

1 – ФГБОУ ВО
«Московский
государственный
университет
им. М.В. Ломоносова»,
факультет
фундаментальной
медицины, кафедра
биохимии и молекулярной
медицины, 119192, Россия,
г. Москва,
Ломоносовский проспект,
31, к. 5

1 – Department of
Biochemistry and Molecular
Medicine, Faculty of
Medicine, M.V. Lomonosov
Moscow State University,
31/5, Lomonosovsky av.,
Moscow, 119192, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: e-semina@yandex.ru
Тел.: 8 (495) 932 99 24

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСТОТЫ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИИ

Е.В. Семина^{1*}, П.С. Климович¹, А.О. Долинкин¹, Е.В. Парфенова¹,
К.А. Рубина¹

Резюме. На сегодняшний день для лечения ишемий перспективными являются технологии, стимулирующие рост новых кровеносных сосудов и их стабилизацию, а также регулирующие траекторию роста сосудов. Данные технологии представляют собой терапевтический ангиогенез и являются основополагающими в бурно развивающейся регенеративной медицине. В данной работе описана разработка и валидация методики определения специфических примесей (чистоты) генотерапевтического препарата методом электрофореза в агарозном геле с последующей денситометрией электрофореграммы. Данный препарат разработан для лечения ишемии нижних конечностей и является комбинированным препаратом, содержащим смесь плазмидных ДНК, кодирующих ген фактора роста гепатоцитов и ген ангиопоэтина-1.

Ключевые слова: регенеративная медицина, регенерация, генотерапевтический препарат, генная терапия, валидация методики, рестрикция, электрофорез.

FEATURES OF QUALITY ASSESSMENT AND STANDARDIZATION PROSPECTS OF FATTY OILS AND OIL EXTRACTS FOR PHARMACEUTICAL PURPOSES (REVIEW)

E.V. Semina^{1*}, P.S. Klimovich¹, A.O. Dolinkin¹, E.V. Parfenova¹, K.A. Rubina¹

Abstract. Today technologies stimulating growth and stabilization of new blood vessel, regulating trajectory of vascular growth are promising for the treatment of ischemia. These technologies represent a therapeutic angiogenesis. Its are essential in the rapidly developing regenerative medicine. In the present work we describe the development and validation methods for determining the specific impurities (purity) gene therapeutic drug using the electrophoresis method in agarose gel followed by densitometry of electrophoretogram. This drug is designed for the treatment of lower limb ischemia. This drug is a combination preparation containing a mixture of DNA plasmid encoding the gene of hepatocyte growth factor and gene of Angiopoietin-1.

Keywords: regenerative medicine, regeneration, gene therapy drug, validation of method, restriction, electrophoresis.

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, связанные с ишемией миокарда, головного мозга и нижних конечностей, в том числе в сочетании с сахарным диабетом, относятся к наиболее значимым причинам смертности и инвалидизации населения России [1]. В последние годы отмечается рост заболеваний, связанных с инфарктом миокарда и ишемией конечностей, особенно среди лиц молодого и среднего возраста. Существующие хирургические методы применимы только для части больных, а консервативные методы лечения неэффективны у значительной части тяжелых больных. В этой связи, помимо медикаментозной терапии, эндоваскулярной и хирургической реваскуляризации, активно ведутся разработки принципиально новых технологий. Целью этих технологий является индукция роста новых кровеносных сосудов, их стабилизация и контроль траектории роста. Эта

стратегия названа терапевтическим ангиогенезом и является одной из основополагающих технологий бурно развивающейся регенеративной медицины [2].

В настоящее время на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ проводится фармацевтическая разработка комбинированного генотерапевтического лекарственного препарата для лечения ишемии нижних конечностей на основе невирусных плазмидных конструкций, несущих гены факторов роста. Препарат представляет собой раствор для внутримышечного введения и содержит в качестве действующих веществ две невирусные плазмидные ДНК, содержащие оптимизированные гены фактора роста гепатоцитов (HGF α pt) и ангиопоэтин-1 (AGP α pt).

