

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, 3, к. 245

2 – ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, 3, к. 245

3 – ООО «Завод «Медсинтез», 620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. 8-е Марта, 90а

1 – St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 3, Zavodskaya str., Kuzmolovo, Vsevoloski district, Leningrad region, 188663, Russia

2 – RMC «HOUSE OF PHARMACY», 3, Zavodskaya str., Kuzmolovo, Vsevoloski district, Leningrad region, 188663, Russia

3 – LLC «Zavod Medsintez», 90a, 8 Marta Str., Ekaterinburg, 620014, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: spbpharm@mail.ru  
Тел.: 8 (812) 603 24 32

## ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА «АНОМАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ» ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ ИНСУЛИНА

В.М. Косман<sup>1\*</sup>, К.Л. Крышень<sup>2</sup>, А.А. Крышень<sup>2</sup>, М.В. Гаврилин<sup>3</sup>,  
О.Н. Пожарицкая<sup>1</sup>, М.Н. Макарова<sup>1</sup>

**Резюме.** Тест «Аномальная токсичность» является обязательным в Российской Федерации для стандартизации субстанций биологического происхождения, несмотря на неоднозначную оценку его целесообразности. Изучение аномальной токсичности субстанции инсулина по стандартной методике невозможно, поскольку его введение вызывает гибель животных в результате гипогликемического шока. Изменение фармакопейной методики определяет необходимость её последующей валидации. На примере субстанции человеческого генно-инженерного инсулина «Росинсулин» (ООО «Завод «Медсинтез») с использованием в качестве биологической тест-системы аутбредных мышей-самцов установлены оптимальные условия выполнения теста, включающие внутрибрюшинное введение раствора глюкозы за 60 мин до внутривенного введения инсулина. Оценено изменение показателей интоксикации, массы тела и уровня глюкозы в крови при выполнении теста для трех серий субстанции. Методика теста «Аномальная токсичность» валидирована по показателям «Робастность» (с оценкой влияния малых изменений объема вводимого раствора инсулина и времени между введением раствора глюкозы и инсулина) и «Прецизионность» (внутридневная и междневная). Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным показателям.

**Ключевые слова:** тест «Аномальная токсичность», субстанция инсулина, стандартизация, валидация.

### ABNORMAL TOXICITY TEST VALIDATION FOR INSULIN SUBSTANCE STANDARDISATION

V.M. Kosman<sup>1\*</sup>, K.L. Kryshen<sup>2</sup>, A.A. Kryshen<sup>2</sup>, M.V. Gavrilin<sup>3</sup>, O.N. Pozharitskaya<sup>1</sup>, M.N. Makarova<sup>2</sup>

**Abstract.** Abnormal Toxicity test is obligatory in the Russian Federation for standardisation of biological origin substances, despite an ambiguous assessment of its expediency. Evaluation of abnormal toxicity of insulin by a standard technique is impossible because its introduction causes death of animals as a result of hypoglycemic shock. A change in pharmacopoeial technique defines need of its validation. On the example of substance of human genetically engineered insulin Rosinsulin (LLC «Zavod Medsintez») with mice males as biological test system the optimum conditions of the test were proposed. They include intraperitoneal introduction of glucose solution in 60 min, prior to intravenous administration of insulin. Indicators of intoxication, body weight and blood glucose level were monitored during the test for three batches of insulin substance. Abnormal Toxicity test was validated on Robutness (with influence of small changes of volume of the entered solution of insulin and time between introduction of glucose and insulin solutions) and a Precision (intra-day and inter-day). Satisfactory results for all validation parameters were received.

**Keywords:** Abnormal Toxicity test, insulin substance, standardization, validation.

## ВВЕДЕНИЕ

Валидация является неотъемлемой частью системы обеспечения качества. Прошедший валидацию процесс гарантирует, что все серии одного и того же продукта однородны и соответствуют требованиям действующей нормативной документации [1]. Валидация – документированное подтверждение соответствия оборудования, условий производства, технологического процесса, качества полупродукта и готового продукта действующим регламентам и/или требованиям нормативной документации [2].

Применение валидации выгодно производителям готовой продукции, так как позволяет не только предотвратить возникновение ошибок во время производственного цикла, но и обеспечить выпуск

доброкачественных препаратов при снижении брака готовой продукции. Кроме того, хорошо разработанная и сосредоточенная на важнейших моментах производства валидация повышает воспроизводимость технологии и качество продукции [3].

