

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Биологические испытания

ОФС.1.2.4.0001.15

инсулина

Взамен ОФС 42-0009-02

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на лекарственные средства, стандартные образцы и аналоги инсулина.

Биологические методы испытания инсулина основаны на сопоставлении гипогликемического (сахаропонижающего) действия испытуемого препарата (ИП) с гипогликемическим действием стандартного образца (СО) инсулина или соответствующих СО его аналогов. Биологические методы используют для определения следующих показателей качества:

- биологическая активность (раздел 1);
- биоидентичность (раздел 2);
- пролонгированное действие (раздел 3).

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Биологические испытания инсулина и его аналогов отражают их терапевтическое действие. Показатель «Биологическая активность» позволяет количественно определять содержание гипогликемического действующего вещества. Данное определение может проводиться для аттестации СО инсулина при отработке новых производственных технологий для оценки качества и в ходе проверки стабильности в процессе установления срока годности (раздел 1).

Показатель «Биоидентичность» используется для подтверждения подлинности лекарственных средств инсулина или его аналогов по наличию

у них гипогликемического действия (раздел 2).

«Пролонгированное действие» – показатель качества лекарственных препаратов инсулина удлинённого действия и их аналогов, который характеризует продолжительность гипогликемического эффекта во времени. Данный показатель является обязательным для всех пролонгированных препаратов и аналогов инсулина (раздел 3).

СО для биологических испытаний представляет собой активное вещество (инсулин человека, инсулин свиной, инсулин крупного рогатого скота, аналоги инсулина), обладающее гипогликемическим действием с указанием точной величины биологической активности, выраженной в международных единицах действия (МЕ) в пересчете на сухое вещество.

Допускается многократное использование животных для биологических испытаний лекарственных средств и аналогов инсулина: кроликов – не ранее чем через 2 недели, мышей не ранее чем через 1 неделю после проведения предыдущего испытания.

Примечания.

1. Приготовление основных растворов СО и ИП. Для проведения биологических испытаний готовят основной раствор СО инсулина или его аналога.

Точную навеску СО инсулина растворяют в соответствующем объеме растворителя для получения концентрации 100 МЕ/мл. В качестве растворителя применяют 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций, подкисленный 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до рН 2,5–3,5. В фармакопейных статьях на аналоги инсулина могут быть указаны другие растворители.

Основной раствор следует хранить при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Можно использовать только прозрачный раствор.

При определении биологической активности субстанции инсулина основной раствор ИП готовят таким же образом, что и основной раствор СО. Разведение субстанции проводят, исходя из величины биологической активности инсулина с учетом фактического содержания влаги.

2. Приготовление рабочих растворов СО и ИП. Рабочие растворы СО и ИП готовят из основных растворов непосредственно перед испытанием, добавляя соответствующие объемы растворителя до получения требуемых концентраций. В качестве растворителя применяют 0,9 % раствор натрия

хлорида для инъекций, подкисленный 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до рН 2,5 – 3,5.

При определении биологической активности лекарственных препаратов инсулина пролонгированного действия, представляющих собой суспензии, ИП осторожно взбалтывают и отбирают 1,0 мл, к которому для полного растворения суспензии добавляют 0,2 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Таким образом, если исходная концентрация ИП равна 100 МЕ/мл, то полученный раствор ИП будет иметь концентрацию 83,3 МЕ/мл. В дальнейшем полученный раствор используют для приготовления рабочих растворов ИП.

Основные и рабочие растворы аналогов инсулина готовят, как указано в фармакопейных статьях.

ИСПЫТАНИЯ

Раздел 1. Биологическая активность

Биологическую активность субстанций инсулина, его лекарственных форм и аналогов определяют одним из 2 методов по снижению концентрации глюкозы в крови:

- кроликов (метод А);
- мышей (метод В).

Метод определения биологической активности инсулина и его аналогов по снижению концентрации глюкозы в крови кроликов (метод А)

Испытания проводят на кроликах породы Шиншилла, массой тела от 2,5 кг. В опыте используют не менее 24 кроликов. Животных содержат на стандартном рационе с соблюдением санитарных правил. За 18 – 20 ч до эксперимента животных лишают корма, а перед началом испытания убирают воду.