После введения препарата в поврежденную ткань происходит экспрес-

сия трансгена в течение одной-двух недель, что обеспечивает высокий уровень продукции факторов роста в ткани-мишени. При этом фактор роста гепатоцитов (HGF) является фактором роста, индуцирующим ангиогенез, и антиапоптотическим фактором, а ангиопэтин-1 участвует в стабилизации вновь образованных сосудов, уменьшает их проницаемость и обладает противовоспалительной активностью [3–5]. Преимуществом разрабатываемого препарата является то, что он обеспечивает увеличение продукции сразу двух факторов роста в ткани-мишени. В результате препарат обеспечивает комплексное воздействие на ключевые процессы, необходимые для регенерации органов и тканей: индуцирует формирование функционально зрелых сосудов, оказывает антиапоптотическое действие, способствующее выживанию клеток. Имеющиеся у коллектива авторов предварительные данные, а также результаты использования комбинированной генной терапии на моделях ишемии тканей у животных *in vivo* показывают ее значительное преимущество в плане эффективности по сравнению с моноклонной терапией [6]. Применение препарата может представлять собой альтернативу хирургическому вмешательству, или препарат может быть использован в сочетании со стандартными хирургическими методами, направленными на предотвращение дегенеративных процессов и улучшение кровоснабжения, что позволит восстановить функцию органа или ткани. Выход генотерапевтического препарата, оказывающего комплексное воздействие на регенеративные процессы, на отечественный рынок сделает возможным оказание современной высокоэффективной помощи больным ишемией нижних конечностей, внесет существенный вклад в снижение смертности и повышение качества жизни населения.

Процесс производства препарата включает в себя стерилизующую фильтрацию и асептический розлив фармацевтической субстанции, представляющей собой раствор, содержащий смесь плазмид с суммарной концентрацией 1 мг/мл в изотоническом растворе хлорида натрия. Получение плазмид осуществляют с помощью стандартной технологии и оборудования, применяемых для решения подобных задач в генной инженерии.

Качество лекарственного препарата обеспечивается валидированным процессом производства, а также контролем в соответствии с проектом нормативной документации (НД) по всем показателям. Поскольку генотерапевтический препарат является оригинальной разработкой и в фармакопеях не описан, стандартные фармакопейные методики контроля качества, в том числе для оценки чистоты, для него отсутствуют.

При выборе и разработке методик контроля качества были приняты во внимание рекомендации

Управления по контролю качества продуктов и лекарственных средств США (FDA) по использованию плазмидных векторов в генной терапии, в частности требования к чистоте и качеству препаратов плазмидной ДНК, предназначенных для использования в качестве лекарственных средств или вакцин [7].

В процессе производства препарата возможно образование родственных примесей и продуктов деградации плазмидных ДНК. К технологическим относятся примеси, образующиеся в результате производственного процесса, например компоненты клеток-продуцентов (белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина), компоненты культуральной среды или компоненты систем очистки, компоненты питательной среды, реактивы, растворители. В связи с этим в препарате предлагается контролировать содержание действующего вещества – плазмидных ДНК, а также содержание примесей. К родственным примесям в генотерапевтических препаратах относят модифицированные варианты нуклеиновых кислот, образующиеся в ходе производства и/или хранения и отличающиеся от действующего вещества по активности, эффективности и безопасности [8, 9]. Содержание специфических примесей в препарате предложено определять методом электрофореза в агарозном геле с последующей денситометрией электрофореграммы. Предлагаемая методика позволяет определить содержание действующих веществ (плазмидных ДНК), продуктов деградации, компонентов клеток-продуцентов (белки клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина) и других неидентифицируемых примесей.

Целью данной работы является разработка и валидация методики определения специфических примесей (чистоты) генотерапевтического препарата методом электрофореза в агарозном геле предварительно линеаризованной плазмидной ДНК в присутствии бромистого этидия с последующей денситометрией электрофореграммы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Оценку чистоты препарата проводили с использованием камеры и принадлежностей для электрофореза Sub-Cell GT (Bio-Rad, США). Обработку электрофореграмм методом денситометрии проводили с использованием системы гель-документирования с трансиллюминатором ультрафиолетовым с длиной волны излучения 254 нм (Chemidoc MP, Bio-Rad, США), для считывания изображения с геля пластинку фотографировали встроенной цифровой CCD-камерой с высоким разрешением. Электронную фотографию пластинки агарозного геля обрабатывали с помощью

программного обеспечения Image Quant (Molecular Dynamics, США).

Взятие навесок осуществляли на весах аналитических (Sartorius 1702, Германия). Дозирование растворов осуществляли при помощи дозаторов переменного объема Eppendorf 0,5–2 мкл, Eppendorf 2–20 мкл, Eppendorf 10–100 мкл, Eppendorf 20–200 мкл, Eppendorf 200–1000 мкл, прошедших поверку по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования и имеющих погрешность не более 3% (Eppendorf AG, Германия). Используемые средства измерения зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений [10] и имеют действительные свидетельства о поверке.

