

**ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВИЙ ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»**

МИНУЛЕ, СЬОГОДЕННЯ І МАЙБУТНЄ ФАРМАКОПЕЙНИХ ВИПРОБУВАНЬ *IN VIVO*

МЕРКУЛОВА Ю.В.

**ПРОВІД. Н. С. ЛАБОРАТОРІЇ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛІЗУ
ДП «ФАРМАКОПЕЙНИЙ ЦЕНТР»**

25-26.11.2021, м. Харків

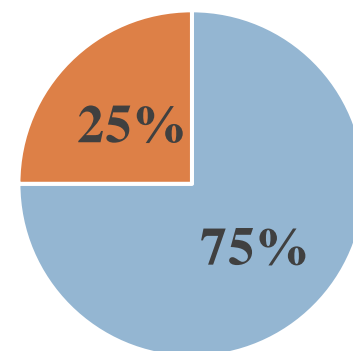
**Науково-практична конференція
«Державна Фармакопея України – європейська якість вітчизняних лікарських засобів»**

- **Фармакопейні біологічні методи**, які є невід’ємною складовою великого комплексу аналітичного забезпечення виробництва фармацевтичних препаратів, здійснюються у випробуваннях *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* з використанням різних біологічних тест-систем: лабораторних тварин, ізольованих органів, клітинних культур тканин та біохімічних систем організму людини або тварин.
- **Біологічні методи *in vivo*** дозволяють оцінити показники безпеки лікарського засобу або визначити його біологічну активність, що неможливо контролювати сучасними фізико-хімічними методами, принаймні, на даному етапі.
- У той же час, у світі відбувається поступова ефективна заміна випробувань на тваринах *in vivo* аналізом *ex vivo* або *in vitro* з використанням фізіологічних, біохімічних і навіть фізико-хімічних методів аналізу якості лікарських засобів, що обумовлено, з одного боку, методологічними, економічними та частково законодавчими обмеженнями тих методів, для виконання яких потрібні біологічні тест-системи, насамперед, лабораторні тварини, з іншого – вдосконаленням можливостей та очевидними перевагами фізико-хімічних методології у плані їх надійності, точності, відтворюваності та економічності.

Порівняльний перелік біологічних методів, які є предметом загальних статей Ph. Eur. 6.5, USP 32-NF 27 та ДФУ 1.2 (не включено біологічні методи, які засновані на мікробіологічній й імунобіологічній методології)

EPh 6.5	USP 32-NF 27
Pyrogens (2.6.8.)	Bacterial Endotoxins Test (85)
Abnormal Toxicity (2.6.9.)	Biological Reactivity Tests, <i>in vitro</i> (87)
Histamine (2.6.10.)	Biological Reactivity Tests, <i>in vivo</i> (88)
Depressor substances (2.6.11.)	Insulin assays (121)
Bacterial endotoxins (2.6.14.)	Protein-Biological adequacy Test (141)
Prekallikrein activator (2.6.15.)	Pyrogen Test (151)
Activated coagulation factors (2.6.22)	Trasfusion and Infusion Assambles and Similar Medical Devices (161)
Assay of blood coagulation factor VIII (2.7.4.)	Design and Analysis of Biological Assays (111)
Assay of heparin (2.7.5.)	
Assay of human coagulation factor VII (2.7.10)	
Assay of human coagulation factor IX (2.7.11)	

ДФУ 1.2
Пірогени (2.8)
Аномальна токсичність (2.6.11)
Депресорні речовини (2.6.11)
Бактеріальні ендотоксини (2.6.14)



■ *in vivo* ■ *in vitro*

- На даний час загальна стаття ДФУ **2.6.8. «Пірогени»** вже не містить посилання на національну частину, яка за методологію та інтерпретацією результатів в тесті на пірогени на кролях, багато в чому, спиралася на вимоги USP, і з'явившись в першому виданні ДФУ 1.0 в 2001 році, проіснувала в незміненому вигляді майже 20 років.
- Такий крок ДФУ базується на проведеному аналізі НД вітчизняних виробників, який продемонстрував, що на даний час МКЯ на парентеральні препарати вже не містить у розділі «Пірогени» посилання з літерою «N» - *національний текст*, який, таким чином, може бути вилючений як той, що втратив актуальність.

