



Біологічні методи контролю лікарських засобів та їх статистична обробка

Кишинець Неля

с.н.с відділу ДФУ ДП «Фармакопейний центр»

керівник наукових напрямів ДФУ: *«Біологічні методи аналізу та їх статистична обробка», «Монографії та загальні тексти на біологічні лікарські засоби»*



БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ

- 2.6. БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ (27)
- 2.7. БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ (33+2)
- 5.1. ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ З МІКРОБІОЛОГІЇ (10)
 - (5.1.7. «Вірусна безпека», 5.1.10. «Рекомендації щодо застосування випробування на бактеріальні ендотоксини»)
- 5.2. ЗАГАЛЬНІ ТЕКСТИ НА БІОЛОГІЧНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ (11)



Загальна кількість статей з біологічних методів аналізу

ДФУ першого видання (2001 рік)	ДФУ другого видання (2021 рік)	Eur.Ph. десятого видання (10.7)
Всього: 21	Всього: 62	Всього: 59
Розділ 2.6 (12) Розділ 2.7 (9)	Розділ 2.6 (27- 2) Розділ 2.7 (35)	Розділ 2.6 (27) Розділ 2.7 (32)

СТАТТІ, ЩО ВТРАТИЛИ ЧИННІСТЬ (ВИЛУЧЕНІ СТАТТІ)

- **2.6. БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ**
 - 2.6.8. Пірогени, *N* (Національна частина)
 - 2.6.9. Аномальна токсичність
 - 2.6.11. Депресорні речовини, *N* (Національна частина)
 - 2.6.19. Випробування на нейровірулентність вакцини для профілактики поліомієліту (оральної)
- **2.7. БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ**
 - 2.7.2. Кількісне визначення антибіотиків мікробіологічним методом, *N* (Національна частина)
 - 2.7.5. Кількісне визначення гепарину, *N* (Національна частина)



Біологічні методи аналізу використовують для випробовування та тестування таких **лікарських засобів** (субстанцій і препаратів), активність яких не може бути коректно визначена хімічними або фізичними методами або для контролю за **показниками якості**, який не можливо провести хімічними або фізичними методами (*МБЧ, ендотоксини тощо*) .



Біологічні методи аналізу умовно можна поділити на наступні групи:

- **загального призначення** (2.6.21. Методи ампліфікації нуклеїнових кислот ; 2.7.1. Імунохімічні методи ; 2.7.24 Проточна цитометрія)
- для випробування **стерильних лікарських засобів** (2.6.1 Стерильність; 2.6.8 Пірогени; 2.6.9 Аномальна токсичність; 2.6.14 Бактеріальні ендотоксини; 2.6.30 Активація моноцитів тощо)
- для випробування **нестерильних лікарських засобів** (Мікробіологічна чистота (2.6.12, 2.6.13, 2.6.31)
- **специфічні:**
- для випробування антибіотиків, гепарину, іміноглобуліну тощо (2.7.2, 2.7.5, 2.7.12, тощо)
- для випробування клітинних продуктів (2.6.27, 2.6.34, 2.6.35, 2.7.23, 2.7.29)
- для випробування імуносироваток та вакцин для застосування людиною та для застосування у ветеринарній медицині компонентів вакцин (2.7.6, 2.7.7, 2.7.8, 2.7.15, 2.7.16, 2.7.20, 2.7.27, 2.7.35; 2.6.2, 2.6.7, 2.6.16, 2.6.18, 2.6.19)
- для випробування похідних крові (фактори згортання крові та інш. компоненти крові людини,) (2.7.4, 2.7.10, 2.7.11, 2.7.18, 2.7.19, 2.7.21, 2.7.22 тощо)



Статистична обробка результатів біологічних випробувань

- Для обробки результатів випробувань використовують звичайні методи статистичного аналізу (наприклад, що наведені в статті 5.3 ДФУ 2.3)
- ***5.3. СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ БІОЛОГІЧНИХ ВИПРОБУВАНЬ ТА КІЛЬКІСНИХ ВИЗНАЧЕНЬ***



