

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA RAPUŠ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



MATEJA RAPUŠ

**PRIMERJAVA REGULATIVNIH ZAHTEV ZA VREDNOTENJE
DOVOLJENIH OSTANKOV KONTAMINANTOV PO ČIŠČENJU
OPREME V FARMACEVTSKI PROIZVODNJI**

**THE COMPARISON OF REGULATORY REQUIREMENTS FOR
THE EVALUATION OF PERMISSIBLE RESIDUES OF
CONTAMINANTS AFTER EQUIPMENT CLEANING IN THE
PHARMACEUTICAL MANUFACTURE**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem izvajala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Francu Vrečerju za strokovno pomoč in nasvete pri pisanju naloge ter Petru Hančiču z Oddelka za predkliniko v Razvoju in raziskavah v Krki, d.d. Novo mesto za pomoč pri izračunih. Iskrena hvala tudi moji družini, še posebej moji mami in fantu Matjažu, ki sta me tekom celotne poti izobraževanja finančno in moralno podpirala, ter Andreju za pomoč pri oblikovanju naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Franca Vrečerja.

Mateja Rapuš

VSEBINA

POVZETEK	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1 UVOD	1
1.1 VALIDACIJA ČIŠČENJA	2
1.1.1 Validacija čiščenja skozi zgodovino	2
1.1.2 Validacija čiščenja danes	3
1.2 PROCES ČIŠČENJA	4
1.2.1 Načini čiščenja	5
1.2.2 Tipi opreme in sistem grupiranja.....	5
1.2.3 Načrtovanje čiščenja	6
1.2.4 Izbira analizne metode in vzorčenje	6
1.3 DOLOČANJE MEJE DOVOLJENEGA OSTANKA (MDO)	7
1.3.1 Določanje mej dovoljenega ostanka v zgodovini	8
1.3.2 Predstavitev nove smernice za določanje MDO s strani ISPE in EMA	12
2 NAMEN NALOGE	17
3 METODE IZDELAVE NALOGE	18
3.1 PREGLED IN IZVEDBA TOKSIKOLOŠKIH ŠTUDIJ	18
4 REZULTATI.....	21
4.1 METILPREDNIZOLON.....	21
4.1.1 Toksikološke študije metilprednizolona.....	21
4.1.2 Izračun MDO.....	22
4.2 CEFAZOLIN.....	24
4.2.1 Toksikološke študije cefazolina	24
4.2.2 Izračun MDO.....	25
4.3 5-FLUOROURACIL.....	26
4.3.1 Toksikološke študije 5-fluorouracila.....	27
4.3.2 Izračun MDO.....	28

4.4	UČINKOVINA X	29
4.4.1	Toksikološke študije učinkovine X	29
4.4.2	Izračun MDO.....	30
4.4.3	Izračun meje dovoljenega ostanka na podlagi terapevtskega odmerka ZU ter meja dovoljenega ostanka na enoto površine.....	32
5	RAZPRAVA	34
5.1	PRIMERJAVA MEJE DOVOLJENEGA OSTANKA, DOLOČENE PO STARI IN NOVI SMERNICI, ZA IZBRANE ZDRAVILNE UČINKOVINE	37
5.2	PRIMERJAVA STARE IN NOVE SMERNICE ZA VALIDACIJO ČIŠČENJA	39
5.3	DRUGI NAČINI PREPREČEVANJA NAVZKRIŽNE KONTAMINACIJE	41
6	ZAKLJUČEK.....	42
7	LITERATURA.....	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv uporabe varnostnih faktorjev na območje varnega prostora (povzeto po 3)	10
Slika 2: Vpliv učinkovitega procesa čiščenja na območje varnega prostora (povzeto po 3)	11
Slika 3: Kemijska struktura metilprednizolona (povzeto po 39)	21
Slika 4: Kemijska struktura cefazolina (povzeto po 42)	24
Slika 5: Kemijska struktura 5-fluorouracila (povzeto po 47)	27

KAZALO TABEL

Tabela I: Varnostni faktorji za določitev maksimalnega dovoljenega ostanka pri validaciji čiščenja glede na vrsto izdelka (3)	11
Tabela II: Najpogostejše vrednosti varnostnega faktorja F1 (27, 35)	15
Tabela III: Vrednosti varnostnih faktorjev F3 (27, 35)	16
Tabela IV: Podatki iz toksikoloških študij metilprednizolona (37, 38)	21
Tabela V: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE za metilprednizolon iz LOAEL (27, 37, 38)	23
Tabela VI: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev pri izračunu PDE za metilprednizolon iz NOEL (27, 37)	23
Tabela VII: Podatki iz toksikoloških študij cefazolina (43, 44)	24
Tabela VIII: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE za cefazolin (27, 43, 44)	25
Tabela IX: Podatki iz toksikoloških študij 5-fluorouracila (48, 49)	27
Tabela X: Podatki iz toksikoloških študij učinkovine X	30
Tabela XI: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE iz rakotvorne študije izvedene na miših	31
Tabela XII: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE iz rakotvorne študije na podganah	31
Tabela XIII: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE iz študije vpliva na razmnoževanje	32
Tabela XIV: Primerjava MDO za izbrane zdravilne učinkovine po stari in novi smernici	38
Tabela XV: Primerjava stare in nove smernice za določitev MDO (10, 23, 26, 52)	39

POVZETEK

Za zagotovitev proizvodnje varnih, učinkovitih in kakovostnih zdravil je potrebno pri proizvodnji različnih izdelkov na isti opremi in/ali prostorih izvajati postopek čiščenja, s čimer preprečujemo prenos ostankov zdravilne učinkovine in pomožnih snovi iz predhodnega izdelka ter uporabljenih čistilnih sredstev v naslednji izdelek. Za preverjanje učinkovitosti postopkov čiščenja je potrebno izvesti validacijo čiščenja in na ta način zagotoviti zanesljivo in ponovljivo očiščenje opreme in proizvodnih prostorov. Pri validaciji čiščenja je potrebno opredeliti mejo dovoljenega ostanka (čistilnega sredstva, zdravilne učinkovine, kritičnih pomožnih snovi), ki ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi oziroma živali (veterinarski izdelki) in za okolje.

Načrtovanje procesa čiščenja je zahteven postopek, v katerem je potrebno definirati metodo čiščenja (ročno, avtomatsko, polavtomatsko čiščenje), način vzorčenja opreme po čiščenju (odvzem brisa, uporaba izpiralnega topila in drugi načini) ter metodo, s katero bomo odvzete vzorce analizirali in ostanek kvantitativno ovrednotili. Meja dovoljenega ostanka se je s prihodom nove smernice s strani Evropske agencije za zdravila spremenila iz predhodno nespecifičnih in neselektivnih kriterijev v toksikološko naravnano mejo.

V magistrski nalogi smo izdelali pregled stare in nove smernice za validacijo čiščenja ter za štiri zdravilne učinkovine, ki predstavljajo izziv na področju validacije čiščenja in potencialno tveganje za zdravje ljudi, opravili primerjalni izračun meje dovoljenega ostanka po starih in novih kriterijih. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da kriteriji nove smernice podajajo strožje meje dovoljenega ostanka od kriterijev stare smernice za dve od štirih izbranih zdravilnih učinkovin, ki predstavljata najvišje tveganje za zdravje ljudi. Posodobitev smernice je dobrodošla sprememba na področju validacije čiščenja, saj so na ta način meje smiselneje določene na podlagi posameznega toksikološkega potenciala zdravilne učinkovine, namesto da so meje za vse zdravilne učinkovine postavljene enako.

Ključne besede: validacija čiščenja, tveganje, smernice, meja dovoljenega ostanka, dovoljena dnevna izpostavljenost

ABSTRACT

In order to produce safe, effective and quality drugs, it is necessary to perform a cleaning process between manufacturing cycles of different products on the same equipment and/or in the same production rooms, and thus prevent transmission of the residue of the active ingredient and excipients from the previous product as well as the cleaning agents used to the next product. To verify the effectiveness of the cleaning, it is necessary to carry out the validation of cleaning to provide a reliable and repeatable purifying process of equipment and production rooms. When performing cleaning validation, it is necessary to determine the maximum residue level (acceptable residue limit) of a cleaning agent, an active ingredient or critical excipients, which does not pose any risk neither to the people/animal health nor to the environment.

When planning the purifying process, it is necessary to define the cleaning method (manual, automatic, semi-automatic cleaning), the sampling method (swab, rinse sampling and others) and the testing method that will help us quantitatively assess the residue. The advent of a new guideline on cleaning validation by The European Medicines Agency has changed the maximum residue level after cleaning from previously nonspecific and nonselective criteria to a limit that is dependent on the toxicity of the residue.

In this thesis, we tried to present the differences between the old and the new cleaning validation guidelines and comparatively set maximum residue levels, according to the old and the new cleaning validation guideline, for four active substances that present a potential health risk to the people. The maximum residue levels, determined according to the criteria of the new guideline, were lower than the limits according to the criteria in the old guideline for two out of four active substances which present the highest risk to human health. The revision of the guideline is a welcome change in cleaning validation, since the limits are no longer set the same way for all active substances but they take into account the toxicological potential of each (active) substance separately.

Key words: cleaning validation, risk, guideline, maximum residue level, permitted daily exposure

SEZNAM OKRAJŠAV

AAS	Atomska absorpcijska spektroskopija (angl. <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>)
ADE	Sprejemljiva dnevna izpostavljenost (angl. <i>Acceptable Daily Exposure</i>)
ADI	Sprejemljiv dnevni vnos (angl. <i>Acceptable Daily Intake</i>)
CAPA	Preventivni in korektivni ukrepi (angl. <i>Corrective And Preventive Actions</i>)
CIP	Avtomatsko čiščenje (angl. <i>Cleaning in Place</i>)
COP	Čiščenje v ločenih prostorih (angl. <i>Cleaning Out of Place</i>)
CFR	Zakonik zveznih predpisov (angl. <i>Code of Federal Regulations</i>)
DPP	Dobra proizvodna praksa (angl. current <i>Good Manufacturing Practice</i> , cGMP)
FDA	Ameriška agencija za prehrano in zdravila (angl. <i>Food and Drug Administration</i>)
EMA	Evropska agencija za zdravila (angl. <i>European Medicines Agency</i>)
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	Mednarodna konferenca o harmonizaciji (angl. <i>International Conference on Harmonization</i>)
ISPE	Mednarodni odbor farmacevtskega inženirstva (angl. <i>International Society for Pharmaceutical Engineering</i>)
LOEL	Najnižji odmerek, ki povzroča učinek, ki je neželen ali terapevtski, želen učinek (angl. <i>Lowest observed effect level</i>)
LOAEL	Najnižji odmerek, ki povzroča kritičen, za zdravje neželen učinek (angl. <i>Lowest observed adverse effect level</i>)
LOD	Meja zaznavnosti (angl. <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Meja določanja (angl. <i>Limit of Quantification</i>)

MDO	Meja dovoljenega ostanka (angl. <i>Acceptable Residue Limit</i> , <i>ARL</i> ali angl. <i>Maximum Allowable Carry-over</i> , <i>MACO</i>)
NOAEL	Najvišji odmerek, ki ne povzroča kritičnih, neželenih učinkov (angl. <i>No observed adverse effect level</i>)
NOEL	Najvišji odmerek, ki ne povzroča niti kritičnih učinkov niti terapevtskih učinkov (angl. <i>No observed effect level</i>)
PDE	Dovoljena dnevna izpostavljenost (angl. <i>Permitted Daily Exposure</i>)
TD ₅₀	Odmerek, ki povzroči nastanek tumorja pri polovici preskusnih živali (angl. <i>Tumorigenic Dose Rate 50</i>)
SOP	Standardni operativni postopek
TOC	Skupni organski ogljik (angl. <i>Total Organic Carbon</i>)
TTC	Prag toksikološkega tveganja (angl. <i>Threshold of Toxicological Concern</i>)
WIP	Polavtomatsko čiščenje (angl. <i>Washing in Place</i>)
ZU	Zdravilna učinkovina

1 UVOD

Navzkrižna kontaminacija v proizvodnji farmacevtskih izdelkov je ena največjih groženj kakovosti in varnosti zdravil. Ob prenosu posamezne sestavine farmacevtskega izdelka, posebej zdravilne učinkovine (ZU), v naslednji izdelek lahko slednji s tem postane kombinacija dveh ZU, namesto da bi vseboval le eno. Rezultat so lahko novi neželeni stranski učinki ali pa se pojavi popolnoma drug učinek. Tveganje predstavljajo tudi mikroorganizmi, ki se lahko razrastejo, če po končanem procesu čiščenja oprema ni dovolj dobro očiščena in posušena. Ker so nekateri ostanki predhodnih izdelkov (posebej ZU) težje odstranljivi zaradi njihove slabe topnosti, je potrebno pri čiščenju uporabljati tudi čistilna sredstva. Kontaminacijo naslednjega izdelka s čistilnim sredstvom je potrebno preprečiti, zato Ameriški urad za prehrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*, FDA) zahteva, da se z validacijo čiščenja dokaže odstranitev kritičnih čistilnih sredstev v takšni meri, da njihov ostanek ne predstavlja tveganja za zdravje. Da se vsemu temu izognemo, je po vsakem končanem procesu izdelave izdelka pri proizvodnji ZU (s kemijskimi ali biotehnološkimi postopki) in farmacevtskih izdelkov (zdravil) potrebno izvajati čiščenje opreme. Farmacevtski izdelki morajo biti varni, kakovostni in učinkoviti, zato je potrebno obravnavati vsako snov, naj bo to ZU iz predhodnega izdelka, proizvedena na isti opremi, čistilno sredstvo, delci iz zraka ali mikroorganizmi, kot potencialen kontaminant našemu izdelku (1, 2).

Doseči stanje popolnoma očiščene opreme je izredno težko in včasih temu niso posvečali veliko pozornosti. Po letu 1963, ko je FDA objavil prve zahteve glede čiščenja proizvodne opreme, pa se je stanje izboljšalo. Podjetja so vzpostavila za njihov proces najprimernejši načini čiščenja, ki so ga ob zahtevah regulatornih organov tudi validirala (1, 3). Kljub temu pa je ostalo odprto vprašanje: Kako čisto je dovolj čisto?

Za meje dovoljenih ostankov so zadnjih nekaj let neuradno veljali trije kriteriji (3), ki sta jih leta 1993 postavila Fourman in Mullen. Ti so bili po mnenju nekaterih kritikov preveč splošno postavljeni, zato je v potrditvi nova smernica (4), ki opredeljuje drugačne kriterije za določitev meje dovoljenega ostanka. Če je mogoče, naj bo dovoljena meja potencialnih kontaminantov osnovana na kriterijih dovoljene dnevne izpostavljenosti (angl. *Permitted daily exposure*, PDE) ali sprejemljive dnevne izpostavljenosti (angl. *Acceptable daily*

exposure, ADE). Na ta način je smernica, ob upoštevanju podatkov iz predkliničnih in kliničnih študij, individualno za vsako zdravilno učinkovino ali nečistoto oziroma kritični kontaminant, prešla iz nespecifično in neselektivno postavljenih kriterijev na specifične kriterije (5).

1.1 VALIDACIJA ČIŠČENJA

Učinkovitost in doslednost čiščenja dokažemo s procesom validacije čiščenja. Pomembnosti očiščenosti opreme in prostorov se danes zavedajo vsi proizvajalci farmacevtskih izdelkov po svetu, v preteklosti pa temu ni bilo tako. Validacija čiščenja je počasi, vendar vztrajno prodirala v farmacevtsko industrijo in spreminjala mišljenje proizvajalcev zdravil (3, 6).