Растворы и реактивы

Натриевая соль ЭДТА для электрофореза (Sigma, E5513, США); трис(гидроксиметил)аминометан (Sigma, T1378, США); агароза (Bio-Rad, 162-0134, США); бромистый этидий (Bio-Rad, 161-0430, США); 6-кратный краситель Loading Dye (Thermo Scientific, R0611, США); кислота уксусная ледяная, х.ч.; натрия гидроксида 10 М раствор (Sigma, S0899, США); рестриктаза *SacI* с концентрацией 10000 ед/мл (Thermo Scientific, ER1131, США); 10-кратный реакционный буферный раствор NEB-1 для проведения реакций рестрикции (NEB, B70015, Великобритания); препарат маркеров длин фрагментов ДНК GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100–10000 bp (Fermentas, SM0333, Литва); вода очищенная (ФС.2.2.0020.15).

Принцип метода

Рестриктаза *SacI* расщепляет кольцевые плазмидные ДНК, содержащие гены HGF_{ort} и AGP_{ort} в строго определенном месте, превращая все формы кольцевой ДНК в линейные формы размерами 6617 пар нуклеотидов (п.н.) и 5720 п.н. Содержание линейных ДНК, образующихся после обработки рестриктазой *SacI*, определяемое методом электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия, должно составлять не менее 90,0%.

Приготовление растворов

В коническую пробирку вместимостью 0,5 мл при помощи ручных дозаторов вносили 16 мкл деионизированной воды, 2 мкл 10-кратного реакционного буфера NEB-1, 1 мкл раствора препарата и 1 мкл рестриктазы *SacI*. Пробирку помещали в сухой воздушный термостат и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, затем инактивировали инкубацией при 65 °С в течение 20 минут. По окончании инкубации готовили пробирку «М» с маркерами длин фрагментов ДНК внесением 16 мкл деионизированной воды и 2 мкл препарата маркеров. В пробирку с образцами прибавляли 4 мкл концентрированного раствора

утяжелителя с краской-маркером. Процесс внесения образца в лунку геля контролировали визуально, поскольку краситель придает образцу синий цвет.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Электрофорез проводили в 1,4% агарозном геле в присутствии бромистого этидия в режиме стабилизации по напряжению при 80–100 В. Линеаризованные плазмидные ДНК располагались в геле в виде полос, параллельных длинным сторонам лунок.

При облучении ультрафиолетовым светом фрагменты ДНК в комплексе с бромистым этидием флуоресцировали в оранжевой области спектра. Полосы электрофореграммы, соответствующие линеаризованному плазмидному ДНК, идентифицировали, ориентируясь на расположение полос маркеров ДНК. Типичная фотография электрофореграммы испытуемого раствора препарата представлена на рисунке 1.

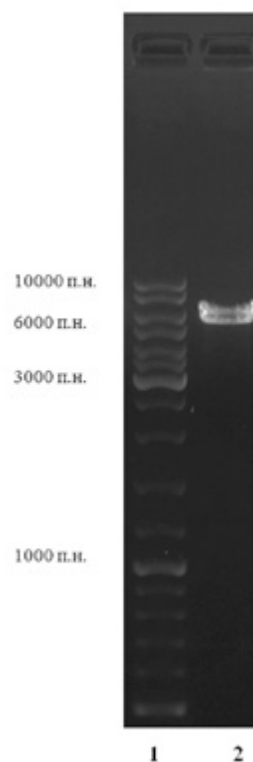


Рисунок. 1. Фотография электрофореграммы испытуемого раствора препарата.

Трек 1 соответствует раствору, содержащему маркеры длин фрагментов ДНК.

Трек 2 соответствует испытуемому раствору препарата

Обработка результатов

Обработку полученных электрофореграмм методом денситометрии проводили с использованием системы гель-документирования (Chemidoc MP, Bio-

Rad, США). Электронную фотографию пластинки агарозного геля обрабатывали с помощью программного обеспечения Image Quant (Molecular Dynamics, США), позволяющего оценивать интенсивность флуоресценции полос на треке.

Определяли суммарное значение флуоресценции (в условных единицах) полос, принадлежащих линейаризованному плазмидному ДНК, а также интегральную интенсивность флуоресценции всего трека испытуемого раствора препарата. Содержание основного вещества (P) в процентах рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{I_p}{I_{total}} \cdot 100\%,$$

где I_p – суммарное значение интенсивности флуоресценции полос линейных плазмидных ДНК в условных единицах; I_{total} – суммарное значение интенсивности флуоресценции всего трека испытуемого раствора препарата в условных единицах.