Особливості проведення біологічних випробувань

В основу біологічних випробувань покладено принцип порівняння зі стандартним препаратом: тобто визначається кількість випробовуваної речовини, що має такий самий біологічний ефект, як і задана кількість стандартного препарату

Істотною умовою проведення таких біологічних випробувань є **одночасне їх виконання в однакових умовах** для стандартного препарату та випробовуваної речовини



Рандомізація та незалежність окремих обробок під час проведення біологічних випробувань

- Призначення різних обробок різним експериментальним одиницям (тваринам, пробіркам тощо) має бути зроблено відповідно до суворо випадкового процесу.
- Будь-який інший вибір умов експерименту, що завчасно не передбачені в плані експерименту, також має бути здійснено випадковим способом.
- Рандомізація може бути здійснена за допомогою комп'ютерів з використанням вбудованого генератора випадкових чисел.



Особливості проведення біологічних випробувань

- Будь-яка оцінка активності, що ґрунтується на результатах біологічного випробовування, містить випадкову похибку, обумовлену **неусувною варіабельністю результатів** біологічних випробувань.
- *Доцільно, якщо можливо, проводити обчислення цієї похибки за результатами кожного випробовування або тесту, навіть у разі використання стандартного перевіреного методу.*
- *Перед тим, як зупинитися на тому чи іншому методі, потрібно кожного разу провести попереднє (пілотне) випробування, що включає достатню кількість дослідів (експериментів), та переконатися в можливості застосування даного методу.*



Біологічні випробовування, включені до ДФУ, засновані на "принципі розчинення"

- передбачається, що невідомий лікарський засіб, який випробовується, містить те саме активне начало, що і стандартний препарат, але відрізняється від останнього співвідношенням активного та неактивного компонентів



- У цьому разі випробовуваний зразок можна теоретично одержати зі стандартного препарату шляхом його розчинення (розведення) неактивними компонентами.
- Для того, щоб перевірити, чи задовольняє конкретне випробовування принципу розчинення, слід порівняти залежності доза-ефект для стандартного препарату та невідомого випробовуваного лікарського засобу.
- Наявність істотної відмінності цих залежностей дозволяє припустити, що один із препаратів додатково до активного інгредієнта містить якісь компоненти, які не є інертними та впливають на відгуки (результати дії препаратів), що вимірюються.



Важливість дизайну випробування під час використання біологічних методів аналізу

- Під час розробки методики випробування та планування потрібно переконатися в тому, що результати, одержані від різних випробувань, задовольняють такі теоретичні вимоги:
 - 1) різні процедури мають бути розподілені по відношенню до одиниць випробування випадковим способом;
 - 2) результати всіх випробувань мають бути розподілені нормально (відповідати нормальному закону розподілу);
 - 3) у кожній групі випробувань стандартні відхилення відгуків (результатів дії зразків) для стандартного препарату та випробовуваного лікарського засобу не мають статистично істотно відрізнятися один від одного (дисперсії мають бути однорідними).



Важливість дизайну випробування під час використання біологічних методів аналізу

- **Довірчий інтервал** оціненого показника активності (ефективності) вказує на точність, з якою даний показник може бути визначений за результатами випробувань. Він обчислюється з урахуванням **плану експерименту** й **обсягу вибірки**.
- Зазвичай за умови проведення біологічних випробувань та тестів береться **95 % двосторонній довірчий інтервал**.
- Методи математичної статистики використовуються для обчислення меж такого довірчого інтервалу, для якого з **довірчою імовірністю 95 %** справедливе твердження, що він **містить справжнє значення показника ефективності**, який оцінюється.
- Прийнятність цієї точності для Фармакопеї залежить від встановлених у ній вимог, які стосуються конкретного випробовуваного лікарського засобу.