Непосредственно перед экспериментом из основных растворов СО и ИП готовят по 2 рабочих раствора (см. Общие положения примечания 1 и 2). В зависимости от чувствительности животных рекомендуемые концентрации рабочих растворов СО для лекарственных средств инсулина – 1,0 и 2,0 МЕ/мл, а для аналогов инсулина – в диапазоне 1,0 – 4,0 МЕ/мл.

Животных распределяют на 4 равные группы способом случайного отбора. Каждая группа животных получает рабочие растворы СО и ИП в

порядке, предусмотренном схемой двойного перекреста (табл.). Первой и второй группе животных подкожно вводят рабочие растворы СО в объеме 0,5 мл на животное (малая – s_1 и большая – s_2 дозы СО), а третьей и четвертой группе – такой же объем рабочих растворов ИП (малая – u_1 и большая – u_2 дозы). Вторую постановку теста («перекрест») проводят не менее чем через неделю после первой.

Таблица – Схема двойного перекреста (последовательность введения рабочих растворов животным)

Испытание	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
I постановка (день I)	s_1	s_2	u_1	u_2
II постановка (день II)	u_2	u_1	s_2	s_1

Взятие крови осуществляют трижды: непосредственно перед введением испытуемых растворов и через 1 и 2,5 ч после инъекции препарата. Примерно 50 мкл крови из краевой вены уха собирают в микроцентрифужную пробирку объемом 0,5 мл, содержащую 10 мкл раствора гепарина (5000 МЕ/мл).

Концентрацию глюкозы в крови животных определяют согласно разделу 4. Устанавливают среднюю величину, на которую снижается концентрация глюкозы в крови через 1 и 2,5 ч после введения рабочего раствора СО и ИП инсулина у каждого животного и выражают ее в процентах по отношению к исходной.

Из опыта исключают животных, которые отвечают судорогами на введение инсулина и тех, у которых снижение концентрации глюкозы в крови составляет менее 15 % по отношению к исходному уровню.

Результаты опыта обрабатывают согласно подразделу 3.6 «Обработка результатов двойного перекреста (на примере биологической активности инсулина методом А и В)» ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Метод определения биологической активности инсулина по снижению концентрации глюкозы в крови мышей (метод В)

В опыт берут не менее 40 мышей-самок массой тела 20 – 28 г. Животных распределяют на 4 равные группы способом случайного отбора и метят (нумеруют) по порядку каждую особь внутри группы. Мышей содержат на стандартном рационе вивария с соблюдением санитарных правил. До и во время опыта животным должен быть обеспечен свободный доступ к корму и воде.

Непосредственно перед экспериментом из основных растворов СО и ИП готовят по 2 рабочих раствора (см. Общие положения, примечания 1, 2). Концентрация рабочих растворов должна находиться в диапазоне 0,06 – 1,2 МЕ/мл. Для аналогов инсулина возможно применение других концентраций. Большая доза рабочих растворов СО и ИП должна превышать малую не менее чем в 2 раза.

Согласно схеме двойного перекреста (табл.), мышам первой и второй группы подкожно в холку вводят рабочие растворы СО, а третьей и четвертой – такие же объемы рабочих растворов ИП по 0,1 мл/10 г массы тела животного. Рабочие растворы вводят каждому животному последовательно, в соответствии с нумерацией, через каждые 15 – 20 с. Так, например, на введение раствора группе из 12 животных необходимо 3 – 4 мин. Интервал между введениями рабочих растворов каждой группе животных должен составлять 1 – 2 мин.

После инъекции инсулина через (40 ± 1) мин последовательно в соответствии с номером каждого животного внутри группы из орбитального венозного синуса глаза осуществляют взятие около 50 мкл крови с помощью стерильного гепаринизированного капилляра. Необходимо соблюдать те же временные интервалы, что и при введении растворов. Пробы крови помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 0,5 мл. Определение концентрации глюкозы в крови животных проводят согласно разделу 4.

Вторую постановку эксперимента (перекрест) проводят через 24 ч

после первой.

Результаты опыта обрабатывают согласно подразделу 3.6 «Обработка результатов двойного перекреста (на примере биологической активности инсулина методом А и В)», описанному в ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Если в фармакопейной статье даны иные указания, то следуют им.