Результаты анализа испытуемого раствора препарата методом электрофореза представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты оценки чистоты генотерапевтического препарата по результатам анализа методом электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия

Параметр	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	Среднее
I_p , у.е.	111637	110343	112065	111348
I_{total} , у.е.	121345	120863	121477	121228
P , %	92,0	91,3	92,2	91,8

Согласно результатам электрофореза содержание линейаризованных плазмидных ДНК, образующихся после обработки раствора препарата рестриктазой *SacI*, составило не менее 90,0%, что соответствует требованиям, предъявляемым к продуктам, полученным методами рекомбинантных технологий [7].

Для подтверждения пригодности использования разработанной методики в рутинном контроле качества генотерапевтического препарата была проведена её валидация. При планировании и проведении валидационных испытаний принимали во внимание требования, изложенные в [12–14].

В рамках валидации методики получены и обработаны результаты по параметрам: (1) специфичность,

(2) линейность, (3) предел количественного определения, (4) правильность, (5) сходимости и (6) устойчивость [11].

(1) Специфичность

Для валидируемой методики определяли способность однозначно определять содержание плазмидных ДНК в присутствии плацебо – 0,9% раствора натрия хлорида.

Для оценки специфичности использовали геномную ДНК бактерий *Escherichia coli* O157 (штамм EDL 933).

Готовили следующие растворы:

- SP1. 0,9% раствор натрия хлорида;
- SP2. раствор ДНК *E. coli* O157 (EDL 933) с концентрацией 100 мкг/мл;
- SP3. испытуемый раствор препарата.

Приготовленные растворы анализировали согласно разработанной методике.

По результатам электрофореза на треках SP1 и SP2 полосы не детектируются, а на треке SP3 детектируются полосы с размером фрагментов 6617 п.н. и 5720 п.н. Результаты оценки специфичности представлены на рисунке 2.

Согласно полученным результатам предлагаемая методика обладает достаточной специфичностью для достижения удовлетворительных результатов при определении чистоты препарата.

(2) Линейность

Для исследования наличия линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации линейных ДНК в пределах аналитической области методики анализировали серию растворов, приготовленных разбавлением раствора после обработки рестриктазой *SacI*. Диапазон концентраций линейных плазмидных ДНК в анализируемых растворах составлял от 0,025 мг/мл до 0,5 мг/мл. Электрофореграмма, полученная в рамках оценки линейности, представлена на рисунке 3.

Результаты оценки линейности методики представлены в таблице 2.

Полученные экспериментальные данные анализировали с использованием статистических методов. С использованием метода наименьших квадратов и линейной модели $y = b \cdot x + a$ (x – концентрация линейных ДНК, %; y – суммарное значение интенсивности свечения, у. е.; b – угловой коэффициент; a – свободный член) строили калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации линейных плазмидных ДНК. Калибровочный график представлен на рисунке 4.

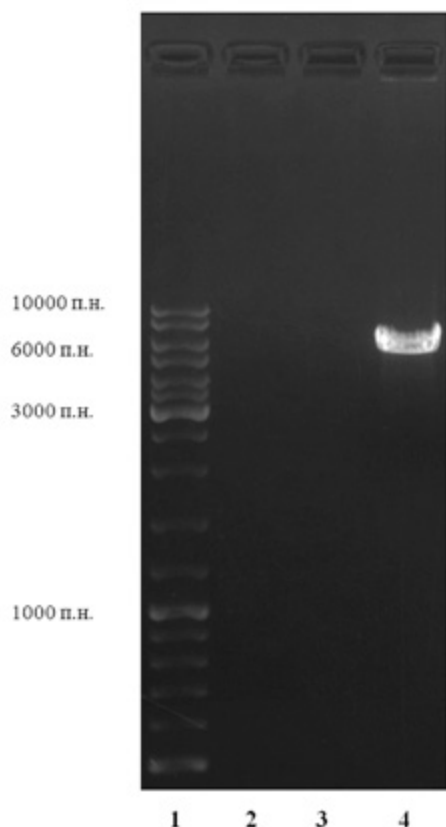


Рисунок. 2. Фотография электрофореграммы, полученная в рамках оценки специфичности.
Трек 1 соответствует раствору, содержащему маркеры длин фрагментов ДНК.
Трек 2 соответствует раствору SP1.
Трек 3 соответствует раствору SP2.
Трек 4 соответствует раствору SP3.

