификацију која се односи на потентност финалног производа која се изражава кроз јединицу активности по бочици производа/терапијској дози/милиграму производа. Бројни приступи се користе за одређивање потентности производа и сваки од њих има одређене предности и недостатке.

Биоесеји

- Биоесеји представљају најрелевантније тестове за процену потентности, јер директно процењују биолошку активност биофармацеутика. Биоесеји подразумевају примену тачно одређене количине супстанце на биолошки систем за који се зна да ће на неки начин одговорити на примењену супстанцу. Одговор биолошког система се мери квантитативно, омогућавајући квантификацију активности тестиране супстанце. Узимајући у обзир да су компаративне природе, захтевају паралелне тестове за стандарде, са којима се узорак пореди. Интернационално прихваћени стандарди за већину биофармацеутика су доступни у одговарајућим фармакопејама и документима СЗО.

Биоесеји за факторе раста

- Код ове методе инкубира се испитивани фактор раста са културама ћелија осетљивим на тај фактор раста и радиоактивно обележеним нуклеотидним прекурсорима. Током култивације, услед дејства испитиваног фактора раста ћелије користе радиоактивно обележене нуклеотидне прекурсоре и уграђују их у своју ДНК. Након одговарајућег временског периода мери се ниво радиоактивности, која потиче од радиоактивно обележене ДНК инкорпориране у ћелије, а добијена вредност представља меру биолошке активности испитиваног фактора раста.

Биоесеј за еритропоетин

- Код ове методе узорак који садржи ЕРО се апликује мишу заједно са радиоактивним изотопом гвожђа 57 (^{57}Fe).
- Након одговарајућег временског периода прати се ниво уградње ^{57}Fe у пролиферишуће еритроците мерењем радиоактивности.
- Што је више стимулисана пролиферација еритроцита деловањем еритропоетина, већа количина гвожђа ће бити искоришћена за синтезу хемоглобина.

Биоесеји за интерфероне

- Биоесеји за интерфероне подразумевају употребу вируса за мерење активности интерферона. Постоји неколико тестова који се користе у ту сврху, а најчешће се користи тест инхибиције цитопатског ефекта који се заснива на способности интерферона да учине анималне ћелије резистентним на вирусе.
- Наиме, препарат интерферона се инкубира са ћелијама сензитивним на одређени вирус, а након тога се смеши додаје жељени вирус. Проценат преживелих ћелија је пропорционалан концентрацији интерферона присутних у есеју. Живе ћелије имају способност да везују неке боје (нпр. неутрално црвена) па се једноставно идентификују спектрофотометријски. Овим тестом се може испитивати велики број узорака истовремено, јер се спроводи у микротитар плочама.

Недостаци биоесеја

- Иако биоесеји директно квантификују потентност (активност) производа, они имају и бројне недостатке:
 - недовољно прецизни – биолошки системи су веома комплексни, па на резултате утичу различити фактори, попут метаболичког статуса ћелије, субклиничке инфекције (ако је у питању животиња), ниво стреса изазван руковањем и друго;
 - дуго време извођења – за извођење већине биоесеја потребни су дани, а у неким случајевима и недеље, што рутинску употребу биоесеја чини компликованом и непрактичном за одређивање потентности код брзе контроле квалитета током *downstream* процеса;
 - економска исплативост – већина система који се користе за биоесеје, нарочито животиње, су скупи.

Имуноесеји

- Због поменутих недостатака биоесеја истраживани су алтернативни тестови и неки од њих се користе уместо, а неки заједно са биоесејима. Најчешће примењивани алтернативни тестови су имуноесеји који користе моноклонска или поликлонска антитела за детекцију и квантификацију производа. Специфичност антиген-антитело интеракције је искоришћена за детекцију и квантификацију великог броја антигена, укључујући терапијске протеине. Ова специфичност обезбеђује прецизност есеја, а у поређењу са биоесејима, спроводе се брже (током неколико минута/сати), финансијски су исплативији и једноставнији за извођење. Главни недостатак имуноесеја је што није загарантовано да је имунолошка активност у директној корелацији са биолошком.

Имуноесеји

- Релативно мале модификације протеинског производа утичу на биолошку активност, док је њихов утицај на способност везивања за антитело у имуноесеји незнатан. Дакле, иако имуноесеји представљају погодан тест за праћење производа током *downstream* процеса, за финални производ је неопходно спровођење биоесеја, како би се проверило да ли је потентност финалног производа усаглашена са спецификацијом.
- Код ових тестова супстанца од интереса се користи као антиген и инјектује у животињу како би изазвала стварање антитела. Сходно томе да антитела немају сопствене карактеристике које би омогућиле директну детекцију у имуноесејима, неопходна је уградња маркера који олакшавају брзу детекцију и квантификацију антиген-антитело везивања. Прво су се користили радиоимуноесеји (RIA) који су користили радиоактивне маркере, а потом су развијени ензимски имуноесеји (EIA), који као маркере користе ензиме.

Имуноесеји

- Данас постоје и есеји који користе алтернативне маркере, као што су флуоресцентни или хемилуминисцентни маркери.
- Предности ензимских имуноесеја:
 - висока специфичност и афинитет за антиген-антитело везивање;
 - каталитичка активност ензима олакшава читавање сигнала и њихову једноставну детекцију и квантификацију;
 - антитела су везана за унутрашњи зид бунарчића микротитар плоча, које мењају мале епрувете.
- Након открића, пре око 60 година, дизајниране су многе варијације основног концепта ензимских имуноесеја. Тренутно најчешће коришћени EIA систем је ELISA (од енгл. *The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

ELISA

- ELISA је данас широко распрострањена метода која се користи и у дијагностици и у науци. Представља биохемијску методу која се користи за одређивање присуства и квантификацију одређеног маркера/терапијског протеина у узорку. Предности ове методе су висока селективност и осетљивост, као и могућност детекције врло ниских концентрација молекула у узорку. У основи ове методе постоје два типа реакције, имунолошка - антиген-антитело реакција која није видљива и ензимска – ензим-супстрат реакција која је видљива. Захваљујући промени боје током ензим-супстрат реакције омогућено је спектрофотометријско мерење апсорбанце и индиректно одређивање концентрације молекула у узорку. Постоје три основна типа ELISA технике: директни, индиректни и *sandwich*. Ова техника се спроводи коришћењем микротитар плоча (96 бунарчића).