Раздел 2. Биоидентичность

Определение биоидентичности представляет собой вариант метода определения биологической активности инсулина и его аналогов, подтверждающий подлинность препарата с использованием минимального количества животных. Испытание проводят аналогично разделу 1 (метод А или В) со следующими изменениями:

1. В опыт берут 8 кроликов по 2 в каждой группе (метод А) или 20 мышей по 5 в каждой группе (метод В).

2. Не вычисляют доверительные границы величины биологической активности, так как используемое количество животных не позволяет провести статистическую обработку результатов. Метод является полуколичественным.

Препарат считают прошедшим испытание, если его биологическая активность составляет не менее 56 % от ожидаемой.

Если в фармакопейной статье даны иные указания, то следуют им.

Раздел 3. Пролонгированное действие лекарственных препаратов инсулина

Используют кроликов одного пола массой не менее 2,5 кг, которых содержат на стандартном рационе вивария. В опыт берут не менее 18 животных, которых способом случайного отбора распределяют на 2 равные группы. За 18–20 ч до исследования кроликов лишают корма, а перед опытом убирают воду.

Животным подкожно вводят одинаковую дозу основного раствора СО или неразведенного ИП (см. Общие положения примечание 1). Рекомендуемый диапазон доз составляет 0,5 – 0,8 МЕ/кг. Взятие крови проводят непосредственно перед инъекцией, а также через 1,5; 3,0; 4,5 и 6,0 ч после нее. Процедура взятия крови описана в разделе 1 (метод А). Определение концентрации глюкозы в крови животных проводят согласно разделу 4.

За контрольную временную точку принимают момент времени, при котором через 4,5 – 6 ч после инъекции средняя концентрация глюкозы в крови животных, получивших основной раствор СО, приблизится к 100 ± 15 % от исходного уровня. В этой точке для каждого кролика рассчитывают индивидуальную концентрацию глюкозы в крови в процентах относительно исходного уровня для данного животного.

Испытуемый препарат считают прошедшим испытание, если в контрольной временной точке у животных, получивших ИП, средняя относительная концентрация глюкозы в крови, рассчитанная из индивидуальных концентраций, достоверно ниже, чем у животных, получивших основной раствор СО. Достоверность различия проверяют с помощью критерия Стьюдента при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Результаты опыта обрабатывают согласно подразделу 3.8 «Обработка результатов испытания на пролонгированное (удлиненное) действие лекарственных препаратов инсулина и его аналогов» ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Раздел 4. Определение концентрации глюкозы в плазме животных

Для определения концентрации глюкозы в плазме кроликов и мышей рекомендуется применять глюкозооксидазный метод с использованием многоканального фотоэлектроколориметра.

После каждого взятия крови пробы центрифугируют в течение 5 мин при температуре 5 °С и при величине относительного центробежного

ускорения (ОЦУ), равной 1500 g (см. Примечание). От каждой пробы отбирают по 10 мкл плазмы и переносят в микрокювету плоскодонного 96-луночного планшета. Планшет с пробами можно хранить при температуре от 6 до 8 °С до окончания испытания.

Перед измерением в каждую микрокювету с плазмой добавляют по 240 мкл реактива готового энзимо-хромогенного набора, например «GLUCOSE Liquidolor» или аналогичного. Планшеты инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение не менее 20 мин.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 492 нм.

В качестве раствора сравнения используют стандартный раствор глюкозы с концентрацией 5,55 ммоль/л (100 мг %), входящий в состав готового энзимо-хромогенного набора.

Концентрацию глюкозы (c) в крови рассчитывают по формуле:

$$c = \frac{A}{A_0} \cdot 100 \text{ мг\%,}$$

где A – оптическая плотность пробы;

A_0 – оптическая плотность глюкозы в растворе сравнения.

Примечание. Величина ОЦУ зависит от радиуса ротора центрифуги и скорости его вращения. Скорость вращения v (об/мин) для обеспечения необходимой величины ОЦУ (в данном случае 1500 g) вычисляют по следующей формуле:

$$v = \sqrt{\frac{1500}{r \cdot 11,18 \cdot 10^{-6}}},$$

где r – радиус ротора центрифуги см;

$11,18 \cdot 10^{-6}$ – константа.