1.1.1 Validacija čiščenja skozi zgodovino

Prvi zahtevi FDA iz leta 1963 (povzeto po 3) s področja čiščenja proizvodne opreme so sledile zahteve tudi drugih regulatornih organov. Potrebo po ustreznem čiščenju in vzdrževanju proizvodne opreme je izpostavil dokument CFR (angl. *Code of Federal Regulations*) v poglavju 211.67, kjer so zapisali, da morajo biti oprema in ostali pripomočki, ki se uporabljajo pri proizvodnji farmacevtskih izdelkov, čisti in redno vzdrževani z namenom preprečevanja kontaminacije izdelkov (7). Ker se v zgodovini farmacevtska podjetja niso pretirano ukvarjala s čistočo proizvodne opreme, je bilo nujno potrebno, da se, v izogib odpoklicem zdravil s tržišča ali celo smrtnim primerom kot posledici onečiščenja farmacevtskega izdelka z drugo ZU oziroma drugim kontaminantom, postavijo smernice za čiščenje opreme. Nekoč so proizvodnjo opremo čistili nepopolno podučeni delavci, pogosto samo z vodo ali vročo milnico. Če so ugotovili, da je po vizualnem pregledu oprema še vedno umazana, so postopek čiščenja samo ponovili, razloga, zakaj je do tega prišlo oziroma zakaj opreme niso uspeli očistiti, pa niso iskali. V začetku osemdesetih let dvajsetega stoletja je FDA objavila splošne zahteve s področja validacij (3, 8). Čeprav se je večina podjetij osredotočila le na procesno validacijo, je nekaj let pozneje Samuel Harder (9) izrazil potrebnost validacije postopkov čiščenja proizvodne opreme. Leta 1988 je odpoklic izdelka holestiraminske smole zaradi navzkrižne kontaminacije z intermediati pesticidov, do katere je prišlo zaradi uporabe skupnih posod pri proizvodnji obeh izdelkov, ponovno povečal zavedanje FDA o možnostih navzkrižne

kontaminacije. Podjetje ni izvajalo ustrezne kontrole nad uporabo posod in postopek čiščenja posod ni bil validiran (3, 8).

Odločilen dogodek, ki je proizvajalce opomnil na upoštevanje zahtev s strani regulatornih organov, je bil spor FDA s podjetjem Barr Laboratories v letih 1989 do 1992. FDA je tožila podjetje zaradi nepravilnega izvajanja validacij čiščenja in neustreznega dokazovanja odsotnosti čistilnih sredstev. Čeprav je FDA dobila tožbo, je sodnik podal kritiko tudi na razumljivost in izčrpnost smernic. Leta 1993 je tako FDA podala splošne zahteve, za katere pričakuje, da jih podjetja izpolnijo in so predmet inšpekcijskih pregledov farmacevtskih podjetij. Če podjetje pri čiščenju uporablja različna čistilna sredstva, mora njihovo odsotnost po končanem procesu čiščenja tudi dokazati. Poleg SOP-a (standardnega operativnega postopka) za validacijo čiščenja proizvodne opreme oziroma za sam postopek čiščenja ter SOP-a za validacijo analizne metode, s katero bomo uspešnost čiščenja ovrednotili, ter SOP-a za odvzem vzorcev po čiščenju opreme, je FDA zahtevala tudi napisane postopke čiščenja za različne scenarije proizvodnje izdelkov na isti opremi, naj bo to pri proizvodnji različnih zdravil ali istega zdravila različnih serij, ter pripravljene validacijske protokole. Pod drobnogled so vzeli celotno validacijsko dokumentacijo (1, 10, 11). Če je FDA presodila, da je validacija čiščenja v podjetju pomanjkljiva, so podjetju izdali opozorilno pismo, v katerem so zahtevali, da podjetje pripravi in po odobritvi s strani agencije izvede preventivne in korektivne ukrepe (angl. *Corrective And Preventive Actions*, CAPA), ki bodo preprečili možnost za ponovno navzkrižno kontaminacijo (12).

1.1.2 Validacija čiščenja danes

Danes so postopki čiščenja in njihova validacija eden ključnih korakov v farmacevtski industriji. Validacijo čiščenja izvaja usposobljena in izobražena oseba, ki mora postopek izvajati skladno z validacijsko dokumentacijo. Validacijski protokol, ki vsebuje vse pomembne informacije o izvedbi validacije (namen študije, način čiščenja, tehnika vzorčenja, analizna metoda in drugo), mora biti odobren s strani odgovornih oseb pred začetkom validacije. Po koncu validacije je potrebno izdelati validacijsko poročilo, v katerem so predstavljeni rezultati in zaključek postopka. Celoten postopek mora biti sledljiv, zato je v končnem poročilu potrebno podati vse laboratorijske dnevniške in oznake SOP-ov, katerim smo tekom validacije sledili (6, 13). Če kasneje, tekom izvajanja rednega čiščenja opreme z validiranim procesom čiščenja, pride do sprememb v postopku, moramo spremembe ovrednotiti in oceniti njihov vpliv tako na validacijski postopek kot na

kakovost čiščenja. Če je potrebno, moramo izvesti dodatne analize, da dokažemo učinkovitost procesa kljub spremembi, oz. ponoviti postopek validacije čiščenja, če sprememba pomembno vpliva na postopek in rezultate čiščenja (14).

Validacija čiščenja se vedno izvaja pri vpeljevanju novega postopka oziroma nove opreme. Nadaljnjo validacijo oziroma revalidacijo za isti izdelek, ki se proizvaja na isti opremi, izvajamo še periodično in ob spremembah, kot so (15):

- spremembe v formulaciji izdelka,
- spremembe v postopku čiščenja ali
- pri zamenjavi čistilnih sredstev.

Validacija čiščenja v praksi pomeni izdelavo vsaj treh serij istega izdelka z isto velikostjo serije, isto formulacijo in koncentracijo zdravilne učinkovine, na isti opremi, pri katerih izvedemo popolnoma enak način čiščenja. Obstajajo tudi primeri, ko validacija čiščenja ni potrebna. Potreba po validaciji čiščenja je namreč odvisna od tega v kateri fazi je izdelek (razvojni ali končni izdelek), od lastnosti potencialnega kontaminanta ter vrste opreme (skupna ali namenska oprema). V razvojni fazi izdelka, ko le-tega šele spoznavamo, lahko uporabljamo metodo preverjanja učinkovitosti čiščenja. To pomeni, da za potrditev učinkovitosti čiščenja izdelamo serijo izdelka in po končani proizvodnji izvedemo postopek čiščenja. Po čiščenju preverimo očiščenost uporabljene opreme z analizo vzorcev, odvzetih iz očiščene opreme. Rezultate vzorčenj primerjamo s postavljenimi mejami in na ta način potrdimo ustreznost čiščenja in s tem čistost opreme. Verifikacija procesa čiščenja je pomembna tudi za preverjanje očiščenosti razvojne opreme v pilotnem laboratoriju, na kateri proizvajajo izdelke, ki jih bodo uporabljali za namen kliničnih študij (2, 15). Validacija čiščenja prav tako ni nujno potrebna pri proizvodnji zaporednih serij istega izdelka na namenski opremi, kjer ni tveganja za navzkrižno kontaminacijo, izjema je mikrobiološka kontaminacija. V teh primerih izvajamo manj temeljito čiščenje, na koncu pa opremo pregledamo in ocenimo vizualno čistost opreme (13, 15).

1.2 PROCES ČIŠČENJA

O procesu čiščenja za določen izdelek razmišljamo že v fazi razvoja izdelka. Izberemo ga glede na fizikalno-kemijske lastnosti izdelka oziroma na podlagi lastnosti uporabljenih ZU in pomožnih snovi, kot so topnost, potencialna toksičnost zdravilne učinkovine,

kompatibilnost s čistilnim sredstvom in tako dalje (2). Ne glede na to, kateri način čiščenja izberemo, moramo po končanem čiščenju zagotoviti očiščenost opreme in površine v takšni meri, da ostanek ne predstavlja tveganja za navzkrižno kontaminacijo naslednjega izdelka. Proces čiščenja mora biti učinkovit, dosleden in ponovljiv (1, 6).

1.2.1 Načini čiščenja

Za čiščenja proizvodne opreme lahko uporabimo naslednje načine čiščenja (2, 15, 16):

- avtomatsko čiščenje (angl. *Cleaning in Place*, CIP, tudi čiščenje na mestu),
- polavtomatsko čiščenje (angl. *Washing in Place*, WIP, tudi pranje na mestu),
- ročno čiščenje (angl. *Manual Cleaning*) in
- čiščenje v ločenih prostorih (angl. *Cleaning out of Place*, COP).

1.2.2 Tipi opreme in sistem grupiranja

Na splošno ločimo dva tipa opreme. Prvi tip predstavlja opremo, ki je namenjena proizvodnji zdravil z visoko aktivnimi in alergenimi ZU. Ker primer kontaminacije izdelkov z betalaktamskimi antibiotiki zaradi neustreznega čiščenja predstavlja veliko tveganje, za proizvodnjo takšnih izdelkov uporabljamo ločeno oziroma namensko opremo. Že samo tisočinka terapevtskega odmerka betalaktamske ZU je namreč lahko usodna pri preobčutljivih posameznikih (17, 18). Naslednji tip opreme predstavlja skupna oprema, na kateri proizvajamo različne vrste izdelkov z različnimi ZU in pomožnimi snovmi. Čiščenje takšne opreme je pogosto težavno, saj moramo za vsak izdelek imeti razvit in validiran postopek čiščenja. Ravno zato je postalo priljubljeno tako imenovano grupiranje izdelkov in opreme. V tem primeru izdelke, ki imajo na primer podobne strukture ZU, vsebujejo ZU s podobnimi terapevtskimi učinki, oziroma so topne v enakih topilih, imajo podoben mehanizem toksičnosti ali pa imajo skupna tveganja, grupiramo v skupine, ki jih izdelujemo na skupni opremi. Proces čiščenja v takem primeru prilagodimo vsem izdelkom iz iste skupine. Uporabimo enako čistilno sredstvo, enako temperaturo, čas čiščenja in tako dalje. Dovoljeno mejo ostankov prilagodimo tistemu članu skupine, ki velja za najbolj tveganega, saj bo le-ta imel najnižjo dovoljeno mejo ostankov. Govorimo torej o enem procesu čiščenja, ki pa ga lahko uporabimo za več izdelkov in na ta način prihranimo veliko časa in stroškov (2, 19, 20).

1.2.3 Načrtovanje čiščenja

Že med razvojem izdelka začnemo razmišljati o primernih čistilnih sredstvih in njihovi koncentraciji, številu ciklov čiščenja, času čiščenja in drugih parametrih, ki bi lahko vplivali na uspešen proces čiščenja. Hkrati z analiznim vrednotenjem skušamo ugotoviti, katera komponenta v vzorcu je najtežje topna v izbranem mediju za čiščenje, kateri izmed vzorcev bi lahko v skupini predstavljal ključno tveganje in podobno (21).

Pred začetkom izvajanja validacije čiščenja moramo pripraviti protokol ter pridobiti odobritev s strani odgovorne osebe, ki vsebuje vse ključne informacije o postopku validacije čiščenja. V njem definiramo namen validacije, pristop čiščenja (na primer grupiranje izdelkov), seznam izdelkov, za katere bomo izvajali validacijo čiščenja, način vzorčenja, analizno metodo za analizo vzorcev, meje dovoljenih ostankov in način določanja mej, izobraževanje zaposlenih, ki bodo izvajali čiščenje opreme in analizo vzorcev v laboratoriju ter seveda odgovorne za pravilno pripravo dokumentov, izvedbo validacije in pripravo končnega poročila. Nekatera podjetja so se odločila za tako imenovano predvalidacijo, s katero se prepričajo, da so postopki čiščenja dovolj dobro zastavljeni in jasno napisani. Lahko se namreč zgodi, da si delavec zaradi pomanjkanja informacij v validacijskem načrtu določena navodila napačno razlaga. Če čiščenje izvaja več različnih delavcev, lahko zaradi nenatančnih navodil pride do variacij v postopku čiščenja, zaradi katerih sta lahko validacija čiščenja oz. redno čiščenje neuspešna (2).

1.2.4 Izbira analizne metode in vzorčenje

Tako kot proces čiščenja tudi analizne metode, s katerimi vrednotimo odvzete vzorce iz opreme oz. prostorov, razvijamo že med razvojem izdelka. Pri tem upoštevamo lastnosti našega ostanka, predvsem kritične komponente, kot na primer topnost, stabilnost, polarnost in seveda okvirna koncentracija. Izbiramo lahko med specifičnimi in nespecifičnimi metodami. S specifičnimi metodami (tekočinska kromatografija (angl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), atomska absorpcijska spektroskopija (angl. *Atomic Absorption Spectroscopy*, AAS), plinska kromatografija, ionska kromatografija in druge) lahko določimo točno določeno komponento v množici drugih nečistoč, medtem ko nespecifične metode (TOC, pH, prevodnost, titracije) omogočajo določevanje katerekoli snovi, ki ima točno določen odziv (1, 6).

Najpomembnejše pri izbiri metode je, da nam omogoča kvantitativno vrednotenje pri oziroma pod mejo dovoljenega ostanka kontaminanta, tako da lahko dobimo zanesljiv

rezultat o količini preostalih kontaminantov. Parametra, ki določata občutljivost analizne metode, sta meja zaznavanja (angl. *Limit of detection*, *LOD*) in meja določanja (angl. *Limit of quantification*, *LOQ*). LOD je definirana kot najnižja količina snovi, ki jo lahko zaznamo, LOQ pa predstavlja najnižjo količino snovi, ki jo lahko kvantitativno izmerimo. Ker želimo ostanek kvantitativno ovrednotiti, mora biti LOQ nižji od meje dovoljenega ostanka izbranega (kritičnega) kontaminanta. Za vrednotenje ostankov kontaminantov v sklopu validacije čiščenja uporabljamo izključno validirane analizne metode (22, 23).

Vzorčenje moramo zato opravljati tako na tistih mestih, ki so lahko dostopna in enostavna za čiščenje, kot tudi na omenjenih kritičnih mestih (13). Poznamo različne načine vzorčenja za preverjanje čistosti opreme, najpogostejši pa so sledeči (6, 13):

- odvzem brisa,
- uporaba izpiralnega topila,
- vzorčenje placeba in
- uporaba šampiljke.

1.3 DOLOČANJE MEJE DOVOLJENEGA OSTANKA (MDO)

S procesom validacije čiščenja želimo dokazati, da s čiščenjem zmanjšamo obseg ostankov na takšen nivo, ki ne bo več predstavljal tveganja za navzkrižno kontaminacijo. Čeprav je želja vsakega farmacevtskega podjetja, da bi oblikovali tak postopek čiščenja, ki bi omogočal popolno odsotnost ostankov, je to žal finančno, časovno, pogosto pa tudi tehnično nemogoče. Proizvajalci morajo zato postaviti določene meje, pod katerimi vnos ostanka predhodnega(ih) izdelka(ov) v naslednji izdelek ne predstavlja več tveganja za zdravje ljudi in ne predstavlja ogroženosti okolja. To mejo imenujemo meja dovoljenega ostanka (MDO), ki se v tuji literaturi pojavlja pod kratico ARL (angl. *Acceptable Residue Level*) ali MACO (angl. *maximum allowable carryover*) (2, 13).