Директна ELISA метода

- У директној ELISA методи, антиген или узорак се имобилише пасивном адсорпцијом директно у бунарчиће микротитар плоче, а потом се додаје коњуговано детекционо антитело које се везује за циљни протеин у плочи. Након инкубације, следи испирање како би се уклонили невезани антигени и антитела из медијума. Потом се додаје хромогени супстрат (најчешће TMB - триметилбензидин), стварајући сигнал који је пропорционалан количини испитиваног протеина у узорку.

Индиректна ELISA метода

- Индиректни тип ELISA методе се тако назива јер оно што одређује и издваја антиген (терапијски протеин) није примарно антитело, већ секундарно антитело. У овој методи, се тако узорак (антиген) пасивном адсорпцијом имобилише у бунарчиће, а потом се додаје примарно антитело и плоча се инкубира. Током ове инкубације, формира се комплекс антиген-антитело. Да би овај комплекс антиген-антитело био видљив додаје се секундарно антитело које је означено ензимом и које препознаје примарно антитело у узорку. Потом се додаје супстрат ензима, при чему долази до промене боје, на основу које се спектрофотометријски одређује концентрација испитиваног терапијског протеина у узорку.

Сендвич ELISA метода

- Код сендвич типа ELISA методе (протеин од интереса се налази између два антитела, па отуда назив сендвич) бунарчићи су обложени *capture* антителом, а потом се додаје узорак који ће се везати за антитело током инкубације. Након тога бунарчићи се испирају како би се уклонили невезани антигени. Након тога додаје се антитело обележено ензимом специфичним за антиген и опет се спроводи инкубација, па потом испирање. Уколико има антигена у медијуму, они се не могу уклонити јер су ензимски обележена антитела везана за њих. Да би се визуализовала активност ензима, додаје се ензимски супстрат, а реакција се уочава променом боје. Да би се зауставила активност ензима додаје се раствор за заустављање реакције (најчешће HCl). Спектрофотометријски се мери интензитет боје, а на основу стандарда конструише и калибрациона крива и одређује тачна концентрације протеина од интереса у узорку.

Испитивање безбедности

- Испитивањем производа на присуство потенцијалних нечистоћа обезбеђује се сигурност производа. У потенцијалне нечистоће убрајају се:
 - бактерије – могу довести до бактеријских инфекција и сепсе;
 - вируси – могу довести до тешких вирусних инфекција;
 - пирогене супстанце – доводе до грознице, некад и смрти;
 - ДНК – доводе до имунског одговора;
 - протеини – изазивају имунске реакције, непожељну биолошку активност.

Нечистоће протеинске природе

Детекција протеинских нечистоћа

- Већина хроматографских метода спроведених током *downstream* процеса има за циљ да одвоји протеин од интереса од осталих протеина.
- Од великог је значаја да се протеинске нечистоће идентификују јер иако поједини контаминанти не поседују биолошку активност, други могу бити биолошки активни и имуногени (нпр. протеазе могу изменити/ деградирати производ и смањити биолошку активност, док токсини могу штетно деловати на пацијента).

Детекција протеинских нечистоћа

Протеинске нечистоће воде порекло из:

- биолошких извора (протеини ћелије домаћина),
- протеина који су додати током *upstream/downstream* процеса, нпр:
 - регулаторни протеини који се додају за стимулисање и контролу раста ћелија;
 - ендонуклеазе које разграђују ослобођену ДНК након разарања ћелија, код пречишћавања интрацелуларних протеина;
 - протеини који у малим количинама могу да доспеју у производ, попут протеина који потичу од особља (имплементација GMP стандарда своди на минимум овакав вид контаминације).

Детекција протеинских нечистоћа

- протеина који настају током процеса производње као модификоване форме протеина од интереса. Оне могу бити:
 - безопасне - немају никакав утицај на производ;
 - инактивне - смањују потентност производа;
 - активне - имају измењене фармакокинетске карактеристике (време трајања дејства лека);
 - имуногене - доводе до имунских реакција код пацијената, али за ћелију у којој се производе нису имуногене.

Методе за детекцију протеинских нечистоћа

- За детекцију протеинских нечистоћа и проверу чистоће финалног производа користе се следеће аналитичке технике:
 - SDS полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE),
 - изоелектрично фокусирање,
 - капиларна електрофореза,
 - течна хроматографија високих перформанси (HPLC):
 - HPLC реверзне фазе (RP-HPLC)
 - ексклузиона HPLC хроматографија (SE-HPLC)
 - јоноизмењивачка (катјонска и анјонска) HPLC хроматографија
 - масена спектрометрија,
 - имуноесеји - имунолошки приступи за детекцију нечистоћа.

SDS полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE)

- SDS-PAGE представља најчешће коришћену аналитичку технику за анализирање смеше протеина и добијање информација о чистоћи финалног производа. Једноставно се спроводи и омогућава сепарацију великог броја полипептида на основу разлика у њиховим молекулским масама. SDS-PAGE техником је могуће детектовати и веома мале количине протеина (100 ng).
- Принцип технике се заснива на томе да се испитивани узорци (протеини) инкубирају са анјонским детерџентом SDS (Na-додецил сулфат) у редукционим условима у циљу формирања негативно наелектрисаних комплекса. Количина SDS везаног за протеин, а самим тим и наелектрисање насталог комплекса, је пропорционална маси протеина (око 1,4 g SDS везује се за 1 g протеина).

SDS полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE)

- У присуству SDS и редукционог агенса (β -меркаптоетанол или дитиотреитол (DTT)) раскидају се интра- и интерланчане дисулфидне везе значајне за правилно савијање протеина. Раскидањем дисулфидних веза протеини се денатуришу до примарне структуре, тј. преводе у линеарне ланце са негативним наелектрисањем пропорционалним дужини полипептидног ланца.
- За извођење ове методе неопходно је коришћење гел матрикса који служи као сито. Као гел матрикс користи се полиакриламид (полимер акриламидних мономера), величина пора зависи од концентрације акриламида. Што је већа концентрација акриламида, то је мања величина пора у гел матриксу. Након што се узорци протеина ставе у бунарчиће направљене у гелу (опционо се са узорком у бунарчић може ставити и боја), кроз гел се пропушта струја, стварајући електрично поље.