2.6.8. ПІРОГЕНИ

Випробування на пірогени полягає у вимірюванні підвищення температури тіла, що спричинене внутрішньовенним введенням кролям стерильного розчину випробовуваного лікарського засобу.

Вибір тварин. Використовують здорових статевозрілих кролів обох статей масою не менше 1.5 кг, які отримують повноцінне та збалансоване харчування

Загальна стаття **2.6.8. «Пірогени»**

- Методологія випробування на пірогени, яка передбачає триразову реєстрацію температури тіла кролів після ін'єкційного введення лікарського засобу, була розроблена у 1923-1925 рр. клінічним фармацевтом Чиказького університету (США) *Florence Seibert*.
- Висока потреба в ін'єкційних та інфузійних препаратах у роки Другої світової війни багато в чому сприяла та прискорила процес включення загальної статті «Пірогени» у провідні фармакопеї світу. Офіційно випробування на пірогени було введено на початку 40-х років минулого століття в XII Фармакопею США (1942 р.).

Загальна стаття **2.6.8. «Пірогени»**

- Протоколи випробування на кролях, прийняті регулюючими органами різних держав світу 60-80 років тому та присутні дотепер у провідних фармакопеях — Фармакопеї США (USP), Європейській (Ph. Eur.), Британській (BP) та Японській (JP), мали певні розбіжності в методології та інтерпретації тесту на пірогени
- Перше видання ДФУ (2001 р.) містило європейську та національну частини загальної статті 2.6.8. «Пірогени», які також відрізнялись за експериментальним дизайном основного випробування та алгоритмом оцінки пірогенного забруднення.
- Цікаво зазначити, що оприлюднені у 2005 р. Федеральним відомством з сироваток та вакцин (Німеччина) дані п'ятирічних випробувань ЛЗ щодо високої чутливості до пірогенів кролів породи *Chinchilla Bastards* не стали поштовхом для внесення уточнень та перегляду компендіальної методики



- На 170-й сесії у червні 2021 р. Комісія Європейської Фармакопеї (Ph. Eur.) ухвалила рішення пройти приблизно за 5 років шлях, який у кінцевому підсумку повинен призвести до повної заміни тесту на пірогени на кролях.
- Обґрунтування цього кроку Європейської Фармакопеї (Ph. Eur.) базується на декількох положеннях, наведених далі:
 - Більшість пірогенів є бактеріальними ендотоксинами, наявність яких в лікарському засобі можна виявити за допомогою випробування на бактеріальні ендотоксини (BET), описаному у загальних статтях Ph. Eur. **2.6.14. «Bacterial endotoxins»** та **2.6.32. «Test for bacterial endotoxins using recombinant factor C»**. До безперечних переваг випробування на бактеріальні ендотоксини належить можливість отримання кількісної відповіді під час перевірки потенційної пірогенності ЛЗ і можливість проводити постадійний контроль вмісту ендотоксинів у процесі виробництва ін'єкційних препаратів

- У деяких випадках в фармацевтичних препаратах та субстанціях можуть також бути присутніми пірогени «неендотоксинової» природи, які не виявляються за допомогою випробування на вміст бактеріальних ендотоксинів. Для підтвердження відсутності «неендотоксिनних» пірогенів у 2009 році запропоновано метод *in vitro* як альтернатива тесту на пірогени на кролях.
- Публікація загальної статті 2.6.30 «*Monocyte Activation Test*» (MAT) у Ph. Eur. та гармонізованої статті ДФУ 2.6.30 «Випробування на активацію моноцитів», є значним кроком уперед, в тому числі, і з огляду на загальносвітову практику обмеження експериментів на тваринах.