Smernice, ki jih je FDA podala že v zgodnjih devetdesetih letih dvajsetega stoletja, so zahtevale, da morajo biti meje dovoljenih ostankov znanstveno utemeljene. Kriterij, da je ostankov manj, kot je meja detekcije analizne metode, ni sprejemljiv, saj se metode izboljšujejo in so vrednosti za mejo določitve vse nižje. Meje dovoljenega ostanka morajo biti postavljene glede na tveganje, ki ga nek ostanek predstavlja za ljudi ali okolje. Nesmiselno bi namreč bilo, da bi imeli za zdravilno učinkovino iz skupine vitaminov in za

citotoksično substanco enake meje. Pri postavljanju mej se moramo ozreti tudi na analizno metodo, s katero bomo vrednotili količino ostankov. Želja proizvajalca je občutljiva in robustna metoda, ki bo neodvisna od zunanjih dejavnikov (3, 13).

1.3.1 Določanje mej dovoljenega ostanka v zgodovini

Po sporu FDA z Barr Laboratories je za proizvajalce postalo nujno, da vzpostavijo validacijo čiščenja in določijo mejo dovoljenega ostanka. Fourman in Mullen (24) iz podjetja Eli Lilly sta leta 1993 predlagala določanje mej na podlagi naslednjih treh kriterijev (Lilly metoda):

- največ ena tisočinka (1/1000) minimalnega terapevtskega odmerka katere koli ZU se lahko pojavi v največjem odmerku naslednjega izdelka,
- katerikoli ostanek sme biti prisoten v naslednjem izdelku do največ 10 ppm,
- po končanem čiščenju mora biti oprema vizualno čista, brez vidnih ostankov.

Čeprav kriteriji niso bili nikoli uradno priznani s strani FDA, je članek (24) postal mejnik na področju validacije čiščenja in pri oblikovanju smernic so regulatorni organi kot referenco pogosto navajali zgornji članek (3).

Zgoraj navedene kriterije sta avtorja utemeljila na različne načine, vendar razlaga v literaturi ni popolnoma jasna. Kriterij ene tisočinke je sestavljen iz treh faktorjev, vsak z vrednostjo 10. Prvi faktor predstavlja eno desetinko odmerka zdravilne učinkovine, ki je v terapevtskem odmerku obravnavana kot neaktivna učinkovina. Drugi faktor predstavlja tako imenovani varnostni faktor, tretji pa z vrednostjo 10 zagotavlja robustnost procesa validacije čiščenja. Naslednji kriterij (10 ppm) izhaja iz prehrambene industrije, kjer 10 ppm predstavlja dovoljeno koncentracijo, uporabljeno za nevarne in toksične snovi kot sprejemljiv ostanek v tkivih živali in perutninskih izdelkih, ki vstopajo v prehranjevalno verigo ljudi. Zakaj je izbrana ravno vrednost 10 ppm, v literaturi ni pojasnjeno. Zadnji kriterij, vizualno čisto, pa je neke vrste dodatni kriterij. Lahko se namreč zgodi, da ostanek ZU zadosti prvemu in drugemu kriteriju, vendar pri pregledu opreme po opravljenem čiščenju opazimo vidne ostanke kontaminantov na površini. Takšne meje so nesprejemljive, saj smo tudi sami skeptični do krožnikov, na katerih so vidni ostanki hrane, pa čeprav so bili krožniki oprani v pomivalnem stroju (3, 24). Kriterij vizualno čisto je pomemben kriterij, ki mora spremljati vsako validacijo čiščenja, vendar kot samostojen

kriterij ni zadosti. O kriteriju vidnih ostankov govori tudi odstavek CFR 211.67 (b), kjer je zapisano, da mora biti oprema pred nadaljnjo uporabo vedno pregledana (3, 7).

Za nekatere visoko aktivne ZU, na primer za alergene, betalaktamske antibiotike, citostatike, hormone, ki predstavljajo visoko tveganje za zdravje ljudi, mora biti meja maksimalnega dovoljenega ostanka pod mejo zaznavanja najbolj občutljive analize metode. Smernica za njih predvideva uporabo namenske opreme ali proizvodnjo v ločenih prostorih (3, 13).

Določevanje meje dovoljenega ostanka je temeljilo na izračunu oziroma določitvi mej na podlagi vseh treh kriterijev. Pri določevanju meje dovoljenega ostanka so proizvajalci izračunali in določili meje s pomočjo prvih dveh kriterijev. Tisti izmed njih, ki je dajal strožjo (nižjo) mejo dovoljenega ostanka, je postal kriterij za mejo dovoljenega ostanka.

1.3.1.1 Določitev MDO na podlagi terapevtskega odmerka

Določitev MDO je poleg zgornjih treh načinov določevanja najpogosteje potekala na podlagi informacije o terapevtskem odmerku prejšnjega izdelka (izdelek A) in naslednjega izdelka (izdelek B). Izračunamo jo lahko s pomočjo spodnje enačbe:

$$MDO = \frac{\text{največja velikost serije izdelka B} \times \text{minimalni TDO izdelka A}}{\text{maksimalni TDO izdelka B} \times VF}, \quad (\text{Enačba 1})$$

kjer je:

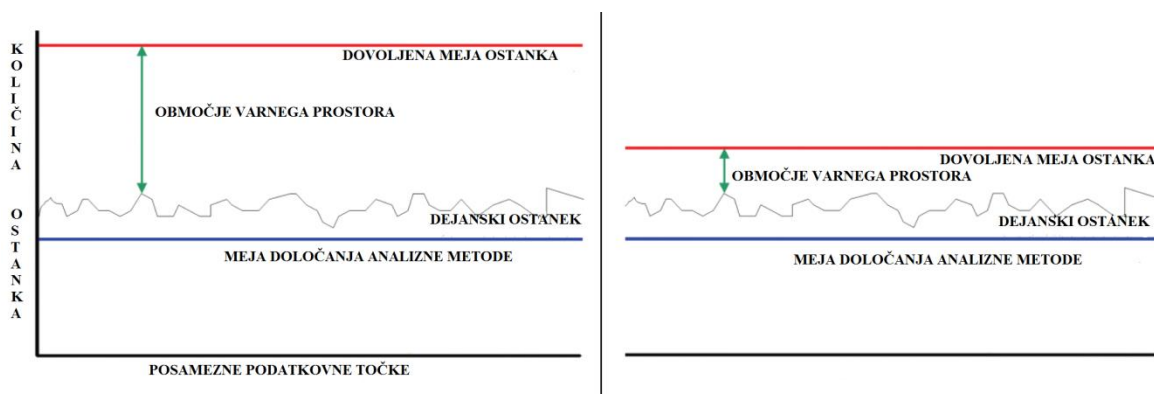
TDO Terapevtski dnevni odmerek

VF Varnostni faktor

Ker je meja dovoljenega ostanka odvisna od največje velikosti serije in maksimalnega terapevtskega odmerka naslednjega izdelka, se bo le-ta razlikovala tako med zdravilnimi učinkovinami, ki bodo proizvedene na isti proizvodni opremi kot tudi za isto zdravilno učinkovino, proizvedeno na različnih proizvodnih opremah (3).

Eden izmed členov v enačbi je imenovan varnostni faktor (VF). Smisel uporabe varnostnega faktorja je zmanjšanje razlik med farmacevtskimi izdelki, saj imajo slednji različne načine aplikacije, in s tem omogočiti realnejšo določitev MDO. Ker ZU, glede na učinkovitost in toksikološki potencial, niso enake za vsa zdravila, pri izračunu uporabljamo različne pristope in različne varnostne faktorje. V osnovi lahko rečemo, da za tista zdravila

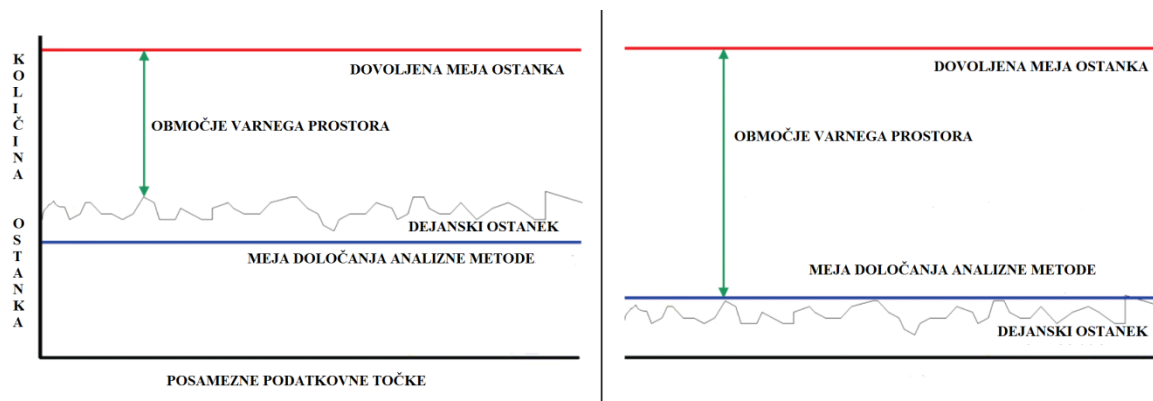
oziroma ZU in tiste ostanke, ki predstavljajo manjše tveganje za okolje in zdravje ljudi, v izračunu uporabljamo nižje varnostne faktorje, za tista zdravila z višjim tveganjem pa višje varnostne faktorje. Andrew Walsh (3) je predstavil kritičen pogled na uporabo varnostnih faktorjev, ki je predstavljen na sliki 1. Območje varnega prostora predstavlja mejo med dejanskim ostankom na površini proizvodne opreme in določeno (izračunano) mejo dovoljenega ostanka. Želja vsakega proizvajalca je, da je to območje čim širše, saj je s tem tveganje za uporabnika manjše. Desna in leva stran slike se razlikujeta v uporabi dodatnih varnostnih faktorjev. Na desni strani slike se ob uporabi višjih varnostnih faktorjev območje varnega prostora zmanjša, čeprav je količina dejanskega ostanka na obeh straneh še vedno enaka. S tem je tudi prenos ostanka v naslednji izdelek enak in je uporabnik naslednjega izdelka izpostavljen enaki količini ostanka, ne glede na uporabo dodatnih varnostnih faktorjev.



Slika 1: Vpliv uporabe varnostnih faktorjev na območje varnega prostora (povzeto po 3). X- in y- os sta za levo in desno stran slike enaka.

Glede na to, da že leva stran slike predstavlja mejo dovoljenega ostanka, ki je varna za uporabnika, je dodajanje varnostnih faktorjev nesmiselno, saj nam ne omogoči večje varnosti za uporabnika, temveč le možnost, da bo zaradi strožjih, a nepotrebnih mej, validacija čiščenja oziroma samo čiščenje neuspešno. Cilj izdelati kakovostno, varno in učinkovito zdravilo torej ne zavisi od uporabe varnostnih faktorjev, temveč od uspešnega in učinkovitega postopka čiščenja, ki bo zmanjšal količino ostankov na sprejemljiv nivo, ter hkrati od občutljivosti analizne metode za zaznavanje ostankov na opremi, kot je prikazano na sliki 2. Ko to dosežemo, bo dejanski ostanek kontaminantov nižji in območje varnega prostora se bo razširilo brez nesmiselnega dodajanja varnostnih faktorjev (desna stran slike 2). LOQ analizne metode mora biti dovolj nizka, da bo kvantifikacija ostanka kontaminanta po očiščenju opreme možna v koncentracijskem območju, ki zagotavlja

varnost. V nasprotnem primeru se namreč lahko zgodi, da ostankov kontaminantov ne moremo zaznati (desna stran slike 2) (3, 5).



Slika 2: Vpliv učinkovitega procesa čiščenja na območje varnega prostora (povzeto po 3). X- in y- os sta za levo in desno stran slike enaka.

Varnostni faktorji, ki so bili izbrani za izračun meje dovoljenega ostanka na podlagi terapevtskega odmerka, so se običajno razlikovali glede na vrsto izdelka. Najpogostejši varnostni faktorji za določitev meje dovoljenega ostanka so predstavljeni v tabeli I (3).

Tabela I: Varnostni faktorji za določitev maksimalnega dovoljenega ostanka pri validaciji čiščenja glede na vrsto izdelka (3).

Varnostni faktor	Vrsta izdelkov
1/10-1/100 terapevtskega odmerka	Lokalni anestetiki (kreme, losjoni)
1/100-1/1000 terapevtskega odmerka	Peroralni izdelki
1/1000-1/10000 terapevtskega odmerka	Parenteralni izdelki
1/10000-1/100000 terapevtskega odmerka	Razvojni izdelki

1.3.1.2 Določitev MDO na podlagi LD₅₀

Ostankov po čiščenju ne predstavljajo samo ZU, temveč tudi druge snovi, kot na primer različne nečistote ali čistila, s katerimi opravljamo proces čiščenja. Za določitev MDO v tem primeru izberemo toksikološke podatke, saj terapevtski odmerki za te snovi niso na voljo. Omenjeni način določitve MDO je leta 1999 opisal William Hall (2, 11). Predlagal je, da za izračun uporabimo podatek LD₅₀, ki predstavlja odmerek, ki povzroči smrt pri polovici testnih organizmov. Ta podatek omogoča izračun najvišjega odmerka, ki ne

povzroča učinkov, naj si bo to kritičen, neželen za zdravje ali terapevtski učinek (angl. *no observed effect level*, NOEL) s pomočjo naslednje enačbe:

$$\text{NOEL} = LD_{50} \times 0,0005^* \quad (\text{Enačba 2})$$

*0,0005 je faktor, pridobljen iz toksikološke podatkovne baze (2)

Ko NOEL delimo z ustreznimi varnostnimi faktorji dobimo podatek o sprejemljivem dnevnem vnosu (angl. *Acceptable Daily Intake*, ADI), ki opredeljuje oceno dnevnega vnosa snovi skozi vse življenje in ne predstavlja pomembnega tveganja za zdravje ljudi. Leta 2000 so izračun NOEL prilagodili na telesno maso (enačba 3) (25).

$$\text{NOEL} = \frac{70 \times LD_{50}}{2000} \quad (\text{Enačba 3})$$

Število 70 v enačbi predstavlja povprečno maso odraslega človeka, 2000 pa je empirična konstanta, ki predstavlja recipročno vrednost konstante 0,0005 iz enačbe 2. Na osnovi izračunanega NOEL izračunamo meje dovoljenega ostanka izdelka A v izdelku B (25):

$$\text{MDO} = \frac{\text{NOEL} \times \text{min. velikost serije izdelka B}}{\text{VF} \times \text{najvišji TDO izdelka B}} \quad (\text{Enačba 4})$$

1.3.2 Predstavitev nove smernice za določanje MDO s strani ISPE in EMA

Če so še pred nekaj leti za določevanje MDO večinoma potrebovali le podatka o terapevtskem dnevnem odmerku in o velikosti serije naslednjega izdelka, je to v času proizvodnje visoko aktivnih in toksikološko kritičnih ZU postalo nedopustno. Pri starem izračunu proizvajalci niso upoštevali vseh dostopnih podatkov, ki so na voljo v predkliničnih in kliničnih študijah, kar se je odražalo v nekaterih primerih prestrogih v drugih pa preblagih mejah dovoljenega ostanka. Prvi je na to opozoril Mednarodni odbor farmacevtskega inženirstva (angl. *International Society for Pharmaceutical Engineering*, ISPE), ki je leta 2010 izdal priročnik za določitev mej (povzeto po 26), v katerem je strogo ocenil kriterije, ki sta jih podala Fourman in Mullen. Čeprav so bili ti kriteriji neuradno v uporabi več kot 17 let, so po njihovem mnenju brez znanstvene osnove. Sledila jim je EMA (angl. *European Medicines Agency*), ki je leta 2012 v javnost poslala osnutek nove smernice (4) za določanje zdravju neškodljivih mej pri opredelitvi tveganja, povezanega s proizvodnjo različnih zdravil na skupni opremi. Razlog za novo smernico je bila prenova poglavij 3 in 5 DPP. Določevanje mej po starih kriterij tako ni bilo več zadoščalo (4).