SDS полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE)

- Брзина миграције протеина од катоде ка аноди зависи од величине протеина. Након завршене електрофорезе (уколико боја није додата заједно са узорком), гел се боји комази плавом бојом (*Coomassie blue*) или сребром, ради визуелизације одвојених протеина.
- Након бојења, протеини ће се појавити као различите траке унутар гела. Даље се за карактеризацију користи *Western blot* анализа, за коју је неопходно елуирање протеинских трака из гела и преношење на нитроцелулозни филтер.
- Филтер са протеинима се испитује употребом антитела специфичних за производ. Везивање антитела за „нечистоће“ указује да се ради о модификованим формама протеина.

SDS полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE)

- Ако се један бунарчић напуни стандардом (мешавином протеина познатих молекулских маса) може се конструисати стандардна крива на основу дужине кретања и молекулске масе. Ова стандардна крива се користи за процену молекулске масе пречишћеног протеина.
- Нечистоће представљају све траке, осим оне која се односи на производ. Те нечистоће могу бити невезане за производ или пак могу представљати модификоване форме протеина од интереса (нпр. фаргменти настали протеолизом, другачије гликозилиране варијанте протеина). Даља анализа ласерском денситометријом омогућава квантификацију протеина у свакој траци (тима је омогућена квантификација протеинских нечистоћа у производу).

SDS полиакриламид гел електрофореза (SDS-PAGE)

- Употребом сребра повећава се сензитивност ове детекције 100 пута и омогућава се бојење трака које садрже 1 ng протеина. Међутим, пошто се сребро везује нестехиометријски, употреба дензитометрије није могућа у квантитативне сврхе.
- Један од проблема код употребе SDS-PAGE за анализу је што нечистоће које имају исту молекулску масу као производ остају неоткривене, јер се крећу заједно са производом. У највећем броју случајева овај проблем се превазилази употребом дводимензионалне електрофорезе, која омогућава раздвајање протеина на основу разлика у молекулским карактеристикама у две димензије.
- Најчешће коришћени метод подразумева одвајање протеина на основу изоелектричног фокусирања у првој димензији и на основу величине у другој димензији, што је фаворизовано присуством SDS.

Изоелектрично фокусирање

- Изоелектрично фокусирање подразумева постављање рН градијента дуж електрофоретског (полиакриламидног или агарозног) гела. рН градијент се постиже кополимеризацијом матрикса полиакриламидног гела са одговарајућим пуферима и хемикалијама које имају рКа вредности распоређене у опсегу рН вредности од 3-10.
- Протеини из узорка ће се кретати дуж гела под утицајем електричног поља (од аноде ка катоди) док не стигну до тачке рН вредности у гелу која је идентична рI тог протеина. На тој тачки протеин је неутрално наелектрисан и престаје да мигрира, тј. сматра се „фокусираним“.
- Изоелектричним фокусирањем се одвајају протеини на основу разлика у наелектрисуњу, па се у индустрији ова техника користи за проверу хомогености производа.

Изоелектрично фокусирање

- Хомогеност је адекватна уколико се у гелу појави само једна трака на предвиђеној pI протеина. Када је присутан већи број трака интерпретација резултата је тежа, нарочито уколико је протеин гликозилиран, јер гликопротеини који се мало разликују у погледу угљенохидратног дела варирају у садржају сијалинске киселине, што утиче на pI вредности.
- Изоелектрично фокусирање се примењује и у анализи стабилности биофармацеутика током времена. Овом анализом могу се детектовати промене у структури које утичу на наелектрисање протеина и настају након завршеног процеса производње, као што су деамидација или други деградациони процеси.

Капиларна електрофореза

- Капиларна електрофореза има све значајнију аналитичку улогу у контроли квалитета производа. Као и код других форми електрофорезе, раздвајање протеина се одвија на основу различите брзине кретања протеина кроз капиларну цев (пречник 20 - 50 μm , дужина до 1 m) током примене електричног поља.
- Димензије система за капиларну електрофорезу су веће у односу на системе за гел електрофорезу што значајно повећава ефикасност одвођења топлоте из система. Ово заузврат омогућава рад при већој густини, што убрзава кретање кроз капиларе.

Капиларна електрофореза

- Анализа узорка капиларном електрофорезом спроводи се за 15 - 30 минута, а на крају колоне елуиране траке се аутоматски детектују (UV детектор) и квантификују. Брзина, сензитивност, висок степен аутоматизације, минимална потрошња узорка и могућност квантификације протеинских трака чине овај систем идеалним за анализу биофармацеутика.
- Најчешће се у индустрији користе три режима капиларне електрофорезе:
 - капиларна SDS гел електрофореза (SDS-GCE),
 - електрофореза капиларне зоне (CZE) и
 - капиларно изолелектрично фокусирање (cIEF).
- Ове методе се рутински користе за процену величине, наелектрисања и хетерогености гликозилације моноклонских антитела, али и других терапијских протеина.

Течна хроматографија високих перформанси (HPLC)

- HPLC је веома важна аналитичка метода за процену чистоће фармацеутских препарата мале молекулске масе, као и за макромолекуле као што су протеини. Већина хроматографских метода које се користе за раздвајање протеина функционишу на ниском притиску (нпр. гел-филтрација, јоноизмењивачка хроматографија) али се могу подесити и да функционишу на високом притиску.
- У анализи биофармацеутика се користе следећи HPLC хроматографски системи:
 - реверзна фаза (RP);
 - ексклузиона хроматографија (SE);
 - јоноизмењивачка хроматографија (у мањој мери).

Течна хроматографија високих перформанси (HPLC)

- Као *on-line* детектори најчешће се користе UV монитори на таласној дужини 220 - 280 nm, који аутоматски детектују и квантификују елуиране траке.
- HPLC има бројне предности:
 - одлична брзина одвајања (неколико минута по узорку);
 - одлична резолуција пикова;
 - висок ниво аутоматизације (укључујући и анализу података);
 - комерцијална доступност бројних софистицираних система.

HPLC реверзне фазе (RP-HPLC)

- RP-HPLC раздваја протеине на основу разлике у хидрофобности њихових површина.
- RP-HPLC и хроматографија заснована на хидрофобним интеракцијама су две хроматографске технике које зависе од хидрофобних интеракција између стационарне фазе импрегниране хидрофобним групама и хидрофобних група биомолекула.
- Главна разлика између RP-HPLC и хроматографије засноване на хидрофобним интеракцијама је у степену хидрофобности који се користи у свакој техници, тј. код RP-HPLC се користи стационарна фаза са хидрофобнијим групама, што доводи до остваривања јачих интеракција.