- Однак, незважаючи на численні зусилля, спрямовані на повсюдне та швидке поширення *MAT* - високочутливого та універсального методу контролю пірогенів різної етіології (*ендотоксинів, не-ендотоксинів*), розробники фармацевтичних препаратів продовжують використовувати кролів для виявлення пірогенних речовин.
- Наразі існує 59 текстів Ph. Eur., включаючи вакцини для використання, для людини, продукти крові, антибактеріальні та радіофармацевтичні препарати, вироби медичного призначення (контейнери), які передбачають проведення випробування на пірогенну контамінацію в тесті на пірогени на кролях.
Європейська Фармакопея прагне замінити тест на пірогени відповідною альтернативою *in vitro*, що в кінцевому підсумку призведе до повної ліквідації розділу 2.6.8.

2.6.8. ПІРОГЕНИ

Випробування на пірогени полягає у вимірюванні підвищення температури тіла, що спричинене внутрішньовенним введенням кролям стерильного розчину випробовуваного лікарського засобу.

Вибір тварин. Використовують здорових статевозрілих кролів обох статей масою не менше 1.5 кг, які отримують повноцінне та збалансоване харчування

- Перший шаг у напрямку скасування використання тварин у випробувальних цілях, відповідно до положень 3Rs Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються з експериментальною та іншою науковою метою, – введення до ДФУ 2.4 статті 5.2.14 «Заміна методу(*iv*) *in vivo* на метод(*u*) *in vitro* для контролю якості вакцин»/
- Протягом усього процесу заміни теста на пірогени на кролях відповідною альтернативною методикою *in vitro* користувачі матимуть можливість коментувати кожний конкретний випадок, оскільки кожен із відповідних текстів пройде стандартне публічне/відкрите (міжнародне) обговорення у періодичному виданні Європейського департаменту якості лікарських препаратів - «*Pharmeuropa*».

Розділ ДФУ 2.6. *Біологічні випробування* містить посилання ...

- на загальну статтю 2.6.30. «*Випробування на активацію моноцитів*» (MAT), що гармонізована зі статтею 2.6.30 «*Monocyte Activation Test*» у Ph. Eur., та запропонована у 3 модифікаціях: кількісне випробування, напівкількісне випробування порівнюючи зі стандартною кривою «доза – відгук» ендотоксину або, у третій модифікації, — порівнюючи з еталонним зразком випробовуваного ЛЗ
- *Випробування на активацію моноцитів* суттєво розширило можливості контролю безпеки препаратів за рахунок виявлення пірогенних речовин не-ендотоксинової природи, які через активацію моноцитів та вивільнення ендогенних медіаторів запалення, відіграють важливу роль в патогенезі лихоманки.