Obnova smernice s strani EMA je potekala na osnovi smernice za rezidualna topila (ICH Q3C) (27). Gre za različna organska topila, ki se uporabljajo ali nastajajo pri proizvodnji zdravilnih učinkovin ali pomožnih snovi in jih je po koncu procesa proizvodnje potrebno odstraniti v čim večji meri. Ker popolno odsotnost rezidualnih topil težko dosežemo, se je uveljavila potreba po postavljanju mej dovoljenih ostankov topil, ki za uporabnika ne bodo predstavljala tveganja. ICH je v ta namen pripravila smernico (27), v kateri poleg izračuna dovoljene dnevne izpostavljenosti tem topilom podaja tudi razdelitev rezidualnih topil na podlagi ocene toksikološkega tveganja v tri skupine. Izraza dopustni dnevni vnos (angl. *Tolerable daily intake*, TDI) in sprejemljivi dnevni vnos (ADI) je zamenjal termin dovoljena dnevna izpostavljenost (PDE).

Pri določevanju MDO kontaminantov v skladu s smernico EMA, je pomembno, da jih določimo sorazmerno s tveganjem ostanka za zdravje ljudi in varnost okolja, ki ga posamezen kontaminant predstavlja. Regulatorni organi zahtevajo, da so meje ostankov pri validaciji čiščenja postavljene na osnovi dejanskega tveganja, zato je potrebno, predvsem za visoko aktivne, citotoksične ali genotoksične ZU, izdelati izračun na podlagi ocene tveganja ter toksikoloških oziroma kliničnih podatkov. Iz podatkov toksikoloških, predkliničnih in kliničnih študij na izdelku oziroma ZU izračunamo NOEL. Če je za posamezno ZU značilnih več učinkov, ovrednotimo NOEL za vse učinke in za nadaljnje izračune uporabimo tistega, ki povzroča učinke pri najnižjem odmerku. V literaturi se poleg NOEL uporablja tudi izraz NOAEL (angl. *no observed adverse effect level*), ki ju pogosto enačijo. V nekaterih primerih med njima ni razlike, lahko pa se pojavi, če je učinek, ki se pojavi pri zvišanju odmerka, želen terapevtski učinek. Izraz NOEL namreč predstavlja najvišji odmerek, ki ne povzroča učinka - želenega ali neželenega, NOAEL pa je osredotočen le na odsotnost neželenih učinkov, ki se pojavijo z višanjem odmerka. NOEL lahko v nadaljevanju uporabimo za izračun PDE, ki predstavlja odmerek, specifičen za določeno ZU, ki pri tej ali nižji koncentraciji odmerka ne povzroča učinkov. Izraz PDE je bil prvič omenjen 1997 v ICH Q3C smernicah za ostanke topil, v novi smernici za določitev PDE pa ga je uporabila tudi EMA (4, 28, 29).

ISPE je leta 2010 v svojem priročniku za vrednotenje tveganj v proizvodnji zdravil uporabila izraz sprejemljiva dnevna izpostavljenost (angl. *Acceptable Daily Exposure*, ADE). Predstavlja odmerek, ki pri ali pod to koncentracijo, pri kakršnem koli načinu izpostavitve ne povzroča neželenih učinkov. Izraz ADE se največ pojavlja v ameriški

literaturi, medtem ko se je uporaba PDE uveljavila predvsem v evropskih smernicah. Razumeti je potrebno, da PDE in ADE ne pomenita isto. Razlika je v načinu določitve, saj PDE določimo s pomočjo NOEL, medtem ko za izračun ADE uporabimo NOAEL (4, 28).

Namen izdaje priročnika s strani ISPE (povzeto po 26) je bila tudi pomoč pri določitvi mej za nekatere ZU, s katerimi je bilo dovoljeno delo samo na namenski opremi. Preprost zaključek, da bomo izdelek izdelovali na namenski opremi, ni več dovolj. Ker FDA zahteva določitev mej na podlagi toksikološkega tveganja, je potrebno za vsak ostanek določiti PDE oziroma ADE. Samo v primeru, ko ugotovimo, da je izračunane meje težko doseči ali pa jih zaradi pomanjkanja podatkov v študijah ni možno izračunati, je dovoljeno uporabiti namensko opremo (4, 28). Možnost oziroma nujnost uporabe namenske opreme je tema, ki jo obravnava tudi obnovljeno poglavje 3 DPP (30), kjer so podrobno opisane zahteve s področja prostorov in opreme za proizvodnjo zdravil. Podpoglavje 3.6 omenja, da je uporaba namenske opreme priporočena v treh primerih:

- ko ocenimo, da izdelek predstavlja tveganje, ki ga ne moremo nadzirati,
- kadar v študijah ne najdemo podatkov o dovoljeni meji ali
- kadar so podatki o dovoljeni meji pod mejo zaznavanja najboljše analizne metode.

Genotoksičnim ZU, kjer vsaka izpostavljenost predstavlja tveganje, je EMA v povezavi s konceptom praga toksikološkega tveganja (angl. *Threshold of toxicological concern*, TTC) namenila posebno smernico (31). Če meje za te ZU ni mogoče določiti, uporabimo splošno mejo dovoljene izpostavljenosti, ki jo je določila EMA, in znaša 0,15 µg/osebo/dan, medtem ko za genotoksične nečistote veljajo meje 1,5 µg/osebo/dan. Določanje varnih mej na podlagi TTC poteka od primera do primera na podlagi vseh podatkov, ki jih o substanci lahko dobimo (4, 32-34).

1.3.2.1 Izračun PDE (ADE)

PDE (ADE) določimo tako, da NOEL (NOAEL) delimo z ustreznimi varnostnimi faktorji. Pogosto se zgodi, da za določene ZU oziroma druge kontaminante v literaturi ne obstaja podatek o NOEL ali NOAEL. V takih primerih za izračun ADE ali PDE uporabimo najnižji odmerek, ki povzroča učinek, naj si bo to kritičen, neželen za zdravje, ali terapevtski učinek (angl. *lowest observed effect level*, LOEL) oziroma v primeru ADE uporaba LOAEL (angl. *lowest observed adverse effect level*), ki predstavlja kritičen,

neželen učinek, izražen pri najnižjem odmerku (4, 28). Določitev PDE poteka s pomočjo spodnje enačbe (4):

$$\text{PDE} = \frac{\text{NOEL} \times \text{telesna teža}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5} \quad (\text{Enačba 5})$$

V imenovalcu enačbe se zopet pojavijo varnostni faktorji, ki so v literaturi pogosto imenovani tudi drugače, na primer faktorji negotovosti (4). Gre za faktorje od F1 do F5, ki omogočajo ublažitev razlik med ljudmi in živalsko populacijo, na kateri se izvajajo toksikološke študije. Te rezultate upoštevamo v izračunu PDE. Uporaba faktorjev je potrebna, saj so toksikološke študije izvedene na živalskih vrstah, katerih občutljivost je lahko drugačna od človeške.

Prvi faktor je faktor F1, ki predstavlja vpliv razlik med živalsko vrsto, ki je bila vključena v testiranju in ljudmi, kot so genetika, metabolizem, dolžina življenja in podobno. Najpogostejše vrednosti faktorjev F1 so prikazane v spodnji tabeli (tabela II).

Tabela II: Najpogostejše vrednosti varnostnega faktorja F1 (27, 35)

Vrednost F1	Ekstrapolacija
2	Psi → ljudje
2,5	Zajci → ljudje
3	Opice → ljudje
5	Podgane → ljudje
10	Druge vrste živali → ljudje
12	Miši → ljudje

F2 predstavlja razlike med posamezniki znotraj človeške vrste. Opredelimo ga z vrednostjo 10 in je konstanten. F3 predstavlja varnostni faktor za korelacijo glede na čas izpostavljenosti. Živalske vrste so preiskovani ZU v toksikoloških študijah lahko izpostavljene skozi celo življenje ali pa le del življenja (tabela III). Trajanje študije je odvisno od vrste testne živali. Povprečna doba glodavcev je namreč le dve leti, zato se na njih opravlja študije, ki trajajo krajši čas. Povprečna življenjska doba za najpogostejšo izbrano vrsto neglodavcev, psa, pa je od 12 do 15 let, zato lahko študija na teh vrstah živali traja nekaj let. Na ta način določimo uporabo ustreznega varnostnega faktorja.

Poenostavimo lahko, da krajša študija izpostavljenosti zahteva v izračunu PDE višji varnostni faktor F3 (27, 35, 36).

Tabela III: Vrednosti varnostnih faktorjev F3 (27, 35)

Vrednost F3	Razlaga
1	Pri podatkih iz študij, ki so trajale vsaj polovico življenja preskušane živali
1	Za podatke, pridobljene iz študij vpliva na razmnoževanje
2	Šestmesečne študije na glodavcih ali tri in pol letne študije na neglodavcih
5	Trimesečne študije na glodavcih ali dve leti trajajoča študija na neglodavcih
10	Podatki iz kratkotrajnih študij

Faktor F4 se uporablja za opredelitev resnosti učinkov, ki so bili določeni pri študijah. V primeru hudih neželenih učinkov (smrt, odpoved organov) ga ovrednotimo z vrednostjo 10, pri blažjih učinkih pa od vrednosti 5 do 1. Če podatkov o učinkih ni, kot F4 uporabimo faktor 10 in s tem predvidimo najhujši možen izid. Zadnji varnostni faktor F5 predstavlja vrednosti med 1 in 10. Če za izračun PDE uporabimo vrednost NOEL, bo vrednost F5 1, če pa uporabimo LOEL pa 10.

Masa, ki jo uporabimo v enačbi, je 50 kg, kar je manj od standardnih 60 oziroma 70 kg. Razlog za to je v populaciji odraslih bolnikov, ki zaradi bolezni tehtajo manj kot 50 kg. V primeru, da se izračun nanaša na topilo oziroma ostanek (kontaminant), ki se uporablja v pediatrične namene, je potrebno uporabiti varnostne faktorje za prilagoditev na nižjo maso (4, 27, 35).

2 NAMEN NALOGE

Navzkrižna kontaminacija v proizvodnji farmacevtskih izdelkov kot posledica prenosa ostankov predhodnega izdelka v naslednjega, je bila velik izziv s stališča kakovosti in varnosti zdravil. Regulatorne oblasti zato zahtevajo uporabo robustnih čistilnih postopkov in preverjanje njihove ustreznosti preko izvajanja validacij čiščenja opreme in prostorov. Nedavne spremembe v smernici za validacijo čiščenja, ki jo je izdala EMA, so razširile kriterije za določevanje meje dovoljenega ostanka iz neselektivnih in nespecifičnih, kakršne so predstavljale meje, ki sta jih postavila Fourman in Mullen (24), v toksikološko naravnano smernico, ki problematiko posameznega kontaminanta obravnava posamično.

Namen naše naloge je primerjati zahteve stare, predhodno veljavne, in nove smernice na področju validacije čiščenja, ki je trenutno v fazi potrjevanja. Opredelili smo probleme, s katerimi se pri načrtovanju procesa čiščenja za določen izdelek srečujemo ter predstavili kriterije in pristope za validacijo čiščenja opreme in prostorov pri proizvodnji farmacevtskih izdelkov. Na podlagi štirih izbranih ZU bomo v nadaljevanju primerjali dejanske dovoljene ostanke po čiščenju z izračuni mej po stari smernici (kriterij ene tisočinke) in novi smernici (PDE). ZU smo izbrali glede na tveganje, ki ga predstavljajo za zdravje ljudi ter na podlagi izzivov, s katerimi se pri validaciji čiščenja srečujemo. Eden izmed njih je topnost ZU, zato sta dve ZU, metilprednizolon, ki je predstavnik steroidnih hormonov, in antipsihotik, ki smo ga zaradi poslovne tajnosti poimenovali učinkovina X, slabo topni v vodi. Naslednja ZU je predstavnik betalaktamskih antibiotikov, zadnja pa 5-fluorouracil, ki je kot citostatik slabo topen v vodnih medijih. Z dobljenimi rezultati bomo podali mnenje o strogosti starih in novih kriterijev, o smiselnosti nove smernice ter o problemih, s katerimi se ob določanju mej po kriterijih nove smernice srečujemo.

3 METODE IZDELAVE NALOGE

Pregled kriterijev stare in nove smernice za določitev mej dovoljenih ostankov pri validaciji čiščenja bomo izvedli s pomočjo uporabe svetovnega spleta ter dostopne literature. S podatki o odmerjanju posameznega zdravila bomo izbrali najnižji terapevtski odmerek, ki se za izbrano zdravilno učinkovino uporablja, in določili MDO po stari smernici na osnovi kriterija ene tisočinke. S strokovno obdelavo objavljenih predkliničnih študij bomo izločili podatke, ki so pomembni za določitev NOEL, in jih uporabili za izračun PDE, ki predstavlja kriterij za določitev MDO nove smernice. Pri pregledovanju toksikoloških študij se bomo omejili na podatke iz štirih različnih toksikoloških študij:

- podatke iz študij ponavljajoče izpostavljenosti,
- podatke iz študije vpliva na razmnoževanje,
- podatke iz rakotvornih študij in
- podatke iz genotoksičnih študij.

Dodatno se, če glede na strukturo molekule ocenimo da je to potrebno, izvajajo tudi toksikološke študije imunotoksičnosti in fototoksičnosti.

3.1 PREGLED IN IZVEDBA TOKSIKOLOŠKIH ŠTUDIJ

Za izvedbo toksikoloških študij, katerih podatki so osnova za izračun vrednosti PDE (36), na poskusnih živalih izberemo zdrave živali obeh spolov, ki jih najmanj 5 dni pred začetkom osamimo in s tem prilagodimo na začetek študije. Živali so lahko nameščene v kletkah, kjer so ločena drug od druge ali pa jih ohranimo v skupinah in na ta način zagotovimo bolj naravno okolje. Študije so izvedene na glodavcih in neglodavcih; najpogosteje izbrana vrsta pri glodavcih je podgana, pri neglodavcih pa pes. Za posamezno študijo izberemo enako število samic in samcev. Izbira vrste živali je odvisna od:

- velikosti živali (da se bo lahko prilagodila velikosti kletke, ki je na voljo pri izvedbi študije),
- možnosti aplikacije preiskovane ZU poskusnim živalim, ki naj bo, če je le mogoče, enaka kot pri ljudeh in

- podobnost ADME procesov (absorpcija, porazdelitev, metabolizem in eliminacija) preiskovane substance med testno živaljo in ljudmi.

Živali so razdeljene v skupine, ena skupina pa v vsaki študiji predstavlja kontrolno skupino, kar pomeni, da ne prejema odmerka preiskovane substance. Začetna masa posamezne živali mora biti v območju $\pm 20\%$ povprečne mase vseh živali testirane skupine, variiranje mase živali v posamezni skupini pa naj bo minimalno.

Odmerki, ki so uporabljeni v toksikoloških študijah se na splošno delijo na nizek, srednji in visok. Vsak odmerek je dodeljen eni skupini živali, poleg navedenih treh skupin pa dodatna skupina živali predstavlja kontrolno skupino. Aplikacija odmerka preiskovane snovi naj bi potekala na enak način kot bodo ZU oziroma na njej temelječo farmacevtsko obliko uporabljali bolniki, vendar včasih to ni mogoče. Dve leti trajajočo študijo je namreč težko izvesti z uporabo parenteralne aplikacije. Med študijo, ki jo izvedemo v skladu z zahtevami dobre laboratorijske prakse (DLP) ter v skladu z ICH smernicami, spremljamo parametre, kot so sprememba telesne mase, poraba vode in hrane, klinične znake, izvajamo analizo krvi ter urina in druge.