HPLC реверзне фазе (RP-HPLC)

- Код RP-HPLC стационарна фаза је сачињена од хидрофобних полимера или од куглица силицијум диоксида прекривених дугим алкил ланцима (нпр. октадецил (C18)), док код хроматографије засноване на хидрофобним интеракцијама стационарну фазу чини фенил или октил сефароза.
- RP-HPLC је аналитичка техника која ефикасно раздваја веома сличне молекуле који се мало разликују у хидрофобности.
- Овом методом може се детектовати:
 - измена само једне аминокиселине;
 - уклањање једне аминокиселине са краја полипептидног ланца;
 - деамидација аминокиселина.

HPLC реверзне фазе (RP-HPLC)

- Овакви системи се користе у детекцији нечистоћа, које могу, али и не морају бити повезане са протеином од интереса.
- Иако се RP-HPLC показала значајном у аналитичке сврхе, рутинска примена ове методе за анализу специфичних протеина може уследити тек након опсежне валидације, јер је веома агресивна метода. Наиме, интеракције протеина са јако хидрофобном стационарном фазом могу иреверзибилно денатулисати протеине (нарочито велике, комплексне протеине), што се детектује појавом артефицијалних пикова на хроматограму.
- RP-HPLC се користи за анализу инсулинских препарата, јер се измењени облици инсулина, као и инсулински полимери, лако раздвајају од нативног инсулина.

Ексклузиона HPLC хроматографија (SE-HPLC)

- SE-HPLC одваја протеине на основу величине и облика. С обзиром да су биофармацеутици већински глобуларни протеини (сферног облика), сепарација се одвија на основу разлика у молекулској маси.
- Најчешће коришћене стационарне фазе код SE-HPLC су носачи на бази силицијим-диоксида и попречно везана агароза дефинисане величине пора. Ови системи се најчешће користе за анализу производа на присуство димера или агрегата веће молекулске масе, као и протеолизираних облика.
- Поређењем са стандардима прецизно се на основу разлика у молекулским масама идентифује производ и нечистоће. Упоредивањем хроматограма производа из различитих серија, могу се уочити варијације између серија. Ова метода се често користи за анализу моноклонских антитела, јер пружа информације о агрегатима и фрагментима моноклонских антитела који су присутни у производу.

HPLC - Јоноизмењивачка хроматографија

- Јоноизмењивачка хроматографија (катјонског и анјонског типа) се може спровести и у HPLC формату, али се не користи тако често као реверзна и ексклузиона хроматографија.
- Овај тип хроматографије у HPLC формату се најчешће користи:
 - за анализу нечистоћа које нису директно повезане са производом;
 - за детекцију и квантификацију деамидованих форми протеина.

Масена спектрометрија

- Масена спектрометрија се у последње време доста користи као аналитичка техника због велике способности за квалитативно и квантитативно профилисање сложених биолошких узорака (протеина) уз високу осетљивост, селективност и специфичност.
- Принцип масене спектрометрије је да се анализирани молекули преведе у јонски облик (молекулски јон) који се даље преводи у серију фрагментисаних јона које се разврставају на основу вредности односа масе и наелектрисања (m/z). Молекулски јон је најчешће позитивно наелектрисан (јер му је избијен један електрон) и увек се распада на фрагменте на исти начин, тако да сваки молекул има свој „отисак прста“ у виду масеног спектра.

Масена спектрометрија

- Употребом електроспреј масене спектрометрије могуће је одредити молекулску масу многих протеина са тачношћу од $\pm 0,01\%$.
- Масена спектрометрија се рутински користи за процену гликозилације и других посттранслационих модификација протеина, као и детекцију дисулфидних веза, што је чини методом избора за детекцију и одвајање модификованих форми протеина.
- Коришћењем ове методе могу се детектовати и издвојити чак и протеини којима недостаје једна аминокиселинска секвенца. Иако је ово ефикасна техника, анализа добијених резултата понекад може бити сложена, нпр. гликопротеини дају комплексне спектре (због њихове природне хетерогености) због чега је тешко интерпретирати добијене резултате.

Имуноесеји - имунолошки приступ

- Већина рекомбинантних биофармацеутика се производи у ћелијским линијама микроорганизама или сисара, тако да готово све нечистоће које нису директно повезане са производом потичу из организма у коме се протеин производи. Протеини ћелија домаћина су високо имуногени за људе и зато је битно уклонити их из финалног производа.
- Имуноесеји се могу користити за детекцију и квантификацију нечистоћа које нису сродне финалном производу (имуноесеји се не могу користити за одређивање нивоа протеинских нечистоћа које су сродне производу, јер антитела за такве нечистоће могу интераговати и са самим производом).

Имуноесеји - имунолошки приступ

- У овим имуноесејима користи се „приступ празног хода“ (енгл. *blank run approach*). Користе се исте ћелије као ћелије за производњу биофармацеутика, а једина разлика је што оне не поседују гене који кодирају протеин од интереса. Ове „празне“ произвођачке ћелије се потом подвргавају *upstream* процесу, као и произвођачке ћелије.
- Након *upstream* процеса спроводе се стандардни процеси пречишћавања производа, али само до фазе која је непосредно пре завршних корака пречишћавања, при чему настају бројни протеини који се могу наћи уз финални производ. Ови протеини се изолују и користе за имунизацију животиња које стварају специфична поликлонска антитела за те протеине.

Имуноесеји - имунолошки приступ

- Овако добијена антитела се пречишћавају, а потом инкорпорирају у радиоимуноесеје (RIA) или ензимске имуноесеје (ELISA), који се могу користити за испитивање производа. Овакви системи детектују нечистоће које су присутне у производу (у концентрацији од 1-100 mg/l), а потичу од ћелије домаћина. ELISA се сматра златним стандардом међу методама за детекцију протеинских нечистоћа пореклом од домаћина, али с друге стране недостатак ове методе је што не може да препозна нечистоће изван опсега детекције ELISA кита. Такође, могу се развити имуноесеји који детектују само једну потенцијалну нечистоћу. Ови есеји су специфични, сензитивни и најчешће детектују циљни антиген, чак иако је присутан у малој количини.