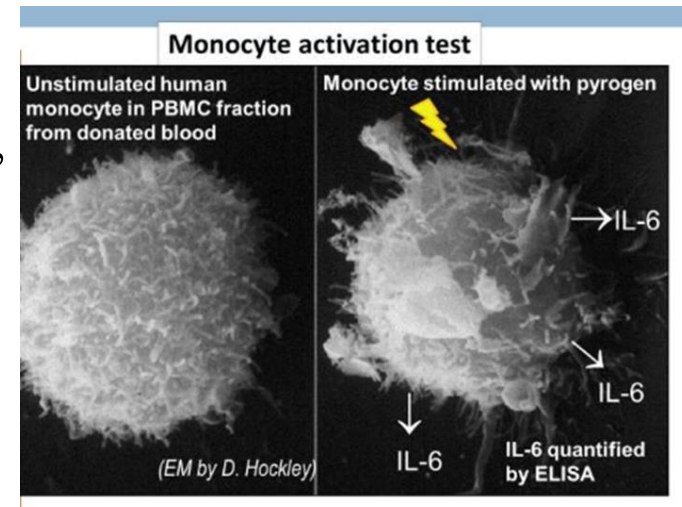


- *Випробування на активацію моноцитів (МАТ)* є придатним ефективно замінити випробування на пірогени на кролях в нормативній документації на лікарський засіб після розробки методики стосовно даного засобу та проведення комплексу валідаційних досліджень.
- Визначення пірогенів *in vitro* з використанням клітин людини тим більше виправдано, оскільки імунна система людини відрізняється від такої у тварин і може бути більш сприйнятливою до активації Т-клітин

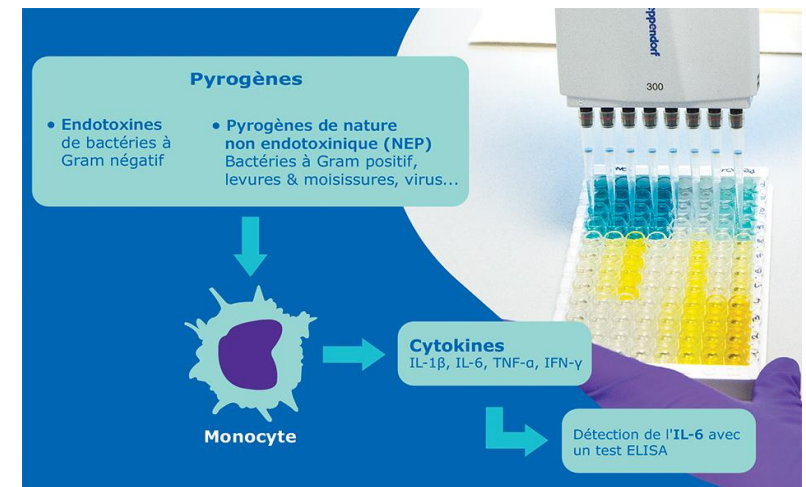
Загальна стаття 2.6.30. «Випробування на активацію моноцитів» (MAT)

- 16 років тому, у червні 2005 р., Міжвідомчий координаційний комітет з офіційного затвердження альтернативних методів (ICCVAM) ініціював розгляд імуноферментного методу визначення пірогенних речовин *in vitro* як альтернативи випробуванню на пірогени на кролях. Експертами Європейської фармакопеї MAT почав розглядатися з 2005 р., однак, не як «обов'язковий», а лише як можлива альтернатива класичному пірогенному тесту без окремої загальної статті.
- На конференції, присвяченій альтернативним випробуванням на пірогени, в Бахарачі (2006) можливості тесту на активацію моноцитів обговорювалися експертами ще суперечливо. На наступній конференції (2009) у Берліні розробники трьох методів MAT A (кількісний тест), B (напівкількісний тест) та C («порівняльний тест порівняльної партії») вже дискутували який з тестів буде «найкращим».

- В 2010 р. загальна стаття 2.6.30 «*Monocyte Activation Test*» (MAT) введена до Європейської Фармакопеї (Ph. Eur.) як альтернатива тесту на кролях, в 2017 р. – текст загальної статті 2.6.30 було переглянуто.
- На той час вже минуло більше 15 років з моменту публікації *Hartung T. i Wendel A.* – авторів цього методу, які показали, що під час інкубації цільної крові або клітин цільної крові здорових донорів з досліджуваним зразком, який містить пірогени різні за хімічною структурою, у лейкоцитах індукується синтез ендогенних медіаторів запалення — прозапальних цитокінів, насамперед фактору некрозу пухлин альфа (TNF α) та інтерлейкінів (IL-1 β , IL-6)