Тест «Аномальная токсичность» является биологическим испытанием, применяемым в оценке качества фармацевтических субстанций [4]. Соответствующие разделы включены в большинство ведущих мировых фармакопей [5].

Основной целью проведения данного теста является выявление токсичности препарата, превышающей установленный ранее допустимый уровень, контролируемый по повышению летальности или по неожиданным (нерегламентированным) явлениям интоксикации живот-

ных. Данное испытание позволяет определить аномальную (повышенную) токсичность лекарственного препарата, которая может возникнуть за счет появления продуктов разложения или нежелательных примесей при изменении процесса производства, не предусмотренных регламентом, транспортирования или хранения [6].

Испытанию на аномальную токсичность подлежат вещества природного происхождения, лекарственные средства, получаемые из крови, органов, тканей человека или животного, растительного сырья, микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, при производстве из них готовых лекарственных форм, в основном для парентерального применения [6].

Примером подобных препаратов является субстанция инсулина, производство которой осуществляется биотехнологическим способом. Качество получаемой субстанции контролируют по ряду показателей, в том числе примесям родственных белков, примесям высокомолекулярных белков, проинсулиноподобной иммунореактивности, примесям ДНК штамма-продуцента, примесям иммунореактивных белков *Escherichia coli*, примесям одноцепочечного предшественника инсулина. Тем не менее не исключена возможность накопления в субстанции в процессе производства белков с высоким уровнем токсичности и неизвестной природой. Поэтому для подобных препаратов проводят испытание на аномальную токсичность.

Мнение о целесообразности данного теста весьма неоднозначно. В работе [5] проведен подробный анализ исторических и научных данных о проведении теста на аномальную токсичность. Авторы отмечают особенности проведения испытания, его неспецифичность, низкие воспроизводимость и надежность, отсутствие корреляции результатов теста с качеством продукции или загрязнением, непригодность теста для предусмотренного назначения. Поэтому они считают полное удаление этого испытания из фармакопей и других регуляторных требований, поддерживаемое рядом международных экспертов и реализованное в ряде частных монографий, включенных в зарубежные фармакопеи (прежде всего в Европейскую Фармакопею), обоснованным. Одним из доводов в пользу такой позиции является забота о благополучии животных, подкрепленная, например, инициативой 3Rs и другими современными директивами по защите животных [7, 8].

Авторы [9], напротив, считают, что тест на аномальную токсичность, разработанный на доклиническом этапе исследований, должен быть обязательным для серийно выпускаемых биотехнологических препаратов и биоаналогов.

В работе [10] отмечено, что при сохранении общемировой тенденции к исключению теста «Аномальная токсичность» из нормативных документов и оценке безопасности лекарственных средств с помощью аль-

тернативных методов роль данного теста в России достаточно высока, особенно для субстанций биологического происхождения.

В Российской Федерации данный тест в настоящее время является обязательным для субстанций соответствующего типа (ОФС 1.2.4.0004.15 «Аномальная токсичность» [6]). Стандартная методика проведения исследования аномальной токсичности препаратов включает в себя парентеральное введение лекарственного средства пяти аутбредным мышам с последующим наблюдением за животными в течение 48 часов после введения препарата. Исследуемый препарат проходит испытание (отсутствует аномальная токсичность), если не зарегистрированы снижение массы тела, признаки интоксикации и гибель животных [6].

Оценка аномальной токсичности субстанции инсулина по стандартной методике невозможна, поскольку его введение вызывает гибель животных в результате гипогликемического шока. Поэтому необходимо изменение стандартной методики и разработка соответствующего раздела частной фармакопейной статьи. Внесение изменений в фармакопейную методику определяет необходимость её последующей валидации [6, 11].

Целью данного исследования являлась оптимизация и валидация методики оценки аномальной токсичности субстанции инсулина (производитель ООО «Завод «Медсинтез», Россия) при однократном внутривенном введении самцам аутбредных мышей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись опытно-промышленные образцы трех серий субстанции человеческого генно-инженерного инсулина «Росинсулин» (ООО «Завод «Медсинтез», Россия), соответствующие по качеству требованиям статьи «Human insulin» Европейской Фармакопеи (PhEu 8.0) [12].