Пирогене нечистоће

Пирогени

- Пирогени су супстанце које када се нађу у системској циркулацији индиректно утичу на пораст телесне температуре и у ову разнолику групу супстанци убрајају се:
 - хемијски агенси;
 - честичне материје;
 - ендотоксин (липополисахарид - LPS).
- Присуство пирогена у крвотоку може изазвати озбиљне последице по здравље. Најчешће детектовани пироген је ендотоксин, пореклом из Грам-негативних бактерија (експресиони системи) које на својој површини садрже чак 3 - 4 милиона LPS молекула. Механизам којим пирогени повећавају телесну температуру је комплексан и зависи од врсте пирогена, нпр. улазак ендотоксина у крвоток посредством макрофага стимулише продукцију IL-1 који изазива грозницу (па отуда има алтернативни назив ендогени пироген).

Пирогени

- Пирогени су најчешће присутне нечистоће у биофармацеутицима, а ефикасна имплементација GMP омогућава да се ризик од присуства пирогена сведе на минимум.
- Контаминацију финалног производа ендотоксином је тешко контролисати јер:
 - Многи рекомбинантни биофармацеутици се производе у Грам-негативним бактеријама, те је и сам домаћин извор ендотоксина. Ове бактерије секретују ендотоксин у производ, који се не уклања филтрацијом када се уклањају бактерије;
 - Ендотоксин је термостабилан, па уколико је присутан у производној опреми неће бити уништен аутоклавирањем.

Методе за детекцију пирогена

- Пирогени се могу детектовати у парентералним препаратима бројним методама, од којих су најзначајније:
 - пирогени тест
 - LAL тест
 - рекомбинантни фактор C есеј

Пирогени тест

- Пирогени тест подразумева парентералну примену испитиваног производа код групе здравих кунџа уз континуирано праћење ректалне температуре. Пораст температуре изнад одређеног нивоа означава присуство пирогена. Европска Фармакопеја прописује примену производа код 3 кунџа, а резултати се тумаче на следећи начин:
 - Производ не садржи пирогене уколико је збирни пораст температуре код сва три кунџа $\leq 1,15$ °C.
 - Производ садржи пирогене уколико је збирни пораст температуре $> 2,65$ °C.
 - Тест се понавља на наредној серији животиња уколико је вредност између ове две критичне вредности.

Пирогени тест

- Предност овог теста је што се њиме детекује велики број пирогених супстанци, али поред тога има и одређене недостатке:
 - скуп је (потребне су животиње, виваријуми, особље обучено за рад са животињама);
 - лажно позитивни резултати који се могу добити услед лошег руковања кунџима или присуства субклиничке инфекције или генерално лошег здравственог стања животиња;
 - варијабилни резултати услед употребе различитих легла кунџа;
 - природни пирогени одговор - одређени биофармацеутици (нпр. цитокини као што је IL-1 и TNF) изазивају природни пирогени одговор, што ограничава употребу кунџа у тестирању ових производа.

LAL тест

- Наведени недостаци пирогеног теста довели су до чешће употребе *in vitro* есеја, LAL теста (енгл. - *Limulus amoebocyte lysate*), који је комерцијално доступан од 70-их година прошлог века.
- Супстрат за извођење LAL теста је лизат добијен прерадом амебоцита потковичастих краба (*Limulus polyphemus* L. и *Tachypleus tridentatus* L).
- Хемолимфа ових врста морских ракова садржи само једну врсту ћелија – амебоците, који се изолују центрифугирањем, након чега се испирају и лизирају, а добијени лизат се преноси у бочице без пирогена и даље користи за потребе LAL теста.

LAL тест

- Као основ за израду ове *in vitro* методе за детекцију бактеријских ендотоксина послужила је чињеница да продирање Грам-негативних бактерија у циркулацију потковичасте крабе изазива интраваскуларну коагулацију.
- Ендотоксин активира коагулациону каскаду на сличан начин као што се она физиолошки одвија код сисара. Ендотоксин узрокује постепену, секвенцијалну активацију различитих фактора коагулације (зимогени фактор С и фактор В) који су природно присутни у амебоцитима потковичасте крабе.
- Протеолитичком разградњом полипептида коагулогена под дејством активираног коагулишућег ензима настају коагулин и мањи пептидни фрагменти.
- Коагулин даље полимеризује (ступа у нековалентне интеракције) формирајући гел тј. угрушак (*gel clot*).

LAL тест

- Услови за извођење LAL теста захтевају оптималну pH вредност, јонску јачину, температуру и дужину инкубације, а LAL тест се може извести коришћењем 3 методе:
 - Метода формирања чврстог коагулума (*gel clot* метода),
 - Метода промене боје супстрата (хромогена метода),
 - Метода промене оптичке густине супстрата (турбидиметријска метода).

LAL тест

- Gel clot метода, која се заснива на коагулацији лизата амебоцита у присуству ендотоксина, се најчешће користи за детекцију ендотоксина у биофармацеутицима и другим фармацеутским препаратима, јер је осетљивија од пирогеног теста.
- Ова метода се заснива на томе да када су у испитиваном узорку присутни бактеријски ендотоксини изнад одређене границе, долази до формирања коагулума и тест се сматра позитивним.
- Метода је квалитативна и семиквантитативна, а изводи се тако што се прави серија дупло разблажених узорка.

LAL тест

- Код хромогене методе принцип LAL теста се заснива на додатку малог синтетског пептида, осетљивог на хидролизу у присуству LAL коагулишућег ензима. Овај синтетски пептид садржи хромогени маркер (најчешће *para*-нитроанилин, pNA) који се након деловања коагулишућег ензима ослобађа у раствор, што омогућава спектрофотометријску анализу узорка и прецизнију детекцију ендотоксина.
- У присуству бактеријских ендотоксина изнад одређене границе у испитиваном узорку, долази до промене боје супстрата, а интензитет промене боје супстрата се може квантификовати спектрофотометријски на таласној дужини од 405 nm.

LAL тест

- Код турбидиметријске методе у присуству бактеријских ендотоксина изнад одређене границе у испитиваном узорку, долази до промене оптичке густине супстрата, тј. до замућења.
- Метода је квантитативна, интензитет замућења је сразмеран концентрацији присутног ендотоксина и квантификује се спектрофотометријски.