- ŠTUDIJA PONAVLJAJOČE IZPOSTAVLJENOSTI

Namen tovrstne študije je določitev sprememb, ki jih povzroča ponavljajoča aplikacija preiskovane substance ter določitev povezanosti med spremembami in odmerjanjem. Običajno se izvede en kratkotrajen preskus (2 do 4 tedne) in en dolgotrajen, katerega trajanje je odvisno od pogojev klinične uporabe. Po končani študiji se izvede obdukcija na vseh živalih, ki so sodelovale v študiji.

- ŠTUDIJA VPLIVA NA RAZMNOŽEVANJE

S študijo se določuje toksični vpliv na sposobnost razmnoževanja in škodljive učinke na plod. Substanca se v različnih odmerkih aplicira skupinam poskusnih živali med paritvijo in po oploditvi, skupina brez prejetega odmerka pa je kontrolna skupina. Za ugotavljanje vpliva toksičnosti na plod se po končanem prejemanju odmerkov 4 do 5 samic žrtvuje in ovrednoti patološke spremembe na tkivih samic in plodov ter na ta način ovrednoti toksikološke oziroma teratogene učinke na samico in plod.

- ŠTUDIJA GENOTOKSIČNOSTI

In vitro ter in vivo testi, ki se izvajajo pri tej študiji, omogočijo vpogled v spremembe, ki jih je snov povzročila v genetskem materialu. Genotoksične snovi predstavljajo tveganje za zdravje, saj pogosto povzročajo raka. V tej študiji se izvajajo preskusi, na primer in vitro test za določanje kromosomskih poškodb, test za določevanje genskih mutacij v bakterijah in drugi.

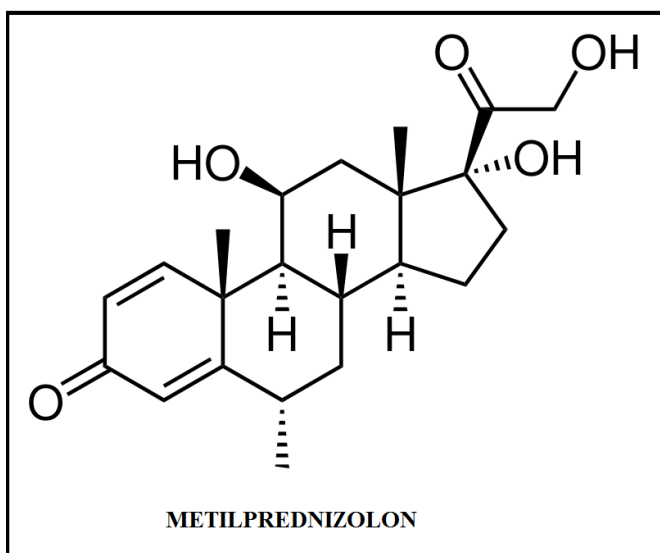
- **RAKOTVORNA ŠTUDIJA**

Tovrstna študija se izvede, kadar za zdravilno učinkovino obstaja tveganje, da imajo rakotvoren potencial. Za zdravilne učinkovine, za katere obstaja nedvoumen dokaz o genotoksičnosti, rakotvorne študije niso potrebne. V študiji se uporabi le glodavce, ki se jih po aplikaciji preiskovane substance dnevno opazuje in opredeli rast tumorjev.

4 REZULTATI

4.1 METILPREDNIZOLON

Metilprednizolon je steroidni hormon, ki ga uporabljamo za zdravljenje motenj v delovanju endokrinih žlez, za zdravljenje revmatičnih, kožnih in alergijskih bolezni, bolezni dihal, krvi in krvotvornih organov ter pri presaditvi organov ali tkiv. Pri dolgotrajnem jemanju metilprednizolona se lahko pojavijo različni neželeni učinki, kot na primer razjede in krvavitve v gastrointestinalnem traktu, zlomi kosti, vrtoglavica, imunske bolezni in drugo. Metilprednizolon lahko apliciramo na dva različna načina: peroralno v obliki tablet ali parenteralno v obliki injekcij (37, 38). Kemijska struktura metilprednizolona je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Kemijska struktura metilprednizolona (povzeto po 39)

4.1.1 Toksikološke študije metilprednizolona

Glavni toksikološki učinki, ki so se pokazali v predkliničnih študijah na poskusnih živali, so zmanjšan apetit in znižanje telesne mase, zmanjšano število levkocitov in limfocitov, atrofija jeter, timusa in nadledvične žleze (37, 38). Podatki, pridobljeni iz toksikoloških študij metilprednizolona, so prikazani v tabeli IV.

Tabela IV: Podatki iz toksikoloških študij metilprednizolona (37, 38)

ŠTUDIJA	PRESKUSNA ŽIVAL	NAČIN ODMERJANJA	TRAJANJE	NOEL
Študija ponavljajoče izpostavljenosti	podgane	subkutano	14 tednov	0,4 µg/kg
		subkutano	52 tednov	4 µg/kg
	psi	peroralno	42 dni	167 µg/kg (LOAEL)
Študija vpliva na razmnoževanje	podgane	subkutano	skozi celotno organogenezo	0,004 mg/kg
Rakotvorna študija	Študije kancerogenosti niso bile izvedene.			
Genotoksična študija	Izvedene in vitro študije so bile negativne.			

Dodatno je bila izvedena farmakološka študija aktivnosti tirozin aminotransferaze na podganah (37). Določen je bil NOEL 16 µg/kg/dan. Slednji je bil uporabljen za izračun ADI s strani EMA.

4.1.2 Izračun MDO

Za izračun MDO smo se osredotočili na peroralno jemanje metilprednizolona v obliki tablet.

- STARA SMERNICA

Glavni kriterij stare smernice za določitev MDO pravi, da je največ ena tisočinka najnižjega terapevtskega odmerka lahko prisotna v največjem odmerku naslednjega izdelka. Odmerjanje metilprednizolon tablet je v dveh odmerkih, 4 mg/tableto in 16 mg/tableto (40). Najnižji odmerek metilprednizolona je 4 mg, zato je MDO po starih kriterijih (ene tisočinke odmerka) 0,004 mg oziroma 4 µg.

- NOVA SMERNICA

Izračun PDE lahko, glede na podatke iz tabele IV, opravimo z LOAEL. Le-ta je bil pridobljen iz študije ponavljajoče izpostavljenosti, kjer je bila študija, trajajoča 42 dni,

opravljena na psih. LOEL, ki je bil določen kot 167 µg/kg/dan, pomnožimo s telesno maso (50 kg) in zmnožek delimo z ustreznimi varnostnimi faktorji. Utemeljitev uporabe posameznega faktorja je prikazana v tabeli V.

$$PDE = \frac{(167 \mu g/kg/dan) \times 50 kg}{2 \times 10 \times 10 \times 5 \times 10} = 0,835 \mu g/dan \quad (Enačba 6)$$

Tabela V: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE za metilprednizolon iz LOAEL (27, 37, 38)

IZBRANI VARNOSTNI FAKTOR	UTEMELJITEV UPORABE VARNOSTNEGA FAKTORJA
F1 = 2	Ekstrapolacija psi → ljudje
F2 = 10	Konstanta
F3 = 10	Kratek čas trajanja študije (le 42 dni)
F4 = 5	Vpliv na nadledvično žlezo (srednje resen toksičen učinek)
F5 = 10	Uporaba LOAEL namesto NOAEL

Zaradi dostopnosti dokumenta EMA, v katerem je zapisan način določitve ADI, določitev PDE opravimo tudi z vrednostjo NOEL, ki jo je EMA izbrala za izračun ADI. V tem primeru gre za farmakološko študijo določanja aktivnosti tirozin aminotransferaze, kjer so določili NOEL 16 µg/kg/dan (37). Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev je prikazana v tabeli VI.

$$PDE = \frac{(16 \mu g/kg/dan) \times 50 kg}{5 \times 10 \times 10 \times 1 \times 1} = 1,6 \mu g/dan \quad (Enačba 7)$$

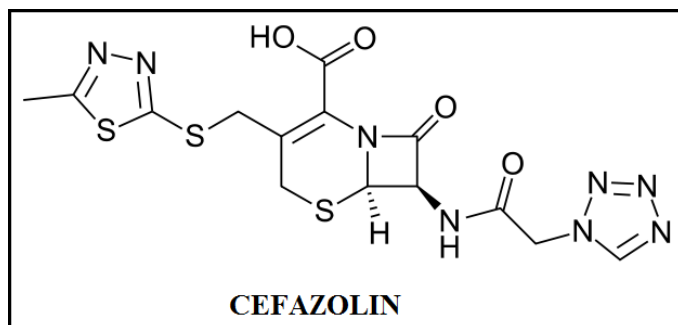
Tabela VI: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev pri izračunu PDE za metilprednizolon iz NOEL (27, 37)

IZBRANI VARNOSTNI FAKTOR	UTEMELJITEV UPORABE VARNOSTNEGA FAKTORJA
F1 = 5	Ekstrapolacija podgane → ljudje
F2 = 10	Konstanta

F3 = 10	Kratko trajajoča študija: živali so prejele le en odmerek in bile 5 ur po tem žrtvovane
F4 = 1	Študija ni pokazala toksičnih učinkov
F5 = 1	Uporaba NOEL v izračunu

4.2 CEFAZOLIN

Je betalaktamski antibiotik, ki s svojim delovanjem uniči širok spekter bakterij, ki v telesu povzročajo okužbe kože, pljuč, kosti, sklepov in sečil. Kot neželen učinek aplikacije učinkovine cefazolina se lahko pojavijo preobčutljivostne reakcije, ki se kažejo kot kožni izpuščaji in povečana telesna temperatura. Poznamo dva načina aplikacije cefazolina: intramuskularno v obliki injekcije in v veno v obliki infuzije ali injekcije (41). Struktura cefazolina je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Kemijska struktura cefazolina (povzeto po 42)

4.2.1 Toksikološke študije cefazolina

Glavni toksikološki učinki, ki so se pojavljali tekom toksikoloških študij, so bili znižanje telesne mase plodu, draženje na mestu injiciranja, povečanje slepega črevesa, diareja in oteklina trebušne votline (43, 44). Podatki, pridobljeni iz toksikoloških študij cefazolina, so prikazani v tabeli VII.

Tabela VII: Podatki iz toksikoloških študij cefazolina (43, 44)

ŠTUDIJA	PRESKUSNA ŽIVAL	NAČIN ODMERJANJA	TRAJANJE	NOEL
Študija	podgane	peroralno	90 dni	20 mg/kg/dan

ponavljajoče izpostavljenosti	psi	subkutano	3 mesece	250 mg/kg/dan
	psi	subkutano	6 mesecev	125 mg/kg/dan
Študija vpliva na razmnoževanje	podgane	peroralno	Ni podano	10 mg/kg/dan
Rakotvorna študija	Študije kancerogenosti niso bile izvedene.			
Genotoksična študija	Izvedene in vitro študije so bile negativne.			

4.2.2 Izračun MDO

Za izračun MDO smo se osredotočili na aplikacijo cefazolina v obliki intravenske injekcije.

- STARA SMERNICA

1 g praška za intravensko aplikacijo vsebuje zgolj ZU cefazolin, brez pomožnih snovi. Enkratni terapevtski odmerek cefazolina je za odrasle 0,5 - 1 g ZU, za otroke pa 0,25 – 0,5 g na kg telesne mase. Če odmerjanje prilagodimo na otroka, starega 3 leta, ki tehta 20 kg, je MDO po kriteriju ene tisočinke torej 0,5 mg oziroma 500 µg.

- NOVA SMERNICA

Izračun PDE opravimo z NOEL, ki je bil določen v študiji vpliva na razmnoževanje na podganah, saj je isti NOEL uporabila tudi EMA za določitev ADI. NOEL v vrednosti 10 mg/kg/dan pomnožimo s telesno maso (50 kg) in zmnožek delimo z ustreznimi varnostnimi faktorji. Utemeljitev uporabe posameznega varnostnega faktorja je prikazana v tabeli VIII.

$$\text{PDE} = \frac{(10 \text{ mg/kg/dan}) \times 50 \text{ kg}}{5 \times 10 \times 1 \times 1 \times 1} = 10 \text{ mg/dan} \quad (\text{Enačba 8})$$

Tabela VIII: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE za cefazolin (27, 43, 44)

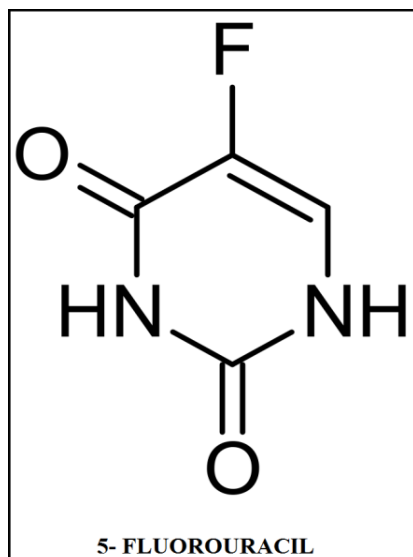
IZBRANI VARNOSTNI FAKTOR	UTEMELJITEV UPORABE VARNOSTNEGA FAKTORJA
F1 = 5	Ekstrapolacija podgane → ljudje
F2 = 10	Konstanta
F3 = 1	Dolgo trajajoča študija
F4 = 1	Toksičnost za mater, na plod učinkovina ni imela posebnega učinka
F5 = 1	Uporaba NOEL v izračunu

Ker je NOEL pridobljen iz študije, ki se je izvajala peroralno, bolniki pa bodo zdravilo prejeli intravensko, je potrebno v izračunu PDE upoštevati še dodatne korekcijske faktorje, ki opredelijo biološko razpoložljivost peroralne aplikacije. Določimo jih tako, da odstotek biološke razpoložljivosti za način aplikacije (v našem primeru peroralno) delimo s sto odstotno biološko uporabnostjo pri parenteralni aplikaciji (4). Biološka razpoložljivost po peroralni aplikaciji je pri podganah 5 % (43), zato je PDE:

$$\text{PDE} = 10 \frac{\text{mg}}{\text{dan}} \times \frac{5 \%}{100 \%} = 0,5 \text{ mg/dan} \quad (\text{Enačba 9})$$

4.3 5-FLUOROURACIL

5-fluorouracil je citostatik, ki se kot intravenska injekcija ali intravenska infuzija uporablja za zdravljenje raka ter dermalno za uničevanje bradavic. Njegovo zaviralno delovanje na delitev celic vpliva na tumorske celice in preprečuje njihovo rast. Ima ozko terapevtsko širino in deluje toksično. Pri jemanju zdravila z glavno zdravilno učinkovino 5-fluorouracil se lahko pojavijo neželeni učinki, kot na primer bolezen krvi in limfatičnega sistema, imunosupresija, presnovne in prehranske motnje, vrtoglavica, bolezen dihal in drugi (44, 46). Kemijska struktura 5-fluorouracila je prikazana na sliki 5.