В качестве тест-системы использованы аутбредные мыши-самцы массой 19–21 г [6] (ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»), которых содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях [7], на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92 [2]). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам надлежащей лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014) и одобрены на заседании биоэтической комиссии ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

В экспериментах использовали внутривенный способ введения тестируемых препаратов в хвостовую вену животных. Для проведения исследования использовали дозу 12 МЕ/кг, рассчитанную с учетом метаболических коэффициентов на основании инди-

видуальной суточной потребности в инсулине (согласно инструкции по применению препарата). Растворы тестируемых субстанций (с концентрацией 2,4 МЕ/мл, 1 МЕ соответствует 0,0347 мг) готовили непосредственно в день введения. В качестве растворителя использовали 0,9% раствор натрия хлорида для инъекций («Б. Браун Мельзунген АГ», Германия), подкисленный 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты (ООО «Экохим», Россия) до pH 2,5-3,5. Объем введения составлял 100 мкл / мышь массой 20 г. Методика подготовки тестируемых субстанций, выбор доз и объема введения отработан нами в ходе предварительных экспериментов.

Перед введением инсулина животным вводили раствор глюкозы [глюкоза (декстроза), раствор для инфузий 5%, ООО «Завод «Медсинтез», Россия] внутривенно в объеме 1 мл на животное.

У животных регистрировали следующие показатели:

- массу тела до введения глюкозы, через 24 и 48 часов после введения;
- уровень глюкозы в крови и признаки интоксикации до введения глюкозы, перед введением тестируемого препарата, через 60 минут после введения тестируемого препарата, через 24 часа и 48 часов после введения тестируемого препарата.

Животных лишали корма за 4 часа до начала манипуляций, доступ к воде при этом не был ограничен. Животные были обеспечены кормом через час после последнего измерения глюкозы в крови.

Массу тела экспериментальных животных регистрировали на электронных весах Vibra AJ-1200CE (Япония), анализ уровня глюкозы в крови был проведен с помощью глюкометра One Touch® Horizon™ (США).

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Были рассчитаны среднее значение ( $\bar{X}$ ), стандартная ошибка среднего (SE), стандартные отклонения (SD) и относительные стандартные отклонения (RSD, %), межгрупповые различия были проанализированы параметрическими методами, различия определены при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

В план валидации метода включена его оценка по валидационным показателям прецизионность и прочность. В экспериментах по оценке прочности метода варьировали объем вводимого препарата и время между введением раствора глюкозы и инсулина. Прецизионность на уровне сходимости (повторяемости) оценена по результатам трех серий экспериментов, выполненных в один день, – внутрисуточная прецизионность, и по результатам трех серий экспериментов, выполненных в три разных дня, – междневная прецизионность. Внутрисуточная прецизионность (intra-day precision) и междневная прецизионность (inter-day precision) не должны превышать 15% (RSD) [13, 14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное исследование включало три этапа:

- отработку теста с варьированием временного интервала между введением растворов глюкозы и инсулина;
- анализ трех серий (согласно ОСТ 91500.05.001-00 [15]) субстанции в оптимальных условиях;
- выполнение валидационных процедур.

Кроме регистрации изменения массы тела, интоксикации и гибели животных при выполнении теста «Аномальная токсичность», для субстанции инсулина целесообразным является анализ уровня глюкозы в крови. С одной стороны, этот показатель является маркером развития гипогликемии, характерной для биологического действия инсулина. С другой стороны, введение данного показателя решает одну из важных проблем оценки результатов теста. Одной из особенностей теста «Аномальная токсичность» является отсутствие каких-либо количественных критериев и/или показателей, получаемых при его выполнении. Гибель животных, как основной критерий теста, является оценкой в бинарной системе «да»/«нет». Такая оценка трудно поддается статистической обработке и недостаточна для определения валидационных параметров методик. Введение количественной характеристики – в данном случае оценки уровня глюкозы в крови – создает предпосылки для более корректной оценки результатов.

Для предотвращения гипогликемического шока инсулин следует вводить мышам внутривенно через определенное время после внутривенного введения раствора глюкозы. В задачу первого этапа исследования входила отработка теста для субстанции инсулина, включавшая выбор оптимального временного интервала между введениями (15 мин, 30 мин, 60 мин).