- Деякі випробовування та тести (наприклад, визначення титру вірусу) не передбачають вираження активності випробовуваного зразка через активність стандарту.
- *В таких випробуваннях визначають середню (50 %) ефективну дозу, тобто дозу, позитивні відгуки (ефекти) від дії якої становлять 50 % одиниць (ЕД50).*
- *Тоді не потрібно співвідносити цю дозу зі стандартним препаратом. Стандартний препарат може бути в цьому разі використаний факультативно з метою валідації випробовування.*



Нові підходи Фармакопеї до біологічних випробувань

- У випадках, де це можна застосувати, повна або часткова заміна методів *in vivo* на методи *in vitro*, що відповідає положенню Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях.
- Стаття 5.2.14. **ЗАМІНА МЕТОДУ(ІВ) *IN VIVO* НА МЕТОД(И) *IN VITRO* ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ВАКЦИН**



Заміна методів *in vivo* на методи *in vitro*

- Важливо на етапі розробки лікарського засобу розглянути можливість використання методів *in vitro* для контролю якості та зрозуміти, що використання кількісних визначень *in vivo* не є обов'язковим
- Першочерговим завданням для впровадження будь-яких запропонованих методів *in vitro* в систему контролю якості має бути наукова актуальність кількісних випробувань *in vitro* для контролю відповідних показників якості.
- Будь-які методи *in vitro* мають відповідати чинним вимогам щодо валідації.



Заміна методів *in vivo* на методи *in vitro*

- **значне скорочення кількості тварин, що використовується в випробуваннях**

(Коли аналітик має достатній досвід роботи з методом, можливе застосування спрощеної моделі, такої як одиничне розведення випробовуваного лікарського засобу та стандартного препарату. Така модель дозволяє аналітику встановити, чи є активність випробовуваного лікарського засобу значно вище мінімально необхідної, але не дає інформації з лінійності, паралельності та криву доза-відповідь)

- **часткова заміна під час рутинного контролю**
- **повна заміна деяких випробувань у цілому**



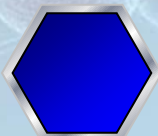
Нові статті ДФУ 2.6 (проект) із біологічних методів аналізу

- 2.6.32. *Випробування на бактеріальні ендотоксини з використанням рекомбінантного фактору С*
- 2.6.34. *Кількісне визначення білків клітини-хазяїна*
- 2.6.35. *Кількісне визначення та характеризувannya залишкової ДНК клітини-хазяїна*

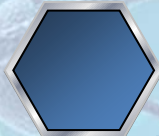


Контроль лікарських засобів, що містять серцеві глікозиди

- до ДФУ введено індивідуальні монографії на *Конвалії листя* та *Конвалії траву*
- а також статтю щодо біологічних методів контролю *2.7.N 1 Кількісне визначення серцевих глікозидів методом in vivo*
- для проведення випробування серцевих глікозидів спеціалісти ДП “Фармакопейний центр” розробили та атестували стандартні зразки (ФСО ДФУ та БПС ДФУ).
- наприклад: *ФСЗ ДФУ конвалії екстракт сухий* та *БПС ДФУ конвалії*.



Серцеві глікозиди



висока кардіологічна активність



спрямованість ефектів на життєво важливі органи та системи



малий терапевтичний індекс



застосування у кардіо- та геріатричних пацієнтів





Серцеві глікозиди

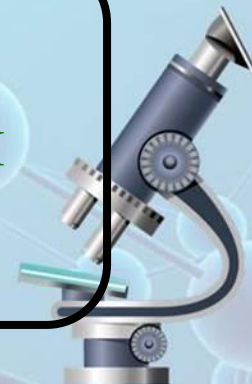
Методи кількісної оцінки серцевих глікозидів

**Фармакопейні
методи**

Фізико-хімічні



Біологічні
(визначення
активності)



Серцеві глікозиди

- **фізико-хімічні методи** (фотоколориметричний, спектрофотометричний, флюориметричний, газорідинна хроматографія) не завжди дають змогу якісно провести контроль та встановити кількісний вміст серцевого глікозиду, передбачити його фізіологічну активність
- виникає потреба у **біологічному оцінюванні** методом *in vivo*.



Серцеві глікозиди

- Біологічна оцінка заснована на здатності серцевих глікозидів у токсичних дозах викликати систолічну зупинку серця тварин
- Активність серцевих глікозидів оцінюють у порівнянні з активністю стандартних зразків або стандартних препаратів та виражають в одиницях дії (ОД)





Дякую за увагу

<http://sphu.org/>

ДП “Фармакопейний центр”

nelkish@gmail.com

ph.ukr.spc.biol@gmail.com

Кишинець Неля