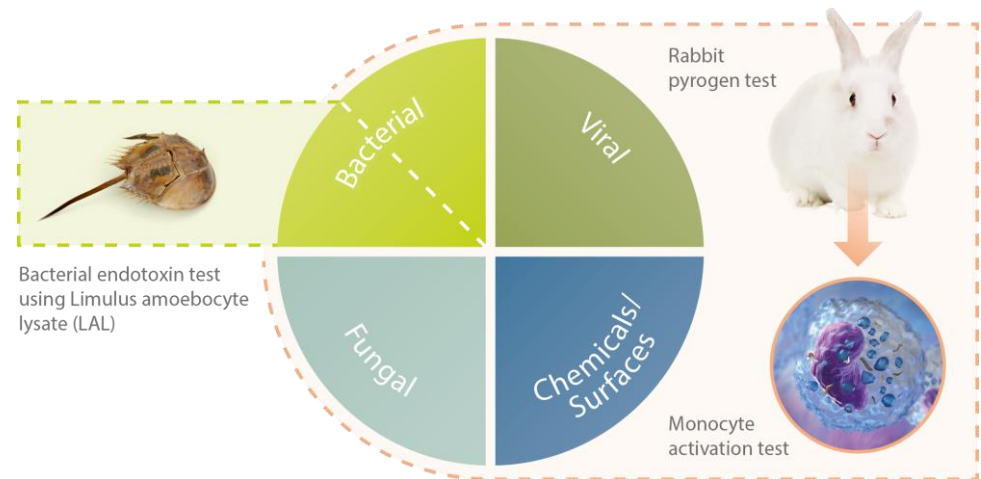


- Методологія проведення випробування на активацію моноцитів передбачає інкубацію випробовуваного зразка з комерційно доступним джерелом моноцитів людини або моноцитарних клітин, наприклад із гепаринізованою периферичною кров'ю, або з фракцією крові, що містить моноцити, або з лінією моноцитарних клітин людини. У попередніх випробуваннях джерела моноцитів калібрують за стандартом ендотоксину з використанням стандартних кривих «доза – відгук», визначаючи відповідність критеріям прийнятності для стандартної кривої та наявність заважаючих факторів у випробовуваному розчині.



- Наявність в Європейській Фармакопеї (Ph. Eur.) загальної статті 2.6.30 «*Monocyte Activation Test*» (MAT) відкрило також дискусію щодо недоліків випробування на бактеріальні ендотоксини, а саме:
 - певні обмеження до виявлення пірогенів неендотоксинової природи;
 - маскування вмісту грамнегативних бактерій (наприклад, проблема *LER (Low Endotoxin Recovery)* – недооцінювання вмісту ендотоксинів в препараті, який містить сурфактант та хелатуючий агент);
 - негативний вплив на популяцію мечехвостів, які є донором лізату

- *Випробування на активацію моноцитів* має цілий ряд переваг, порівнюючи з тестом на пірогени на кролях та випробуванням на вміст бактеріальних ендотоксинів, тому що, маючи чутливість останнього дозволяє контролювати:
 - пірогенні забруднення «неендотоксинової» природи, зокрема від грампозитивних бактерій, вірусів і грибів;
 - пірогенні домішки біологічної та хімічної природи, що пов'язані з фармацевтичними субстанціями, сировиною або його виробництвом лікарського засобу



- У квітні 2017 р. Комісія Європейської Фармакопеї (Ph. Eur.) внесла на обговорення пропозицію щодо скасування вимог до випробування на аномальну токсичність з 49 монографій Європейської фармакопеї. Європейська федерація фармацевтичних підприємств та асоціацій (EFPIA) повністю підтримала цю пропозицію через такі ключові причини:
 - тест на аномальну токсичність був розроблений у той час (*на початку 1900-х років*), коли процес виробництва фармацевтичних препаратів та контроль їх якості тільки починав розвиватися;
 - сучасне фармацевтичне виробництво відповідає вимогам з належної виробничої практики (*GMP*);
 - з наукової точки зору, тест на аномальну токсичність *in vivo* для виявлення потенційно шкідливих для здоров'я людини серій ЛС є дуже сумнівним. Численні історичні огляди результатів випробувань показали, що за фармакопейним тестом на аномальну токсичність не можна зробити достовірних висновків;