LAL тест

- LAL тест има одређене предности у односу на пирогени тест:
 - сензитивнији - детектује ендотоксин у концентрацији мањој од пар pg;
 - финансијски исплативији - не користи животиње;
 - бржи – у зависности од формата који се користи, овај тест траје 15 - 60 минута.
- Недостатак овог теста је селективност, јер детектује искључиво ендотоксин, али не и остале пирогене. Међутим то и није тако значајан проблем у пракси, јер је ендотоксин заправо и најчешћи пироген у биофармацеутским производима.

LAL тест

- Пре рутинске употребе овог теста за детекцију и квантификацију ендотоксина у неком производу, неопходно је валидирати тест. Валидацијом се доказује да производ (или ексципијенси присутни у производу) не омета брзину/степен формирања крвног угрушка (тј. да нису инхибитори или активатори ензима који се користе у LAL тесту).
- Инхибицијом LAL ензима добијају се лажно позитивни резултати теста (нпр. валидационе студије подразумевају праћење пораста ендотоксин-негативних резултата уз познате концентрације ендотоксина, или пораст ендотоксина уз променљиве количине производа пре употребе LAL реагенса).

Рекомбинантни фактор С есеј

- Као алтернатива LAL тесту може се користити рекомбинантни фактор С (rFC) есеј. rFC је синтетски протеин добијен клонирањем молекула ДНК за фактор С потковичасте крабе који у присуству ендотоксина покреће коагулациону каскаду.
- У овом тесту, везивање ендотоксина активира rFC молекуле који делују на аминокумарин (флуоресцирајући супстрат), што доводи до стварања флуорогеног једињења. Потом се флуоресценција мери на таласним дужинама 380 nm и 440 nm у одсуству и присуству ендотоксина, а разлика у флуоресценцији је пропорционална концентрацијама ендотоксина у узорку.

Рекомбинантни фактор С есеј

- Предности у односу на LAL тест су мањи број лажно позитивних резултата, а опсег ензимске осетљивости на ендотоксин је 0,05–500 EU/ml. Међутим, недостатак је што је овај тест склон контаминацији у теренским условима.
- Иако су ова два теста упоредива у смислу ефикасности, избор одговарајућег теста зависи од типова узорака, жељених граница детекције (осетљивости), времена детекције (око 60 min), погодности експеримената (неопходан флуориметар) и трошкова теста (скупљи).

Детекција ДНК у финалном производу

- Парентерална примена протеинског биофармацеутика који садржи ДНК са активним онкогенима је непожељна.
- Главни проблем је то што би хумане ћелије могле преузети ДНК и експримирати те гене.
- Постоје докази да се у специфичим условима “огољена” ДНК може инкорпорирати у одређене ћелије.
- Према тренутно важећим смерницама дозвољен ниво заостале ДНК у рекомбинантним производима је 10 pg/терапијској дози.

Детекција ДНК у финалном производу

- Након ћелијске хомогенизације ослобађају се ендogene нуклеазе које долазе у директан контакт са ћелијском ДНК и деградирају је.
- Такође, већина хроматографских корака ефикасно одваја ДНК од производа. Јоноизмењивачка хроматографија је нарочито ефикасна, јер је ДНК негативно наелектрисан (због фосфатних група у нуклеотидном скелету).
- Међутим, често постоји потреба за увођењем додатног корака за уклањање ДНК током *downstream* процеса (нпр. сировом хомогенату могу се додати комерцијалне ДНКазе, које ће уједно смањити и вискозитет производа који потиче од ДНК).

Детекција ДНК у финалном производу

- ДНК нечистоће се у препарату могу детектовати употребом радиообележене ДНК, чак и када је присутна у веома малим концентрацијама (нанограмски опсег).
- Овај процес се дешава кроз неколико корака у две фазе.
- Прва фаза подразумева изолацију ДНК нечистоће из производа (нпр. екстракција фенолом/хлороформом и преципитација етанолом) и наношење капи изоловане ДНК на нитроцелулозни филтер папир (*dot blot*). Потом се филтер папир „пече“ на 80° С под вакуумом, што денатурише ДНК, одвајају се ланци и везују за филтер.
- Друга фаза подразумева да се ДНК изолована из ћелије која производи биофармацеутик обележава радиоактивним изотопом ^{32}P током транслације.

Детекција ДНК у финалном производу

- Систем се затим загрева до 90 °C (фаворизује се денатурација и одвајање ланаца), а онда следи инкубација денатурисаног обележеног узорка током неколико сати на температури од 40 °C, заједно са “печеним” филтер папиром (снижавањем температуре омогућава се поновно везивање комплементарних ланаца ДНК, при чему се обележена ДНК везује за комплементарни ланац ДНК имобилисан на филтер папиру).
- Филтер папир се даље испира ради уклањања неспецифично везане радиолиганд пробе, а потом се ауторадиографски детектује свака везана радиолиганд проба.
- Следећи корак је квантификација ДНК у производу коришћењем *dot-blot* есеја, при чему се користе стандарди познатих количина ДНК и узорка производа.
- Након завршене ауторадиографије, интензитет добијених тачака се пореди са стандардима.

Детекција микроорганизама у финалном производу

- Биофармацеутици, као и други фармацеутици намењени за парентералну употребу, морају бити стерилни (једини изузетак су живе вакцине).
- Ћелијске линије које се користе за добијање биофармацеутика прате се током процеса производње како би се обезбедило одсуство различитих патогена, као што су разне врсте бактерија, гљивица, микоплазми, протозоа, паразита, вируса и приона.
- Како би се спречило инфицирање ћелијских линија овим патогенима, морају се спровести одговарајуће микробиолошке мере опреза.

Детекција микроорганизама у финалном производу

- Присуство микроорганизама у финалном производу је неприхватљиво из бројних разлога:
 - парентерална примена производа који је контаминиран бактеријама и вирусима изазива инфекције код пацијента;
 - микроорганизми могу метаболисати производ и тако смањити његову потентност - ово је случај код протеинских биофармацеутика, јер многи микроорганизми стварају екстрацелуларне протеазе;
 - супстанце које микроорганизми секретују могу штетно утицати на здравље пацијента (нпр. грам-негативне бактерије секретују ендотоксин или протеине који могу индуковати имунски одговор).