Первые симптомы токсического влияния исследуемого препарата были зарегистрированы через 60 мин после внутривенного введения раствора тестируемого препарата в дозе 12 МЕ/кг в объеме 100 мкл/мышь. У экспериментальных животных наблюдали угнетение поведения, снижение реакции на раздражители, повышение тонуса мускулатуры, одышка, вынужденное положение тела в пространстве – лежа на брюхе либо на боку. Через 24 часа после внутривенной инъекции раствора тестируемого препарата признаки интоксикации проходили. Животные были в удовлетворительном состоянии. Гибель животных вследствие гипогликемического шока была зарегистрирована в контрольных группах самцов, которые не получали внутривенную инъекцию раствора глюкозы перед внутривенным введением инсулина. Аналогичную картину интоксикации наблюдали и на последующих этапах исследования.

Массу тела экспериментальных животных регистрировали непосредственно перед введением тестируемого препарата, далее через 24 часа и 48 часов. До начала исследования масса тела между экспериментальными группами не различалась. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) не выявил статистически значимых отличий между группами, получившими инъекцию «Росинсулина» с разными временными интервалами после введения глюкозы.

Уровень глюкозы в крови экспериментальных животных измеряли натошак перед внутрибрюшинным введением раствора глюкозы, непосредственно перед внутривенной инъекцией «Росинсулина» (через 15, 30 и 60 мин), далее через 60 мин после введения тестируемого объекта, и через 24 часа и 48 часов (таблица 1).

До начала исследования уровень глюкозы между группами не отличался (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Динамика уровня глюкозы также не отличалась между группами в регистрируемых временных промежутках.

Поскольку достоверной разницы между временем введения «Росинсулина» и уровнем глюкозы в крови обнаружено не было, для проведения следующих этапов эксперимента был выбран интервал 60 мин после внутрибрюшинного введения раствора глюкозы.

Результаты теста для трех серий субстанции «Росинсулина», полученные при выполнении второго экспериментального этапа, схожи с данными, приведенными выше. Через 60 мин после инъекции инсулина наблюдали проявление признаков интоксикации (с близкой степенью выраженности), исчезавших к 24 часам после введения тестируемого препарата. Динамика массы тела экспериментальных животных в группах, получивших глюкозу, сохраняла положительную динамику в период наблюдения; статистических отличий по массе между группами, получившими инъ-

екцию трех серий «Росинсулина», и контрольной группой не было зарегистрировано. Уровень и динамика уровня глюкозы между группами, получившими глюкозу внутрибрюшинно, в регистрируемых временных промежутках не отличалась. Таким образом, уровень глюкозы при введении трех различных серий раствора субстанции «Росинсулина» не отличался между группами.

На третьем этапе был выполнен ряд валидационных испытаний. Процесс валидации является обязательным в практике качественного производства медицинской продукции и является важной частью системы обеспечения и контроля качества. Валидация метода оценки аномальной токсичности выполнена в соответствии с рекомендациями [11]. Основными валидационными параметрами методики являются специфичность, линейность, прецизионность, точность и робастность [11]. Следует подчеркнуть, что полная валидация обсуждаемой методики в соответствии с привычной схемой и пониманием, применяемым к химическим и/или физико-химическим и даже биологическим методикам, используемым в стандартизации лекарственных препаратов, в данном случае неприменима. Неизвестны конкретные токсины, вызывающие положительный результат теста «Аномальная токсичность», поэтому затруднительно оценить специфичность методики. Специфичность может быть рассмотрена только в таком аспекте: есть токсины – есть гибель животных – результат теста положительный; нет токсинов – нет гибели животных – результат отрицательный. По отношению к присутствию токсинов методика специфична, по отношению к их природе – нет, что и вызывает дискуссию относительно целесообразности самого теста [5]. Отсутствие конкретного аналита, аналитического отклика или сигнала (площади хроматографического пика, значения оптической плотности, объема титранта, какого-либо вида биологической активности или эффекта или

Таблица 1.