- за допомогою теста на аномальну токсичність на мишах/мурчаках не можуть бути перевірено відповідні сучасні валідаційні характеристики, такі як специфічність, відтворюваність та межа виявлення;
- випробуванню на мишах притаманна висока варіабельність, тому стає проблема відтворюваності в межах однієї лабораторії та між лабораторіями;
- вимоги тесту на аномальну токсичність спричиняють невиправдане використання значної кількості тварин без будь-якої вигоди щодо демонстрації безпеки продукції. Використання тварин у тесті на аномальну токсичність не відповідає принципу *3Rs* через відсутність обґрунтування та наукової аргументації;

- нарешті, але не менш важливо, різні організації та регулюючі органи видалили вимоги щодо показника «Аномальна токсичність», який вже не є обов'язковим у монографіях Європейської фармакопеї щодо вакцин, сироваток та антибіотиків. *FDA* США скасувала загальні вимоги до випробувань безпеки (*GST* = тест на аномальну токсичність у США) щодо препаратів біологічного походження як такі, що вже застарілі і не підтверджуються даними.

- **Біологічні методи кількісного визначення**, що присутні в ДФУ і застосовуються для оцінки якості певних фармакотерапевтичних груп лікарських засобів за виразністю їх специфічної фармакологічної дії шляхом порівняння з активністю стандартного препарату, в переважній більшості використовують методи *in vitro*.
- У 2001 року розділ ДФУ 2.7. **Біологічні методи кількісного визначення** містив лише одну загальну статтю оцінки фармакологічної (антибактеріальної) активності препаратів *in vitro* (мікробіологічним) методом.
- За два десятиріччя портфель фармакопейних методів, які дозволяють біологу-аналітику аналізувати якість лікарського засобу, наповнився більше ніж трьома десятками загальних статей.



- В ДФУ, 2.4. включено суто національну загальну статтю 2.7.N1. «Кількісне визначення серцевих глікозидів методом *in vitro*», яка ґрунтується на здатності серцевих глікозидів викликати систолічну зупинку серця лягушек та дозволяє контролювати якість рослинної сировини та лікарських рослинних препаратів.

В Державній Фармакопеї (ДФ-ХІ) колишнього СРСР, а на даний час - в ДФ РФ-ХІV, серцеві глікозиди контролюються кількома різними методами за 3 загальними статтями, не рахуючи різновидів методик в кожній з статей. Особлива «увага» до глікозидних препаратів в ДФ-ХІ пояснюється тим, що на час їх розробки та стандартизації, у 60-70-х роках минулого сторіччя, серцеві глікозиди були практично єдиною групою серед засобів для кардіології.

2.7.N.1. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕРЦЕВИХ ГЛІКОЗИДІВ МЕТОДОМ *IN VIVO*

Принцип кількісного визначення полягає в оцінюванні активності серцевих глікозидів (кардіоглікозидів) методом *in vivo* та заснований на їх здатності в токсичних дозах викликати зупинку серця тварин у стадії систоли (сistolічну зупинку серця). Встановлюють найменші дози стандартного препарату та випробовуваного лікарського засобу, які викликають систолічну зупинку серця піддослідних тварин. Випробування проводять на жабах.

Активність випробовуваних зразків, що містять серцеві глікозиди, оцінюють порівнюючи з активністю стандартних препаратів (біологічних стандартних препаратів ДФУ (*БСП ДФУ*)), яку виражають в одиницях дії (ОД) або так званих жаб'ячих ОД (ЖОД). За умови проведення випробування на жабах біологічну активність стандартних препаратів встановлюють на так званих стандартних або нормальних жабах, тобто випробування проводять у жовтні-листопаді на жабах-самцях *Rana ridibunda* (внутрішньосерцеве введення) або *Rana temporaria* (підшкірне введення) масою тіла 28–33 г.