Тестови за детекцију вируса

- Велики број тестова се користити за детекцију и квантификацију вирусних нечистоћа, како у сировом материјалу, тако и у готовом биофармацеутику. Међутим, и даље не постоји тест који може да детектује све потенцијално присутне типове вируса у узорку. Тренутно доступни вирусни тестови могу детектовати само специфичне вирусе или, у најбољем случају, фамилију блиско повезаних вируса.
- Тренутна стратегија за скрининг производа на присуство вируса подразумева испитивање биофармацеутика на вирусе који се најчешће могу наћи у њему. Међутим, на овај начин није могуће детективати нове вирусне честице или неокарактерисане/непознате вирусне нечистоће. Важно је напоменути да ниједан тест не може открити све вирусе и да сваки тест има праг детекције, тј. потребно је да постоји минимална количина вируса која је детектабилна.

Тестови за детекцију вируса

- Постоје три врсте тестова за детекцију вируса:
 - имуноесеји;
 - тестови засновани на вирусним ДНК пробама;
 - биоеесеји.

Имуноесеји

- Стварање антитела која препознају и везују специфичне вирусе је једноставно. Узорци живих/ослабљених вируса, као и пречишћених компоненти вирусног капсида, могу да се инјектују у животињу како би се стимулисала производња поликлонских антитела (или да се олакша производња моноклонских антитела хибридома технологијом). Прикупљена антитела се после користе за добијање специфичног имуноесеја, који се користи за рутинско тестирање узорака на присуство специфичних вируса.
- Имуноесеји су комерцијално доступни и имају могућност детекције великог броја вируса. Имуноесеји за детекцију вируса имају већи број предности: сензитивни, једноставни за извођење, брзи, економски исплативи.

Тестови засновани на вирусним ДНК пробама

- Тестови који подразумевају употребу специфичних вирусних ДНК проба се користе за скрининг биофармацеутика на присуство вирусне ДНК (нпр. детекција CMV и HPV вируса).
- Метода подразумева хибридизацију нуклеинске киселине са познатим фрагментима ДНК који су комплементарни одређеним регионима вирусног генома.
- Ове ДНК пробе су обележене радиоизотопом, ензимом или хемилунисцентним материјама тако да омогућавају детекцију вирусног генома.

Тестови засновани на вирусним ДНК пробама

- Вирусни геном се може детектовати у узорцима фиксираног ткива (*in situ*), или у другом случају се може прво пренети на чврсту фазу (*dot*) или нитроцелулозни папир (*dot blot*), па тек онда детектовати. Код *dot blot* хибридизације, вирусни ДНК геном се фрагментише коришћењем рестрикционих ендонуклеаза, добијени фрагменти се раздвајају гел-електрофорезом и онда преносе на нитроцелулозни папир и детектују хибридизацијом са ДНК пробом.
- Стратегија ових есеја је слична као код *dot blot* есеја који се користе за детекцију ДНК нечистоћа из ћелија домаћина.

Биоесеји

- Постоје два типа биоесеја за детекцију вируса. Први тип биоесеја подразумева инкубирање финалног производа и ћелијских линија осетљивих на велики број вируса. Ћелије се прате, како би се уочила појава цитопатског ефекта или других очигледних знакова вирусне инфекције.
- Други тип биоесеја се спроводи тако што се производ примени код експерименталних животиња, а вирусни агенси присутни у производу ће изазвати производњу антивиралних антитела код животиња (миша, кунића и хрчка). Четири недеље након администрације производа животињама се узима крв и издваја серум. Узорци серума се ензимским имуноесејима проверавају на присуство вирусних антитела.

Биоесеји

- Ови есеји су врло сензитивни, па ће и мале количине антигена довести до производње велике количине антитела.
- Један узорак серума се проверава на присуство специфичних антитела за већи број вирусних честица.
- Међутим, ове анализе трају дуго и скупе су, тако да нису погодне за рутинску употребу.

Детекција осталих нечистоћа у финалном производу

- Поред поменутих, и друге нечистоће могу бити присутне у биофармацеутицима. Нечистоћама се сматрају и неке од помоћних супстанци које се додају током иницијалних корака *downstream* процеса:
 - пуфери;
 - преципитациони раствори (етанол или други растварачи, соли и сл.);
 - инхибитори протеаза;
 - антипенећи агенси и др.
- У контакт са производом током процеса производње могу доћи и нечистоће које потичу од опреме:
 - метални јони који потичу од цистерни/цевовода за производ;
 - производи настали „распадањем“ материјала од којих је направљена стационарна фаза у хроматографској колони.

Детекција осталих нечистоћа у финалном производу

- Бочице за паковање и чување финалног производа пажљиво се бирају, морају бити хемијски инертне и одговарајућег квалитета како би се спречило „цурење“ било које супстанце из њих. Из ових разлога најбоље је производ паковати и чувати у стакленим бочицама.
- У неким случајевима, неопходно је доказати да су сви трагови нечистоћа отклоњени пре пуњења бочица финалним производом и то:
 - када се током неке од иницијалних фаза производње додају инхибитори протеаза (инхибиција протеолитичке разградње деловањем ендогених протеаза), јер могу бити токсични или могу (непотребно) инхибирати ендogene протеазе у организму пацијента након администрације биофармацеутика;
 - код афинитетне хроматографије - неопходно је доказати одсуство деградационих продуката из хроматографских колона, јер се за везивање лиганда за стационарну фазу хроматографске колоне користе бројне хемијске методе, које подразумевају употребу токсичних реагенса који, ако се у потпуности не уклоне, остају у производу.

Детекција осталих нечистоћа у финалном производу

- Софистициране аналитичке методе олакшавају детекцију ниског нивоа многих нечистоћа у биофармацеутицима. Међутим, постоји могућност да неокарактерисане нечистоће остану недетектоване у финалном производу.
- Као додатни кораци за постизање нешкодљивости производа користе се тестови „абнормална токсичност“ и „нешкодљивост“. Стандардни протоколи за такве тестове описани су у различитим међународним фармакопејама. У Европској фармакопеји, овај тест се назива „тест абнормалне токсичности“; док се у Фармакопеји Сједињених Америчких Држава назива „Тест нешкодљивост“. Ова два теста су суштински иста, осим минорних разлика у вези са бројем коришћених животиња и тумачењем резултата.