Уровень глюкозы при отработке теста «Аномальная токсичность» на одной серии субстанции «Росинсулина»,  $\bar{X} \pm SE$

№ группы	Описание группы	Уровень глюкозы, моль/л				
		исходный	после введения глюкозы	через 60 мин после введения «Росинсулина»	через 24 часа после введения «Росинсулина»	через 48 часов после введения «Росинсулина»
1	без глюкозы, «Росинсулин»	7,7 ± 0,28 n=5	–	2,5 ± 0,16 n=5	9,7* n=1	–
2	глюкоза, «Росинсулин» через 15 минут	7,8 ± 0,24 n=5	9,4 ± 0,28 n=5	2,7 ± 0,17 n=5	7,5 ± 0,35 n=5	7,8 ± 0,16 n=5
3	глюкоза, «Росинсулин» через 30 минут	7,9 ± 0,21 n=5	9,9 ± 0,17 n=5	2,7 ± 0,17 n=5	8,2 ± 0,25 n=5	8,1 ± 0,19 n=5
4	глюкоза, «Росинсулин» через 60 минут	7,8 ± 0,26 n=5	10,5 ± 0,44 n=5	2,9 ± 0,19 n=5	8,4 ± 0,30 n=5	7,8 ± 0,17 n=5

Примечание: \* – статистическую обработку данных этой группы не проводили в связи с гибелью четырех животных из пяти.

иного специфического количественного параметра) не позволяет оценить линейность отклика в зависимости от концентрации аналита (с получением соответствующего уравнения регрессии и его параметров), а также точность методики. Поэтому в качестве параметров валидации метода были выбраны только два критерия, которые могут быть применены к рассматриваемому тесту, – прецизионность и робастность. Данный подход, с нашей точки зрения, позволяет удовлетворить требованию о необходимости валидации методики, отличающейся от приводимой в ГФ [6, 11]. При обсуждении результатов наибольшее значение имеют данные по содержанию уровня глюкозы в крови, как основной (хотя и косвенный) количественный показатель, оцениваемый в ходе выполнения теста.

Оценка робастности была проведена по двум параметрам: влиянию объема раствора «Росинсулина» для внутривенного введения (в диапазоне 90, 100 и 110% от номинального или 90, 100 и 110 мкл/мышь) и влиянию времени между введением раствора глюкозы и «Росинсулина» (в диапазоне 90, 100 и 110% от номинального или 54, 60 и 66 мин после введения раствора глюкозы).

Результаты, полученные при оценке влияния объема раствора «Росинсулина» для внутривенного введения на уровень глюкозы в крови животных, представлены в таблице 2.

Для каждого из объемов введения на каждой контрольной точке, а также при усреднении всех данных по каждой контрольной точке относительные стандартные отклонения полученных значений уровня

глюкозы в крови животных не превышали 15%. Таким образом, варьирование объема раствора «Росинсулина» для внутривенного введения в интервале 90–110% от номинального не оказало значимого влияния на результаты теста.

Данные, полученные при оценке влияния времени между введением раствора глюкозы и инсулина на уровень глюкозы в крови животных при проведении теста «Аномальная токсичность», представлены в таблице 3.

Для каждого из интервалов между введениями на каждой контрольной точке, а также при усреднении всех данных по каждой контрольной точке относительные стандартные отклонения полученных значений уровня глюкозы в крови животных не превышали 15%. Таким образом, варьирование времени между введением раствора глюкозы и «Росинсулина» в интервале 90–110% от номинального не оказывает значимого влияния на результаты теста «Аномальная токсичность».

Прецизионность была оценена по результатам трех серий эксперимента, выполненных в один день, – внутрисуточная прецизионность (intra-day precision) и по результатам трех серий эксперимента, выполненных в три разных дня, – междневная прецизионность (inter-day precision). Мерой прецизионности является величина относительного стандартного отклонения (RSD,%), полученная при усреднении результатов измерений. Данные по уровню глюкозы в крови, полученные при оценке прецизионности, представлены в таблице 4.

Таблица 2.