Результаты оценки линейности демонстрируют существование линейной зависимости между концентрацией линейных ДНК и интенсивностью флуоресценции в диапазоне концентраций от 5 до 100% от исходной концентрации испытуемого раствора [15].

(3) Правильность

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с её использованием, от значения, принимаемого за истинное [11].

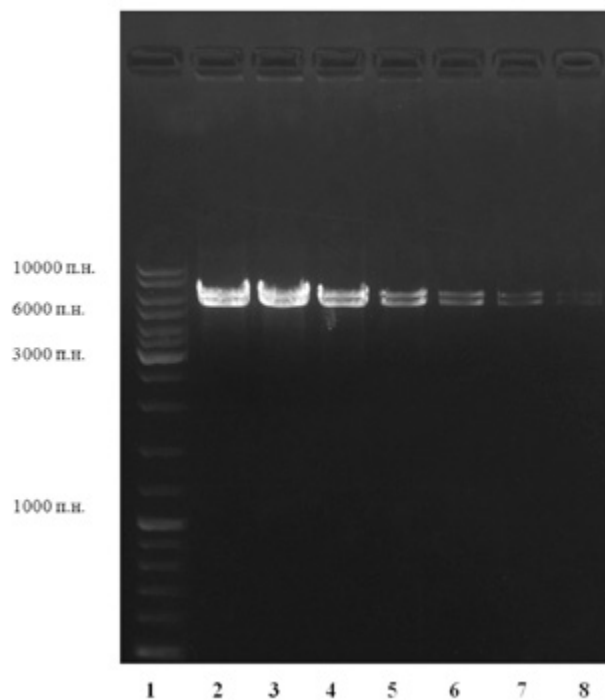


Рисунок. 3. Электрофореграмма, полученная в рамках оценки линейности методики.

Трек 1 соответствует раствору, содержащему маркеры длин фрагментов ДНК.

Трек 2 соответствует раствору линейных плазмидных ДНК с концентрацией 0,025 мг/мл.

Трек 3 соответствует раствору линейных плазмидных ДНК с концентрацией 0,05 мг/мл.

Трек 4 соответствует раствору линейных плазмидных ДНК с концентрацией 0,075 мг/мл.

Трек 5 соответствует раствору линейных плазмидных ДНК с концентрацией 0,15 мг/мл.

Трек 6 соответствует раствору линейных плазмидных ДНК с концентрацией 0,3 мг/мл.

Трек 7 соответствует раствору линейных плазмидных ДНК с концентрацией 0,45 мг/мл.

Трек 8 соответствует раствору линейных плазмидных ДНК с концентрацией 0,5 мг/мл.

Правильность валидируемой методики оценивали методом «введено – найдено» с использованием растворов, приготовленных в рамках исследования линейности. Рассчитывали процентную меру правильности. Полученные значения правильности находились в диапазоне 80–120%. Результаты оценки правильности укладываются в требуемый диапазон [13].

Таблица 2.

Результаты оценки линейности методики

Концентрация линейных ДНК, мг/мл	0,025	0,05	0,075	0,15	0,3	0,45	0,5
Концентрация линейных ДНК, %	5	10	15	30	60	90	100
Интенсивность флуоресценции, у.е.	1765	3986	5678	11256	21375	32496	36004

Таблица 3.

Результаты оценки сходимости валидируемой методики

Испытуемый раствор	Содержание плазмидной ДНК, %
1	94,4
2	95,5
3	92,1
4	93,8
5	95,3
6	93,0
Среднее	94,0
SD	1,2
RSD, %	1,32

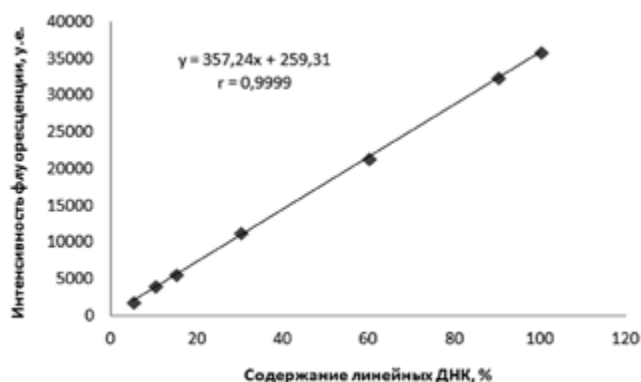


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации линейных ДНК

(4) Предел количественного определения

Предел количественного определения (ПКО) валидируемой методики – наименьшая концентрация линейных ДНК, которая может быть количественно определена с требуемой правильностью и прецизионностью.