Slika 5: Kemijska struktura 5–fluorouracila (povzeto po 47)

4.3.1 Toksikološke študije 5–fluorouracila

Toksikološki učinki, ki so se pojavljali pri aplikaciji 5–fluorouracila poskusnim živalim, so vpliv na kostni mozeg, poškodbe v gastrointestinalnem traktu, tumorji, atrofija tankega črevesja in toksičnost na plod (48, 49). Podatki, pridobljeni iz toksikoloških študij 5-fluorouracila, so prikazani v tabeli IX.

Tabela IX: Podatki iz toksikoloških študij 5–fluorouracila (48, 49)

ŠTUDIJA	PRESKUSNA ŽIVAL	NAČIN APLIKACIJE	TRAJANJE	NOEL
Študija ponavljajoče izpostavljenosti	psi	peroralno	5 tednov	175 mg/kg/dan (LOAEL)
Študija vpliva na razmnoževanje	miši	intraperitonealno	skozi celotno organogenezo	Od 10 do 40 mg/kg/dan (LOAEL)
	podgane	intraperitonealno	skozi celotno organogenezo	Od 12 do 37 mg/kg/dan (LOAEL)
	hrčki	intraperitonealno	skozi celotno organogenezo	Od 3 do 9 mg/kg/dan

				(LOAEL)
	opice	intramuskularno	skozi celotno organogenezo	40 mg/kg/dan
	miši	intraperitonealno	skozi celotno organogenezo	Od 25 do 50 mg/kg/dan (LOAEL)
Rakotvorna študija	miši	Peroralno (miši so pile vodo, v kateri je bil 5-fluorouracil)	2 leti	2,96 mg/kg/dan (TD ₅₀ *)
Genotoksična študija	Vse izvedene in vitro ter in vivo študije so pokazale pozitiven rezultat.			

*TD₅₀ je odmerek, ki povzroči tumor pri polovici poskusnih živali.

4.3.2 Izračun MDO

Za izračun MDO smo se osredotočili na aplikacijo 5-fluorouracila v obliki intravenske injekcije.

- STARA SMERNICA

Odmerjanje je odvisno od bolnikove telesne mase oziroma njegove telesne površine. Najnižji terapevtski odmerek za odmerjanje v obliki intravenske injekcije je 425 mg/m² telesne površine oziroma 10,6 mg/kg telesne mase bolnika. Če v izračunu upoštevamo maso bolnika 50 kg, kakor je upoštevana v kriteriju PDE, je torej enkratni odmerek 530 mg 5-fluorouracila. Z upoštevanjem kriterija ene tisočinke je MDO 5-fluorouracila 0,53 mg oziroma 530 µg.

- NOVA SMERNICA

Ker so toksikološke študije dokazale, da je 5-fluorouracil genotoksična učinkovina, je PDE v takih primerih najbolje določiti na podlagi NOEL iz rakotvornih študij ali na podlagi podatka o TD₅₀. Ta predstavlja odmerek, ki povzroči tumor pri polovici testiranih živali, saj je genotoksičnost pogosto povezana z rakotvornostjo.

Genotoksičnim učinkovinam sta EMA in ICH določila posebno smernico (31, 50), v kateri je podan izračun PDE na podlagi TD₅₀.

$$\text{PDE} = \frac{TD50}{50000} \times 50, \quad (\text{Enačba 10})$$

kjer 50.000 predstavlja polovico živali (med 1 in 100.000), ki jim bo odmerek zdravilne učinkovine povzročil nastanek raka, 50 pa predstavlja telesno maso odraslega človeka (50 kg).

PDE za 5-fluorouracil je tako:

$$\text{PDE} = \frac{2,96 \text{ mg/kg/dan}}{50000} \times 50 \text{ kg} = 2,96 \text{ } \mu\text{g/dan} \quad (\text{Enačba 11})$$

Ker smo tudi tukaj za izračun PDE uporabili podatek iz študije, ki se je izvajala peroralno, zdravilo pa se pri ljudeh aplicira intravensko, je potrebno v izračunu PDE upoštevati še dodatne korekcijske faktorje, ki opredelijo biološko razpoložljivost peroralne aplikacije. Določimo jih tako, da odstotek biološke razpoložljivosti za način aplikacije (v našem primeru peroralno) delimo s stodstotno biološko uporabnostjo pri parenteralni aplikaciji (4). Biološka razpoložljivost po peroralni aplikaciji je od 28% do 100 % (50), vzamemo najnižjo biološko razpoložljivost, zato je PDE:

$$\text{PDE} = 2,96 \frac{\mu\text{g}}{\text{dan}} \times \frac{28\%}{100\%} = 0,828 \text{ } \mu\text{g/dan} \quad (\text{Enačba 12})$$

4.4 UČINKOVINA X

Učinkovina X je antipsihotik, ki se uporablja za zdravljenje shizofrenije, tesnobe, depresije in drugih psihičnih motenj. Uporablja se v obliki tablet in peroralnih raztopin. Zaradi poslovne tajnosti smo učinkovino poimenovali učinkovina X. Literatura, iz katere smo podatke pridobili, pa je dostopna pri mentorju.

4.4.1 Toksikološke študije učinkovine X

Toksikološki učinki, ki so se tekom izvajanja toksikoloških študij na poskusnih živalih pokazali, so znižana telesna masa, zmanjšanje apetita, spremembe v hipofizi in mlečni žlezi. Učinkovina je imela vpliv na moške in ženske spolne organe ter na nadledvično žlezo. Podatki, pridobljeni iz toksikoloških študij učinkovine X, so prikazani v tabeli X.

Tabela X: Podatki iz toksikoloških študij učinkovine X

ŠTUDIJA	PRESKUSNA ŽIVAL	NAČIN ODMERJANJA	TRAJANJE	NOEL
Študija ponavljajoče izpostavljenosti	miši	peroralno	3 mesece	0,63 mg/kg/dan
		peroralno	2 tedna	10 mg/kg/dan
	podgane	peroralno	6 mesecev	0,63 mg/kg/dan
		peroralno	1 mesec	0,63 mg/kg/dan
	psi	peroralno	3 mesece	0,31 mg/kg/dan
Študija vpliva na razmnoževanje	podgane	peroralno	Skozi celotno organogenezo	0,16 mg/kg/dan (vpliv na plodnost)
	kunci	peroralno	Skozi celotno organogenezo	0,31 mg/kg/dan (toksični učinki za mater)
				1,25 mg/kg/dan (toksični učinki za plod)
Rakotvorna študija	miši	peroralno	18 mesecev	0,63 mg/kg/dan
	podgane	peroralno	24 mesecev	2,5 mg/kg/dan
Genotoksična študija	Izvedene in vitro ter in vivo študije so bile negativne.			

4.4.2 Izračun MDO

Za izračun MDO smo se osredotočili na aplikacijo učinkovine X v obliki tablet.

- STARA SMERNICA

Učinkovina je na voljo v tabletah v odmerkih od 1 do 4 mg. Najnižji enkratni odmerek je 0,25 mg, zato je MDO po stari smernici 0,25 µg.

- NOVA SMERNICA

V izvedenih toksikoloških študijah je aplikacija učinkovine pokazala resnejše in pomembnejše učinke v študijah rakotvornosti in študiji vpliva na razmnoževanje, zato

izračun PDE opravimo iz teh dveh študij. V študiji rakotvornosti, izvedene na miših, je bil NOEL določen kot 0,63 mg/kg/dan, zato je PDE:

$$\text{PDE} = \frac{(0,63 \text{ mg/kg/dan}) \times 50 \text{ kg}}{12 \times 10 \times 1 \times 5 \times 1} = 0,0525 \text{ mg/dan} \quad (\text{Enačba 13})$$

Tabela XI: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE iz rakotvorne študije izvedene na miših

IZBRANI VARNOSTNI FAKTOR	UTEMELJITEV UPORABE VARNOSTNEGA FAKTORJA
F1 = 12	Ekstrapolacija miši → ljudje
F2 = 10	Konstanta
F3 = 1	Dolgo trajajoča študija
F4 = 5	Srednje resni učinki (spremembe v histopatologiji)
F5 = 1	Uporaba NOEL v izračunu

NOEL je bil določen tudi v rakotvorni študiji na podganah (2,5 mg/kg/dan), zato je PDE:

$$\text{PDE} = \frac{(2,5 \text{ mg/kg/dan}) \times 50 \text{ kg}}{5 \times 10 \times 1 \times 5 \times 1} = 0,5 \text{ mg/dan} \quad (\text{Enačba 14})$$

Tabela XII: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE iz rakotvorne študije na podganah

IZBRANI VARNOSTNI FAKTOR	UTEMELJITEV UPORABE VARNOSTNEGA FAKTORJA
F1 = 5	Ekstrapolacija podgane → ljudje
F2 = 10	Konstanta
F3 = 1	Dolgotrajna študija
F4 = 5	Srednje resni učinki (spremembe v histopatologiji)
F5 = 1	Uporaba NOEL v izračunu

PDE pa lahko izračunamo tudi iz najnižjega NOEL, določenega iz študije vpliva na razmnoževanje, ki je znašal 0,16 mg/kg/dan.

$$\text{PDE} = \frac{(0,16 \text{ mg/kg/dan}) \times 50 \text{ kg}}{5 \times 10 \times 1 \times 5 \times 1} = 0,032 \text{ mg/dan} \quad (\text{Enačba 15})$$

Tabela XIII: Utemeljitev uporabe varnostnih faktorjev za izračun PDE iz študije vpliva na razmnoževanje

IZBRANI VARNOSTNI FAKTOR	UTEMELJITEV UPORABE VARNOSTNEGA FAKTORJA
F1 = 5	Ekstrapolacija podgane → ljudje
F2 = 10	Konstanta
F3 = 1	Dlje trajajoča študija
F4 = 5	Resnejši učinki na plodnost samic
F5 = 1	Uporaba NOEL v izračunu

4.4.3 Izračun meje dovoljenega ostanka na podlagi terapevtskega odmerka ZU ter meje dovoljenega ostanka na enoto površine

Učinkovini X smo s pomočjo *enačbe 1* določili dovoljen prenos v naslednji izdelek. Farmacevtski izdelek z ZU X predstavlja izdelek A, izdelek, ki se bo na isti opremi proizvajal po končani proizvodnji izdelka z ZU X (in po postopku čiščenja opreme), pa izdelek B. Maksimalni dnevni terapevtski odmerek izdelka B je 1000 mg, minimalni terapevtski odmerek izdelka A pa je 0,250 mg. Na skupni opremi smo izdelali 25 kg (oziroma 25.000.000 mg) veliko serijo izdelka B. Ob upoštevanju varnostnega faktorja z vrednostjo 1000 (peroralni izdelek) je MDO torej:

$$\text{MDO} = \frac{25.000.000 \text{ mg} \times 0,250 \text{ mg}}{1000 \text{ mg} \times 1000} = 6,25 \text{ mg} \quad (\text{Enačba 16})$$

Ker kapaciteta skupne opreme omogoča tudi izdelavo 50 kg (50.000.000 mg) velike serije izdelka B, je MDO v tem primeru:

$$\text{MDO} = \frac{50.000.000 \text{ mg} \times 0,250 \text{ mg}}{1000 \text{ mg} \times 1000} = 12,5 \text{ mg} \quad (\text{Enačba 17})$$

Ob določeni meji dovoljenega ostanka, ki se lahko prenese v naslednji farmacevtski izdelek, je možen tudi izračun meje dovoljenega ostanka na celotni površini opreme, ki je izdelkoma A in B skupna ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Slednjo določimo tako, da mejo dovoljenega ostanka, določeno v *enačbi 16* oziroma *enačbi 17*, delimo s površino skupne opreme, ki je v našem primeru 13 m^2 (130.000 cm^2). Proizvodnja obeh ZU namreč poteka na enak, večstopenjski način z granulacijo v hitrovrtečem mešalniku, sušenjem v vrtnično slojnim sušilniku, mešanjem z ostalimi ekstragranularnimi pomožnimi snovmi v mešalniku ter tabletiranjem.

Ker smo določili dve meji dovoljenega ostanka (za dve velikosti serije izdelka B), lahko določimo tudi dve meji dovoljenega ostanka na enoto površine.

$$\text{MDO/enoto površine} = \frac{6,25 \text{ mg}}{130.000 \text{ cm}^2} = 4,8 \times 10^{-5} \text{ mg}/\text{cm}^2 = 4,8 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2 \quad (\text{Enačba 18})$$

$$\text{MDO/enoto površine} = \frac{12,5 \text{ mg}}{130.000 \text{ cm}^2} = 9,6 \times 10^{-5} \text{ mg}/\text{cm}^2 = 9,6 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2 \quad (\text{Enačba 19})$$

Z izračunom predpostavljamo, da se ostanek enakomerno porazdeli po celotni površini opreme, zato vrednosti predstavljata mejo ostanka, ki je dovoljen na celotni površini skupne opreme. V kolikor pa nas zanima ostanek zdravilne učinkovine izdelka A (npr. zdravilna učinkovina X), ki se porazdeli na zgolj eni tableti izdelka B, je potrebno najprej ugotoviti, koliko tablet se pri proizvodnji ene serije izdelka izdelava. Z upoštevanjem povprečne mase tablete izdelka B (500 mg) in velikosti serije izdelka B (50 kg) smo izračunali, da se na ta način proizvede 100.000 tablet izdelka B, na katerih je, po izračunu iz *enačbe 17*, porazdeljenih 12,5 mg izdelka A. Na osnovi teh podatkov lahko ob predpostavki, da bi se ostanek zdravilne učinkovine X v celoti odstranil s površin opreme in homogeno kontaminiral sledečo proizvodno serijo izdelka B zaključimo, da bi teoretično vsaka tableta B, ki se izdelava v kampanji po izdelavi izdelka A, vsebovala 0,125 μg zdravilne učinkovine X.

5 RAZPRAVA

Za izračun mej smo uporabili štiri različne zdravilne učinkovine, ki predstavljajo izzive na področju validacije čiščenja proizvodne opreme in so tveganje za zdravje ljudi in za okolje.

Prva ZU, metilprednizolon, je kortikosteroidni hormon, za katere je značilna visoka učinkovitost pri nizkih odmerkih, poleg vsega pa čiščenje otežuje njegova slaba topnost v vodi. Odmerjanje metilprednizolona lahko poteka na dva načina, v obliki tablet ali injekcij. Tablete so na voljo v dveh različnih odmerkih metilprednizolona (4 in 16 mg), zato smo za izračun MDO po stari smernici izbrali najnižji terapevtski odmerek. Ugotovili smo, da je po čiščenju opreme, na kateri se proizvajajo tablete, ki vsebujejo 4 mg odmerek metilprednizolona, meja dovoljenega ostanka, ki se lahko prenese v naslednji izdelek, 4 µg. Ker smo se odločili, da se v nalogi osredotočimo na peroralno aplikacijo metilprednizolona, smo za izbiro študije, s katero bomo določili PDE, iskali enak način aplikacije. To je predstavljala študija ponavljajoče izpostavljenosti, opravljena na psih, ki je podala vrednost LOAEL 167 µg/kg/dan in na ta način smo določili PDE kot 0,835 µg/dan. Poleg slednje določitve PDE smo na svetovnem spletu našli dostopen tudi dokument EMA (37), v katerem je bil določen ADI. Ker je EMA izbrala najbolj relevantno študijo, s katero je določila sprejemljiv dnevni vnos za ljudi, smo NOEL iz izbrane študije s strani EMA uporabili pri naših nadaljnjih izračunih. Z NOEL 16 µg/kg/dan smo določili PDE 1,6 µg/dan, kar je podobno v primerjavi s prvim določenim PDE (0,835 µg/dan), saj so vrednosti podane v µg, ki predstavljajo zelo nizke količine. Če ADI (0,16 µg na kg telesne mase) prilagodimo na enako telesno maso človeka, kakor je uporabljena pri izračunu PDE (50 kg) dobimo vrednost 8 µg/dan, kar je zopet primerljivo s PDE, določenim z istim NOEL, ki znaša 1,6 µg/dan.