- На даний час розділ ДФУ 2.7. *Біологічні методи кількісного визначення* включає фотометричні (хромогенні) методи оцінки антикоагулянтної активності гепарину за його антифактор Ха-, антифактор Па-активністю та препаратів плазми і терапевтичних концентратів за активністю факторів згортання крові людини II, VII, VIII, IX, X та XI.
- Хромогенні методи оцінки антикоагулянтної активності гепарину за його антифактор Ха-, антифактор Па-активністю є предметом загальної статті ДФУ 2.7.5 *«Кількісне визначення гепарину»*
- Як зазначено в загальній статті ДФУ, 2.7.5. *«Кількісне визначення гепарину»*, характеристикою кількісного вмісту гепарину прийнято його антикоагулянтну активність, яку визначають *in vitro* порівняно з аналогічною здатністю стандартного препарату гепарину натрію.

2.7. БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

2.7.5. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕПАРИНУ

Антикоагулянтну активність гепарину визначають методом *in vitro* за його здатністю підсилювати інгібування антитромбіном тромбіну (фактора IIa) (кількісне визначення антифактор Па активності). Міжнародна Одиниця (МО) — активність, що міститься в зазначеній кількості міжнародного стандарту нефракційного гепарину. *БСП гепарину натрію*, калібрований у МО відносно міжнародного стандарту та придатний для використання як стандартний препарат у 2 методах кількісного визначення, що наведені нижче.

- *Хромогенний метод* як високоспецифічний і істотно більш надійний було включено в Ph. Eur. (USP та інші провідні фармакопеї світу) на заміну коагулологічному методу, після кризи 2008 р., яка пов'язана з фальсифікацією препаратів гепарину китайського виробництва.
- Застосування коагулологічного (клоттінгового) методу визначення активності гепарину не дозволило виявити фальсифікат, що призвело до летальних наслідків в клініці. На результати аналізу, проведеного клоттінговим методом, виявляють також вплив домішки гепарин-подібних продуктів (наприклад, *OSCS*).
- Посилання на коагулологічний метод в НД на фармацевтичний препарат не дозволяє зареєструвати його в країнах, що працюють за Європейською фармакопеєю.

2.7.5. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕПАРИНУ

Антикоагулянтну активність гепарину визначають *in vitro* шляхом порівняння його здатності у заданих умовах затримувати згортання рекальцинованої цитратної овечої плазми крові з аналогічною здатністю стандартного препарату гепарину, каліброваного у Міжнародних одиницях (МО).

МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту, що складається з певної кількості ліофілізованої натрієвої солі гепарину, отриманої зі слизових оболонок кишечника свиней. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

БСП гепарину натрію, у МО, калібрують відповідно міжнародного стандарту із використанням одного з наведених нижче методів кількісного визначення.

Кількісне визначення виконують одним із таких методів встановлення початку згортання. Для визначення використовують пробірки та інше обладнання, відповідно до обраного методу:

- візуальне спостереження, переважно у відбитому світлі на чорному матовому тлі;
- спектрофотометрична реєстрація зміни оптичної густини за довжини хвилі близько 600 нм;
- візуальна фіксація зміни текучості шляхом обертального нахилу пробірок (проводиться вручну);
- механічний запис зміни плинності, що визначається при перемішуванні, із дотриманням запобіжних засобів, спрямованих на мінімізацію збурювання розчину на початковій стадії згортання.

- Аналіз загальних статей на біологічні випробування та біологічні методи кількісного визначення, що включені на даний час в ДФУ, свідчить щодо постійного та неухильного вдосконалення біологічних методів, їх важливої ролі в системі забезпечення якості та актуальності подальшої розробки загальних методологічних підходів, що забезпечує можливість гарантувати надійність фармакопейного аналізу.

Дякую за увагу !