Детекција осталих нечистоћа у финалном производу

- Ови тестови подразумевају парентералну примену (*i.v.* или *i.p.*) производа код најмање 5 здравих мишева. Животиње се прате 48 h током којих токсични ефекти не би требало да се испоље (осим очекиваних симптома). Смрт или појава болести код једне или више животиња упозорава да треба спровести даља истраживања на већем броју животиња.
- Тестови за испитивање токсичности су дизајнирани тако да утврде постојање неочекиване активности производа која би могла да угрози здравље пацијента након примене. Међутим, због многобројних недостатака коришћење ових *in vivo* тестова је данас делимично напуштено. Сматра се да се на основу резултата теста абнормалне токсичности не могу извући потпуно поуздани резултати, затим, овај тест није могуће валидирати према карактеристикама валидације као што су специфичност, поновљивост и граница детекције.

Детекција осталих нечистоћа у финалном производу

- Додатни недостатак је што је овај тест веома варијабилан, постоји проблем поновљивости унутар и међу лабораторијама и није довољно специфичан. Такође, спровођење теста абнормалне токсичности подразумева неоправдану употребу значајног број лабораторијских животиња, што није у складу за етичким принципима о добробити животиња. Сходно томе, неке од регулаторних агенција (FDA, Европска фармакопеја) теже уклањању захтева за тест абнормалне токсичности за поједине биолошке производе попут одређених вакцина, серума и антибиотика.

Валидационе анализе

- Валидација је поступак утврђивања или проверавања ваљаности процедура, процеса, поступака, опреме или материјала. Рутинске и адекватне валидационе анализе су основа GMP које се примењују у био(фармацеутској) производњи и такве анализе омогућавају нешкодљивост финалног производа. Према дефиницији FDA валидација представља систем документованих доказа који обезбеђују висок степен гаранције да ће одређени процес доследно производити производ (биофармацеутик) који испуњава своје унапред одређене спецификације и квалитет.
- Валидационе анализе морају бити пажљиво дизајниране и потпуно документоване, док се резултати ових анализа чувају у писаној форми у фарбрикама. Као део рутинске контроле производње проверавају се ти записи и њихова усаглашеност са GMP.

Валидационе анализе

- Валидационе анализе обухватају све аспекте био(фармацеутске) производње.
 - Валидационе анализе се понављају у прописаним временским интервалима (дневно, недељно или месечно).
 - Старији делови опреме се чешће валидирају, како би се спречили потенцијални кварови.
 - Нови делови опреме се валидирају пре њихове даље рутинске употребе.
- Примери валидационих анализа:
 - аналитичке ваге - валидирају се мерењем стандардизованих тежина (тегова);
 - аутоклави - валидирају се тако што се током рутинске употребе проверава да ли се постиже тражена температура у различитим деловима коморе.
 - НЕРА филтери - тестирају се како би се испитало “цурење”.

Валидационе анализе

- Валидација услова у чистој соби постиже се употребом бројача честица. Бројач честица је уједно и вакуумски чистач који константно усисава ваздух из окружења и броји честице. Број честица по кубном метру тестираног ваздуха се може лако одредити. Осим тога, проласком ваздуха кроз филтер промера 0,2 μm задржавају се сви микроорганизми у бројачу.
- Концентрација микоорганизама по кубном метру ваздуха се одређује стављањем филтера у Петри шољу са хранљивим материјама, у којој ће микроорганизми са филтера расти и стварати колоније.

Валидационе анализе

- Поред опреме, бројни процеси/процедуре које се користе у производњи се валидирају повремено (учесталост зависи од ризика за појаву одступања, што је ризик већи валидационе анализе се чешће спроводе).
- Најкритичнија је валидација асептичног пуњења, чији је циљ да се докаже да је финални производ стерилан. Ова валидација подразумева замену серије финалног производа хранљивим медијумом. Хранљиви медијум се подвргава стерилној филтрацији и асептичном пуњењу. Након затварања, бочице се инкубирају на температури 30 – 37 °C, што осигурава раст микоорганизама, уколико су присутни. Раст миокроорганизама се може једноставно пратити мерењем апсорбанце на таласној дужини 600 nm. Уколико нема раста микоорганизама то значи да су постигнути асептични услови пуњења.

Валидационе анализе

- Валидационе анализе за потврду одсуства нечистоћа су од посебног значаја у биофармацеутској производњи и подразумевају коришћење сировине са познатим нивоом изабране нечистоће и подвргавање контаминираног материјала комплетном протоколу за производњу. То омогућава одређивање нивоа уклањања нечистоћа након сваког корака пречишћавања и укупно смањење нивоа нечистоћа током процеса производње.
 - Нпр. анализе уклањања вируса се спроводе тако што се сировом материјалу додају најмање три врсте вируса, које иначе представљају карактеристичну нечистоћу за тај производ и за које је доступан једноставан есеј за детекцију. Циљ ових анализа је да се провери да ли се постиже ефикасно уклањање/инактивација вируса корацима који су саставни део производног процеса.

Валидационе анализе

- Такође, спроводи се и квантитативна процена нивоа укупног смањења вируса коришћеним поступцима. То се постиже намерним додавањем значајних количина вируса у сирови материјал и/или током различитих корака процеса производње и тестирањем његовог уклањања/инактивације током наредних корака.
- Валидација уклањања ДНК се спроводи на сличан начин. Сировом материјалу се додаје радиобележена ДНК и потом се спроводе *downstream* процеси. Ниво заостале ДНК у производу након сваког корака пречишћавања се прати мерењем нивоа радиоактивности.
- За прецизнију валидациону анализу, молекулска маса ДНК која се додаје треба да буде слична молекулској маси ендогене ДНК, која представља нечистоћу у сировом производу. Такође, битна је и количина радиобележене ДНК која се додаје, она треба да буде слична количини ДНК која се користи за добијање производа.

Валидационе анализе

- Друге процедуре у склопу производног процеса које захтевају валидацију су:
 - чишћење,
 - деконтаминација и
 - санитација.
- Ове процедуре су посебно развијене за сваки од специфичних делова опреме. Улога ових процедура је да уклоне биолошки садржај. Њихова способност за уклањање биолошког садржаја се процењује праћењем нивоа микробиолошких загађивача пре и након примене протокола за чишћење, деконтаминацију и санитацију опреме.