Druga ZU, cefazolin, je cefalosporin, betalaktamski antibiotik, katerega odmerjanje poteka večkrat na dan v visokih odmerkih, da na ta način hitreje uničimo škodljive bakterije, ki so povzročile okužbo. Enkratni odmerek cefazolina je v razponu med 250 mg in 1000 mg. Ob upoštevanju telesne mase smo določili MDO po stari smernici 0,5 mg oziroma 500 µg. Tudi v tem primeru smo za izračun PDE imeli na voljo EMA dokument (43), v katerem je bil določen ADI (5 mg/osebo). NOEL je bil določen v študiji vpliva na razmnoževanje, kjer so podgane peroralno prejemale odmerke cefazolina. PDE, z uporabo omenjenega NOEL, smo določili kot 10 mg/dan, je ponovno primerljiv z ADI, določenim z istim

NOEL. Upoštevati je potrebno dejstvo, da je ADI opredeljen le za peroralen vnos učinkovine, medtem ko smo v nalogi za določitev PDE opravili preračun z uporabo korekcijskega faktorja, saj se učinkovina pri ljudeh aplicira parenteralno, in dobili vrednost 0,5 mg/dan. Brez upoštevanja korekcijskega faktorja bi PDE cefazolina dal mejo 10 mg/dan, kar je ob upoštevanju možnosti za sprožitev preobčutljivostne reakcije pri občutljivejšem posamezniku (17, 18) višje kot smo pričakovali. Podatkov o mejni koncentraciji oziroma količini cefazolina s katero mora posameznik priti v stik, da se pri njem sproži preobčutljivostna reakcija, ni. Študija, v kateri bi določevali mejo, ki je za občutljivega posameznika varna, z aplikacijo različnih koncentracij subterapevtskih odmerkov ZU preobčutljivemu posamezniku, namreč ne bi bila etična. Zato kljub relativno visokim vrednostim PDE priporočamo, da s čiščenjem poskrbimo za čim nižje ostanke na opremi oziroma za proizvodnjo betalaktamskih farmacevtskih izdelkov uporabimo namensko opremo in prostore ter na ta način poskrbimo, da do možnosti kontaminacije drugih izdelkov in s tem do pojava preobčutljivostnih reakcij pri občutljivih posameznikih sploh ne pride. Tudi DPP, zaradi nejasnosti okoli varnosti ostankov po čiščenju z vidika potenciala senzibilizacije posameznikov, zahteva proizvodnjo betalaktamskih izdelkov na ločeni opremi.

Tretja učinkovina, 5-fluorouracil, zavira delitev celic in na ta način deluje protitumorno. Ker odmerjanje s pomočjo intravenske injekcije poteka odvisno od telesne mase bolnika, smo maso prilagodili na 50 kg, saj enako telesno maso upoštevamo tudi v izračunu PDE in je na ta način primerjava končnih rezultatov lažja. Odmerek 530 mg je z upoštevanjem kriterija ene tisočinke minimalnega terapevtskega odmerka dal MDO 530 µg. Za izračun po novi smernici smo uporabili podatke iz rakotvorne študije, saj je preskušanje 5-fluorouracila v genotoksični študiji dalo pozitiven rezultat. V kolikor bi imeli v rakotvorni študiji podan NOEL, bi ga lahko uporabili za izračun PDE, vendar smo zaradi odsotnosti slednjega uporabili TD_{50} , kakor je določeno v smernici za genotoksične nečistote (50). V primeru odsotnosti podatkov iz rakotvornih študij bi določitev PDE potekala v skladu s smernico EMA (31). V njej je zapisano, da se za tiste genotoksične spojine, katerim se varna meja zaradi pomanjkljivosti podatkov ne more podati, določi meja 1,5 µg/osebo/dan za genotoksične nečistote in 0,15 µg/osebo/dan za ostanke genotoksičnih zdravilnih učinkovin. Izbrane vrednosti predstavljajo mejo izpostavljenosti genotoksičnim nečistotam oziroma zdravilnim učinkovinam v povezavi s teoretičnim tveganjem za raka: za

genotoksične nečistote je to tveganje opredeljeno kot en primer raka na 100.000 ljudi, pri zdravilnih učinkovinah pa kot en primer raka na 1.000.000 ljudi. Zakaj je meja za genotoksične nečistote višja od genotoksičnih zdravilnih učinkovin, v smernici ni jasno obrazloženo.

Tudi v primeru 5-fluorouracila smo za izračun intravenskega PDE potrebovali množenje dobljenega PDE s korekcijskim faktorjem, saj je bil TD_{50} določen iz rakotvorne študije, kjer so živali prejemale substanco peroralno. Biološka razpoložljivost je znašala med 28 % in 100 %, zato smo za preračun uporabili najnižjo vrednost biološke razpoložljivosti. Rezultat PDE, ob upoštevanju peroralne biološke razpoložljivosti, je bil 0,828 $\mu\text{g}/\text{dan}$.

Zadnja ZU, učinkovina X, je antipsihotik in predstavlja izziv pri čiščenju opreme zaradi slabe topnosti v vodi. Zaradi visoke učinkovitosti učinkovine le-to odmerjamo v nizkih odmerkih. Najnižji enkratni terapevtski odmerek učinkovine X je 0,25 mg/dan, zato je MDO po stari smernici 0,25 $\mu\text{g}/\text{dan}$. Izračun PDE smo opravili na osnovi podatkov iz študije vpliva na razmnoževanje in iz študije rakotvornosti, saj so bili toksični učinki v teh dveh študijah najbolj izraziti. Najnižji PDE (0,032 mg/dan oziroma 32 $\mu\text{g}/\text{dan}$) smo določili pri študiji vpliva na razmnoževanje, kjer so bili toksični učinki tudi najbolj izraženi in je bil NOEL, določen v študiji, najnižji. MDO po novi smernici za učinkovino X je 32 $\mu\text{g}/\text{dan}$.

Dodatno smo za ZU X izvedli še teoretični izračun, kjer smo določili MDO na podlagi terapevtskega odmerka ZU in MDO na enoto površine, ki je izdelku A in B skupna. Ugotovili smo, da se pri izdelavi 50 kg serije izdelka B največ 12,5 mg izdelka A lahko porazdeli na 100.000 tablet izdelka B, kar pomeni ostanek 0,125 μg izdelka A na eno tableto izdelka B. Ob upoštevanju minimalnega terapevtskega odmerka ZU X, ki se nahaja v izdelku A, 0,250 mg, je ostanek, ki smo ga določili z izračunom, zanemarljivo majhen in trdimo lahko, da je meja ustrezno zastavljena. Dovoljeni ostanki ZU X po čiščenju proizvodne opreme po izdelavi serije tablet z omenjeno ZU so bili preverjeni z ustreznim postopkom odvzema vzorcev s kritičnih mest opreme in z njihovo analizo. Rezultati so pokazali, da so ostanki ZU X po zaključenem postopku čiščenja bistveno pod dovoljeno mejo oziroma celo pod mejo določanja. S tem smo potrdili ustreznost postopka čiščenja. Podatki analize vzorcev so zaradi poslovne tajnosti na voljo le pri mentorju.

Ker je v toksikoloških študijah določene ZU pogosto opravljenih več študij, se pri izbiri podatkov za izračun PDE soočamo s težavo, katero študijo izbrati. Izbiro študije določimo na podlagi izrazitosti in resnosti toksičnega učinka na poskusnih živalih in na podlagi aplikacije odmerka v študiji. Kadar je le možno izberemo tako študijo, v kateri so poskusne živali odmerke prejemale na enak način, kot bodo zdravilo prejemali bolniki. Dodatno težavo predstavlja tudi dostopnost podatkov iz toksikoloških študij. V študijah sta pogosto namesto NOEL ali LOEL določena NOAEL ali LOAEL. Čeprav sta zadnja dva predvidena za izračun ADE po smernici ISPE, toksikologi pri določevanju PDE temu ne posvečajo toliko pozornosti in izračun izdelajo s tistimi podatki, ki so za zdravilno učinkovino na voljo.

Poleg težav s pomanjkljivostjo podatkov iz študij dodatno težavo pri izračunu PDE predstavljajo varnostni faktorji. Izračun PDE je zastavljen subjektivno, saj pri opredelitvi varnostnih faktorjev, ki jih potrebujemo za izračun, naletimo še na nekaj težav. Faktorja F1 in F2 ne povzročata težav, saj je prvi odvisen od vrste živali, ki je bila uporabljena pri študiji, drugi pa je konstanta. F3 je faktor, ki opredeljuje trajanje študije, kar načeloma ni težko ovrednotiti, vendar podatki o trajanju študije pogosto niso jasno napisani. Če v trajanje nismo prepričani, je najbolje, da predvidevamo najhujši scenarij in F3 opredelimo kot vrednost 10 (kratkotrajne študije), čeprav se s tem vrednost PDE zniža in je MDO strožji, kot je to potrebno. Največ subjektivnosti je v faktorju F4, ki določa resnost toksičnih učinkov v študiji. Vrednost 1 pripada blažjim učinkom, vrednost 5 resnejšim učinkom, vrednost 10 pa resnim, nevarnim toksičnim učinkom. Pogosto se je težko opredeliti kakšno resnost nek učinek izkazuje, včasih pa je vrsta učinkov pomanjkljivo opisana in je odločitev o izbiri vrednosti F4 zelo težka. V študijah se lahko pojavijo tudi vrstno specifični toksični učinki, ki morajo biti pri podajanju rezultatov toksikoloških študij jasno opredeljeni. Če se za resnost učinkov ne moremo odločiti, za faktor F4 najpogosteje izberemo vrednost 5, ki opredeljuje srednje resne toksične učinke.

5.1 PRIMERJAVA MEJE DOVOLJENEGA OSTANKA, DOLOČENE PO STARI IN NOVI SMERNICI, ZA IZBRANE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Meje, določene po kriteriju ene tisočinke minimalnega terapevtskega odmerka, so se v treh primerih izkazale za blažje določene meje, saj so vrednosti dovoljenih ostankov od nekaj μg do več sto μg . Izračun MDO po novi smernici je v dveh primerih pokazal strožje (nižje) meje, primeru cefazolina se meja ni spremenila, pri zadnji ZU pa je meja, določena po starem kriteriju, strožja od meje, določene po novem kriteriju. Pri metilprednizolonu se nova meja ne razlikuje bistveno od predhodno določenega MDO, medtem ko je pri 5-fluorouracilu razlika zelo velika. PDE 5-fluorouracila je le malo višji od meje TTC, ki bi mu bila določena, če rakotvorne študije ne bi bile dostopne. Rezultati izračunov MDO po stari in novi smernici so prikazani v tabeli XIV.

Tabela XIV: Primerjava MDO za izbrane zdravilne učinkovine po stari in novi smernici

	CEFAZOLIN	5-FLUOROURACIL	METILPREDNIZOLON	UČINKOVINA X
1/1000	500 μg	530 μg	4 μg	0,25 μg
PDE	500 $\mu\text{g/dan}$	0,828 $\mu\text{g/dan}$	1,6 $\mu\text{g/dan}$	32 $\mu\text{g/dan}$

MDO po novi smernici je za tri zdravilne učinkovine izredno nizka. Če jih razvrstimo po lestvici od zdravilne učinkovine z najvišjim MDO do najnižje, si sledijo takole:

- Stara smernica: 5-fluorouracil > cefazolin > metilprednizolon > učinkovina X
- Nova smernica: cefazolin > učinkovina X > metilprednizolon > 5-fluorouracil.

Vrstni red se je glede na staro in novo smernico spremenil. 5-fluorouracil, ki je po stari smernici imel najvišji MDO, je po novi smernici ZU z najstrožjo mejo. Odmerjanje 5-fluorouracila je odvisno od telesne mase bolnika, zato je lahko ob upoštevanju drugačne telesne mase MDO višji ali nižji. PDE za 5-fluorouracil smo določili kot 0,828 $\mu\text{g/dan}$, kar je ob upoštevanju genotoksičnega potenciala učinkovine ter dejstva, da se 5-fluorouracil uporablja za zdravljenje hudih bolezni, pri katerih je potrebna dolgotrajna terapija z navedeno ZU, pričakovan rezultat. Glede na visoke odmerke cefazolina, ki se aplicirajo trikrat do štirikrat na dan, se je slednji pričakovano uvrstil na vrh. Razlike med mejo starega in novega kriterija ni, čeprav smo jo zaradi možnosti preobčutljivostnih reakcij pričakovali. Metilprednizolonu se je vrednost MDO najmanj spremenila, saj je bila že po

kriteriju ene tisočinke zelo nizka. Ker je metilprednizolon steroidna ZU, ki je učinkovita že v nizkih odmerkih, je meja smiselno zastavljena. Učinkovina X pa predstavlja primer, za katerega je meja dovoljenega ostanka po stari smernici višja od nove. Razlog za to je v nizkem odmerjanju ZU pri zdravljenju, zato je kriterij nove smernice pokazal nižjo mejo.

5.2 PRIMERJAVA STARE IN NOVE SMERNICE ZA VALIDACIJO ČIŠČENJA

Glavne spremembe med staro in novo smernico smo zaradi boljšega pregleda sistematično prikazali v tabeli XV.

Tabela XV: Primerjava stare in nove smernice za določitev MDO (4, 11, 24, 52)

	STARA SMERNICA	NOVA SMERNICA
DOLOČEVANJE MEJ	Na podlagi nespecifičnih in neselektivnih kriterijev, ki vse substance obravnava enako.	Oprelitev meje na podlagi tveganja, ki ga potencialen kontaminant predstavlja za zdravje ljudi in varnost okolja, z upoštevanjem vseh podatkov iz predkliničnih in kliničnih študij. Za določevanje ostankov po validaciji čiščenja je relevanten le še podatek o PDE, kriterija 1/1000 odmerka in 10 ppm sta opuščena.
KRITERIJ ZA DOLOČITEV MEJE DOVOLJENEGA OSTANKA	• 1/1000 odmerka • 10 ppm • Vizualno čista oprema	• PDE (EMA) • ADE (ISPE)
MEJA DOVOLJENEGA	Najnižji izmed prvih dveh	Najnižji izmed določenih

OSTANKA	kriterijev, ki hkrati daje tudi vizualno čisto opremo.	PDE oziroma ADE.
VARNOSTNI FAKTORJI	Opredeljeni glede na način uporabe zdravila (peroralno, paranteralno, topikalno).	Varnostni faktorji so določeni glede na toksikološke podatke (trajanje študije, resnost učinkov).
KDO LAHKO DOLOČI MEJO	Določi jo lahko kdorkoli, ki ima podatke o terapevtskem odmerku zdravila.	Določi jo za to usposobljen toksikolog.
OVREDNOTENJE MEJ	Na ta način določene meje so pogosto prestroge in jih proizvajalci težko dosežejo.	Meje so specifične za določeno substanc in jih zato lahko vrednotimo kot varne.
ŠTEVILO PONOVIČNIH ČIŠČENJ ZA USTREZNO VALIDACIJO	Vsaj trikrat.	Tolikokrat, kolikor je potrebno (odvisno od ocene tveganja)
UPORABA NAMENSKE OPREME	Dovoljena za antibiotike, hormone, citoksične in druge visoko učinkovite substance.	Dovoljena, ko mej zaradi pomanjkanja podatkov ne moremo izračunati, ko določene meje ne moremo doseči ali ko ZU predstavlja tveganje, ki ga ne moremo nadzirati.
GENOTOKSIČNE SNOVI	Namenska oprema za genotoksične ZU	Koncept TTC in posebna smernica (EMA), ki opredeljuje meje: • 0,15 µg/osebo/dan za genotoksične zdravilne učinkovine

		• 1,5 µg/osebo/dan za genotoksične nečistote, v kolikor varne meje za genotoksične zdravilne učinkovine ali nečistote ne moremo doseči.
--	--	---

5.3 DRUGI NAČINI PREPREČEVANJA NAVZKRIŽNE KONTAMINACIJE

Poleg učinkovitega čiščenja proizvodne opreme in prostorov je za preprečevanje navzkrižne kontaminacije pomembno tudi premišljeno načrtovanje prostorov oziroma postavitev opreme v prostoru ter ustrezno kroženje zraka. Visoko učinkovite substance in izdelke (hormoni, antibiotiki, citostatiki in drugi) je potrebno izdelovati ločeno od prostorov, kjer se proizvajajo drugi izdelki. Prostor za proizvodnjo mora biti načrtovan tako, da sta odsesavanje in vsesavanje zraka ločena drug od drugega in v prostor skozi filter vstopa čist zrak, brez delcev, onemogočen pa je tudi vstop različnim insektom. V prostoru je potrebno izvajati kontrolo temperature in vlage, ki mora biti prilagojena izdelku, ki se proizvaja v določenem prostoru. Zaradi pogoste uporabe dodatnega kriterija vizualno čisto je potrebno v prostoru zagotoviti ustrezno osvetljenost. Vmesnim korakom tehtanja, mešanja ali pakiranja, kjer je stopnja prašenja višja, namenimo ločene prostore. Ločeni od prostora proizvodnje pa morajo biti tudi ostali prostori, na primer garderobe, čajna kuhinja in toaleta. Zaščitna oblačila, uporabljena pri proizvodnji, je potrebno shranjevati znotraj območja, kjer se proizvajajo izdelki, in na ta način zmanjšati prenos učinkovine in pomožnih snovi zunaj proizvodnje (30).