Для оценки ПКО электрофореграммы, полученные при определении линейности, анализировали методом денситометрии с использованием системы гель-документирования (Chemidoc MP, Bio-Rad, США). Электронную фотографию агарозного геля обрабатывали с помощью программного обеспечения Image Quant (Molecular Dynamics, США), позволяющего проводить оценку интенсивности флуоресценции полос на треке. При этом было обнаружено, что ПКО составляет не менее 5% от исходной концентрации испытуемого раствора, что соответствует концентрации 0,025 мг/мл.

(5) Сходимость

Сходимость (повторяемость) валидируемой методики оценивали по независимым результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории в пределах короткого промежутка времени.

Для определения сходимости готовили 6 испытуемых растворов препарата. Для всех испытуемых растворов рассчитывали среднее значение содержания плазмидной ДНК, стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD, %). Результаты оценки сходимости представлены в таблице 3.

Результаты оценки сходимости соответствуют требованию: относительное стандартное отклонение содержания плазмидной ДНК в препарате – не более 5,0% [15].

(6) Устойчивость

В соответствии с ОФС.1.1.0012.15 [14] устойчивость валидируемой методики – это способность сохранять найденные для нее в оптимальных (номинальных) условиях характеристики при вероятных небольших отклонениях от условий проведения анализа.

Устойчивость валидируемой методики устанавливали по отношению к критическим параметрам пробоподготовки: времени обработки рестриктазой (16 и 20 ч соответственно), времени инкубации образца после обработки рестриктазой (анализ проводили сразу после приготовления и через 24 ч). Содержание плазмидной ДНК в испытуемых растворах отличалось не более чем на 1,7%, следовательно, валидируемая методика определения способна сохранять найденные для нее в оптимальных условиях характеристики при вероятных небольших отклонениях от условий проведения анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам валидационных испытаний предлагаемая методика определения чистоты методом электрофореза в агарозном геле удовлетворяет установленным требованиям и является пригодной для использования в рутинном контроле качества генотерапевтического препарата, содержащего плазмидные

ДНК, включающие гены HGF α и AGP α , по показателю «чистота».

Работа выполнена за счёт гранта Российского научного фонда (проект №14-24-00086) с использованием оборудования, приобретённого за счёт средств программы развития Московского университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы // Кардиологический вестник. 2007. № 2(2). С. 24–31.
2. К.А. Талицкий, Ю.А. Карпов, Е.В. Парфенова. Терапевтический ангиогенез в лечении ишемии нижних конечностей // Кардиология. 2007. № 12. С. 81–84.
3. L. Devesa, J. Choi, F. Yang. Therapeutic Angiogenesis for Treating Cardiovascular Diseases // Theranostics. 2012. V. 2(8). P. 801–814.
4. R. Gupta, J. Tongers, D.W. Losordo. Human Studies of Angiogenic Gene Therapy // Circ. Res. 2009. V. 105. P. 724–736.
5. R. Gupta, D.W. Losordo. Challenges in the translation of cardiovascular cell therapy // J. Nucl. Med. 2010. V. 51(1). P. 122–127.
6. Е.К. Шевченко, П.И. Макаревич, З.И. Цоколаева, В.Ю. Сысоева, А.Я. Шевелев, Н.М. Каширина, Т.Н. Власик, Е.В. Парфенова. Восстановление кровотока в ишемизированной конечности мыши с помощью плазмидных конструкций и генетически модифицированных стромальных клеток жировой ткани // Молекулярная медицина. 2011. № 4. С. 23–28.
7. Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), November 2007 BP. URL: <http://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm091968.pdf> (дата обращения 24.05.15).
8. Guideline on similar biological medicinal products. European medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. – London. 2005.
9. Guideline on similar biological medicinal products (draft). European medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. – London. 2013.
10. Государственный реестр средств измерения URL: http://fundmetrology.ru/10_tipy_si/7list.aspx (дата обращения 08.06.15).
11. Проект общей фармакопейной статьи «Валидация аналитических методик», предназначенный для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации. 13-е изд.
12. Draft guidance for industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), February 2014. URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM386366.pdf> (дата обращения 01.06.2015).
13. ICH Harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Current Step 4 version parent guideline, October 1994. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (дата обращения 20.05.15).
14. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея, XIII изд.
15. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации // Под ред. Н.В. Юргеля. – М.: Спорт и Культура, 2000, 2007. 192 с.