Na prenos ostankov v naslednji izdelek pa vpliva tudi izbira proizvodne opreme, kar je zapisano tudi v obnovljenem poglavju 5 DPP (53). Slednja mora omogočati enostavno čiščenje in ne sme predstavljati možnosti za nalaganje ostankov, zato je najboljša gladka površina opreme, ki omogoča odtekanje tekočin, brez nepotrebnih razpok ali vmesnih prostorov (29).

6 ZAKLJUČEK

Kriteriji, ki sta jih postavila Fourman in Mullen in so bili neuradno sprejeti s strani FDA, so bili nezahtevni in določil jih je lahko vsak, ki je imel podatke o terapevtskem odmerku zdravila. S predlaganimi kriteriji se niso strinjali vsi strokovnjaki, saj se pri izračunu meje niso upoštevali vsi podatki o ZU, temveč je določitev meje za vse ZU potekala enako, varnostni faktorji, uporabljeni pri izračunih pa niso bili toksikološko utemeljeni. Nova smernica za validacijo čiščenja, ki jo je leta 2012 predstavila EMA in je trenutno še v potrditvi, je predstavila PDE kot nov kriterij za določitev meje dovoljenega ostanka po čiščenju proizvodne opreme. S tem je prinesla v farmacevtsko industrijo nov pogled na ostanke pri čiščenju, saj so kriteriji za določitev meje prešli na toksikološko ovrednotene kriterije, ki vsako zdravilno učinkovino ali nečistoto obravnava posamično.

Pri določevanju MDO na osnovi kriterija ene tisočinke najnižjega terapevtskega odmerka zdravilne učinkovine v maksimalnem terapevtskem odmerku naslednjega izdelka, nismo naleteli na bistvene težave, saj so podatki o odmerjanju zdravil javno dostopni na svetovnem spletu. Težave nam je povzročala določitev meje na podlagi PDE. Odločitev o izbiri študije, pomanjkljivi podatki iz toksikoloških študij, določeni NOAEL namesto NOEL in izbira varnostnih faktorjev so težave, ki so nas spremljale tekom določitve na podlagi toksikološkega kriterija.

Na primeru štirih izbranih ZU, ki v farmacevtski industriji predstavljajo izziv zaradi tveganja, ki ga prinašajo, ter zaradi težav s topnostjo, smo za dve ZU, 5-fluorouracil in metilprednizolon, ugotovili, da nova smernica prinaša strožje meje dovoljenega ostanka, kot so bile določene pred tem. Cefazolinu, ki se za zdravljenje bakterijskih okužb odmerja v visokih odmerkih, se meja ni spremenila, čeprav smo to pričakovali zaradi možnosti reakcij preobčutljivosti. Za zadnjo ZU, ki spada v skupino antipsihotikov, pa je bila meja, določena na podlagi PDE višja od prvotno določene. Razlog za to je v postopnem povečevanju odmerkov pri zdravljenju z antipsihotiki, saj gre za ZU, ki so visoko učinkovite.

Meje, ki smo jih določili vsem štirim ZU, so izredno nizke in predstavljajo izziv pri načrtovanju čiščenja, saj je potrebno temeljito premisliti in natančno izbrati pogoje čiščenja ter sredstva za čiščenje opreme.

Specifičen in toksikološko naravnan kriterij PDE je dobrodošla sprememba v validaciji čiščenja, kljub vsemu pa je poleg slednjega pred uporabo vedno potreben vizualen pregled opreme, s katerim se prepričamo, da ni vidnih ostankov na površini proizvodne opreme. Kriterija ene tisočinke minimalnega terapevtskega odmerka in 10 ppm je potrebno opustiti in se pri določevanju mej dovoljenega ostanka po čiščenju osredotočiti na nov kriterij, PDE.

7 LITERATURA

1. Lakshamana Prabu S, Suriyaprakash T. N. K: Cleaning validation and its importance in Pharmaceutical Industry. Pharma times 2010; Vol 42(7): 21-25
2. Nash A. R, Wachter H. A: Pharmaceutical Process Validation, Marcel Dekker, New York, 2003: 500-541
3. Walsh A: Cleaning Validation for the 21st Century: Acceptance Limits for Active Pharmaceutical Ingredients (APIs): Part 1. Pharmaceutical Engineering 2011; 32(4): 74-83
4. European Medicines Agency (EMA), Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities (draft) (2012). Dostopano na (10. 9. 2014):
http://ec.europa.eu/health/files/gmp/2013_gmp_pc_en.pdf
5. Walsh A: Cleaning Validation for the 21st Century: Acceptance Limits for Active Pharmaceutical Ingredients (APIs): Part 2. Pharmaceutical Engineering 2011; 31(6): 44-49
6. Kumar V. S, Sanjeev T, Sharma P. K: Overview of cleaning validation in pharmaceutical manufacturing unit. International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences 2012 Vol 2(2): 154-164
7. Code of Federal Regulations: Title 21- Food and Drug Administration, Part 211.67. Dostopano na (14. 9. 2014):
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=211.67>
8. Hall W. E: Cleaning in the Pharmaceutical Industry-Past, Present, and Future. Journal of Validation Technology 2007; 14(1): 42-50
9. Harder S: The Validation of Cleaning Procedures. Pharmaceutical Technology 1984; 8(5): 29-34
10. U.S. Food and Drug Administration (FDA): Guide to Inspection of Validation of Cleaning Processes (1993). Dostopano na (26. 8. 2014) :
<http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074922.htm>
11. Walsh A, Ovais M, Altmann T, Sargent V. E: Cleaning Validation for the 21st Century: Acceptance Limits for Cleaning Agents. Pharmaceutical Engineering 2013; Vol 33(6): 1-11

12. U.S. Food and Drug Administration (FDA): Regulatory Procedures Manual (Warning Letters). Dostopano na (10. 10. 2014):
<http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/RegulatoryProceduresManual/ucm176870.htm>
13. Apic Pharmaceutical Ingredients Committee (APIC): Guidance on aspects of cleaning validation in active pharmaceutical ingredients plants (2014). Dostopano na (1. 9. 2014):
<http://apic.cefic.org/pub/pub-cleaning-validation.pdf>
14. ICH, Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients (2000). Dostopano na (7. 9. 2014) :
<http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/3-1-18.PDF>
15. Murthy D. N, Chitra K: A review article on cleaning validation. International journal of pharmaceutical sciences and research 2013; Vol. 4(9): 3317-3327
16. AskaboutValidation: Cleaning In Place (CIP) Vs Cleaning Out of Place (COP). Dostopano na (28. 8. 2014): <http://www.askaboutvalidation.com/1132-cleaning-in-place-cip-vs-cleaning-out-of-place-cop>
17. FDA: Non-Penicillin Beta-Lactam Drugs: A CGMP Framework for Preventing Cross-Contamination (Guidance for Industry) (April 2013). Dostopano na (15. 9. 2014) :
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM246958.pdf>
18. Castells M: Rapid Desensitization for Hypersensitivity Reactions to Medications. Dostopano na (15. 9. 2014):
http://www.brighamandwomens.org/Departments_and_Services/medicine/services/rheumatology/Services/Allergy%20&%20Immunology/RapidDesens.pdf
19. Heidel D. S: Pharmaceutical Industry`s Approach to Safe Handling of New Molecular Entities. Dostopano na (28. 8. 2014):
http://nano.anl.gov/events/workshops/enm/presentations/W3_Heidel.pdf
20. Lodhi B, Padamwar P, Patel A: Cleaning validation for pharmaceuticals, biopharmaceuticals, cosmetic and nutraceuticals industries. Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences 2014; 1(1): 27-38
21. Pluta P. L: Laboratory Studies in Cleaning Validation. Journal of Validation Technology 2007; 13(4): 280-285
22. Zaheer Z, Zainuddin R: Analytical Methods for Cleaning Validation. Scholars Research Library 2011; 3(6): 232-239

23. Morales Sanchez J. A: Equipment Cleaning Validation Within a Multi-Product Manufacturing Facility. BioPharm International 2006; 19(2): 38-45
24. Fourman G. L, Mullen V. M: Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations. Pharmaceutical Technology 1993: 54-60
25. Active Pharmaceutical Ingredients Committee (APIC): Guidance on Aspects of Cleaning Validation in Active Pharmaceutical Ingredient Plants (2000). Dostopano na (1. 9. 2014): <http://apic.cefic.org/pub/pub-cleaning-validation.pdf>
26. Pharmaceutical Validation: A Critique of Cleaning Validation Issues in ISPE's RiskMaPP (2010). Dostopano na (17. 9. 2014):
<http://pharmaceuticalvalidation.blogspot.com/2010/12/critique-of-cleaning-validation-issues.html>
27. ICH, Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R5), 2011. Dostopano na: (13.9.2014):
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Step4/Q3C_R5_Step4.pdf
28. Gorsky I: How Clean is Clean in Drug Manufacturing?. American Pharmaceutical Review 2014: 16-19
29. Challener C: Managing Cleaning Validation in Multi-Product Biologics Facilities. BioPharm International 2014; 27(9): 44-45
30. EU GMP, Chapter 3: Premises and Equipment (Bruselj, Belgija). Dostopano na (14. 9. 2014):
http://www.gmp-compliance.org/enews_3518_Revision%20of%20the%20EU%20GMP%20Guide%3A%20EU%20Commission%20Publishes%20Proposals%20for%20Chapters%203,%205,%206%20and%208.html
31. European Medicines Agency (EMA): Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. Dostopano na (4. 9. 2014):
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf
32. Kroes R, Kleiner J, Renwick A: The Threshold of Toxicological Concern Concept in Risk Assessment. Toxicological Sciences 2005; 86(2): 226-230

33. Delaney E. J: An impact analysis of the application of the threshold of toxicological concern concept to pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2007; 49: 107-124
34. Gatnik F M: Ne testne metode pri zagotavljanju kemijske varnosti. Nacionalni inštitut za javno zdravje 2012. Dostopano na: (14. 9 2014):
http://www.ivz.si/Mp.aspx?ni=124&pi=5&_5_Filename=5581.pdf&_5_MediaId=5581&_5_AutoResize=false&pl=124-5.3.
35. ICH, Impurities: Guideline for Residual Solvents, PDE for Cumene, 2010. Dostopano na (13. 9. 2014) : <http://gmp.pharmout.net/files/WC500094543-2010-06-00.pdf>
36. Ladola A, Stadler J: *Pharmaceutical toxicology in practice: a guide for non-clinical development*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2011: 97-98, 109-138
37. EMA, Committee for veterinary medicinal products: Methylprednisolon Summary report (1). Dostopano na (13. 10. 2014):
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_Report/2009/11/WC500015079.pdf
38. Pfizer: Material Safety Data Sheet. Dostopano na (13. 10. 2014):
http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/METHYLPREDNISOLON_E%20TABLETS.pdf
39. Wikipedia: Methylprednisolone. Dostopano na (13.10. 2014):
<http://en.wikipedia.org/wiki/Methylprednisolone>
40. Navodilo za uporabo zdravila Medrol. Dostopano na (13. 10. 2014):
<http://www.zdravila.net/navodilo.php?dir=pdf&navodilo=a-003341.pdf>
41. Navodilo za uporabo zdravila Altazolin. Dostopano na (13. 10. 2014):
<http://www.altamedics.com/documents/altamedics/produkti/Altazolin%20PIL%20SI-februar%202013.pdf>
42. Wikipedia: Cefazolin. Dostopano na (13. 10. 2014):
<http://en.wikipedia.org/wiki/Cefazolin>
43. EMA, Committee for veterinary medicinal products: Cefazolin Summary report . Dostopano na (13. 10. 2014):
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_Report/2009/11/WC500011824.pdf
44. Pfizer: Material Safety Data Sheet. Dostopano na (13. 10. 2014):
<http://research.fiu.edu/facilities/acf/documents/Cefazolin.pdf>

45. Navodilo za uporabo zdravila 5-Fluorouracil Ebewe. Dostopano na (13.10. 2014):
<http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-009298.pdf&dir=smpc>
46. Jalk R. S., Grogan K. A., Chang T. J.: Topical 5% 5-fluorouracil cream in the treatment of plantar warts: a prospective, randomized, and controlled clinical study. Journal of drugs in dermatology 2006; 5(5): 418-424
47. Wikipedia: Fluorouracil. Dostopano na (13. 10. 2014):
<http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorouracil>
48. Pfizer: Material Safety Data Sheet. Dostopano na (13.10. 2014):
http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/FLUOROURACIL%20INJECTION.pdf
49. The Carcinogenic Potency Project: 5-Fluorouracil. Dostopano na (13. 10. 2014):
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/chempages/5-FLUOROURACIL.html>
50. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagens) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Cancerogenic Risk M7, 2014. Dostopano na (13.10. 2014):
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Step_4.pdf
51. Cancer Care Ontario: Fluorouracil. Dostopano na (13. 10. 2014):
https://www.cancercare.on.ca/CCO_DrugFormulary/Pages/DfPdfContent.aspx?itemId=93897
52. EU GMP Guide-Annex 15 Qualification & Validation draft released, 2014. Dostopano na (13.9.2014):
http://www.pharmout.net/downloads/mkt_wpr229_EU_GMP_Annex_15_Qualification_and_Validation.pdf
53. EU GMP, Chapter 5: Production (Bruselj, Belgija). Dostopano na (14. 9. 2014):
http://www.gmp-compliance.org/enews_3518_Revision%20of%20the%20EU%20GMP%20Guide%3A%20EU%20Commission%20Publishes%20Proposals%20for%20Chapters%203,%205,%206%20and%208.html