Оценка влияния объема раствора «Росинсулина» для внутривенного введения в тесте «Аномальная токсичность»

Объем введения, % от номинального	Параметр	Время измерения				
		Исходная	После введения раствора глюкозы	Через 60 мин после введения «Росинсулина»	Через 24 часа после введения «Росинсулина»	Через 48 часов после введения «Росинсулина»
90	$\bar{X} \pm SD$	7,5±0,8	10,6±0,5	2,4±0,3	7,5±1,1	7,8±0,8
	RSD, %	10,6	4,6	13,5	14,7	10,4
100	$\bar{X} \pm SD$	7,9±1,1	10,0±0,5	2,4±0,2	8,4±0,6	8,8±0,6
	RSD, %	13,9	5,4	9,0	7,4	6,3
110	$\bar{X} \pm SD$	7,1±0,7	10,2±0,7	2,9±0,3	7,1±0,6	7,1±0,7
	RSD, %	10,5	6,4	8,8	8,3	9,3
Все группы	$\bar{X} \pm SD$	7,5±0,9	10,3±0,6	2,6±0,3	7,7±0,9	7,9±1,0
	RSD, %	12,1	5,8	13,3	12,0	12,2

Таблица 3.

Оценка влияния времени между введением раствора глюкозы и «Росинсулина» в тесте «Аномальная токсичность»

Время между введением раствора глюкозы и инсулина, % от номинального	Параметр	Время измерения				
		Исходная	После введения раствора глюкозы	Через 60 мин после введения «Росинсулина»	Через 24 часа после введения «Росинсулина»	Через 48 часов после введения «Росинсулина»
90	$\bar{X} \pm SD$	7,5±0,9	10,0±1,0	2,5±0,3	6,8±0,9	7,0±0,5
	RSD, %	11,8	9,9	13,8	12,9	7,7
100	$\bar{X} \pm SD$	7,8±0,8	9,9±1,2	2,7±0,4	8,2±1,0	7,9±0,8
	RSD, %	10,3	12,5	14,3	11,5	10,1
110	$\bar{X} \pm SD$	7,2±0,7	10,1±0,8	2,6±0,4	8,1±0,6	7,6±0,7
	RSD, %	9,8	7,8	14,6	7,6	8,9
Все группы	$\bar{X} \pm SD$	7,5±0,8	10,0±1,0	2,6±0,4	7,7±1,0	7,5±0,7
	RSD, %	10,5	9,5	13,8	13,0	10,0

Таблица 4.

Уровень глюкозы в крови аутобредных мышей при оценке прецизионности в тесте «Аномальная токсичность»

День/серия эксперимента	Параметр	Время измерения				
		Исходная	После введения раствора глюкозы	Через 60 мин после введения «Росинсулина»	Через 24 часа после введения «Росинсулина»	Через 48 часов после введения «Росинсулина»
День 1 (утро)	$\bar{X} \pm SD$	7,4±0,9	10,2±0,6	2,6±0,4	8,5±1,0	8,3±0,7
	RSD, %	12,7	5,6	14,6	11,4	8,2
День 1 (день)	$\bar{X} \pm SD$	7,4±0,6	10,5±1,2	2,8±0,4	6,4±0,6	6,8±0,8
	RSD, %	8,5	11,2	14,6	6,0	11,3
День 1 (вечер)	$\bar{X} \pm SD$	8,3±0,3	10,4±0,9	2,7±0,4	7,9±0,5	6,4±0,4
	RSD, %	4,0	8,9	13,9	6,5	5,6
Внутридневная прецизионность, RSD, %		10,2	8,4	13,5	14,6	14,3
День 2 (утро)	$\bar{X} \pm SD$	7,6±0,7	10,2±1,1	2,6±0,4	8,2±1,1	7,8±1,0
	RSD, %	8,5	11,0	14,4	13,5	13,2
День 3 (утро)	$\bar{X} \pm SD$	7,5±0,8	10,4±0,8	2,5±0,4	6,9±0,7	7,2±0,4
	RSD, %	10,3	7,4	14,7	10,7	6,1
Междневная прецизионность, RSD, %		9,6	8,4	13,7	14,3	12,9

Внутридневная прецизионность (intra-day precision) на каждой контрольной точке варьировала в диапазоне 8,4–14,6% и не превышала 15%. Междневная прецизионность (inter-day precision) варьировала в пределах 8,4–14,3% и также не превышала уровня 15%, регламентируемого [13, 14].

По результатам данного этапа методика была валидирована по показателям «Робастность» (с оценкой влияния малых изменений объема вводимого раствора инсулина и времени между введением раствора глюкозы и инсулина) и «Прецизионность» (внутридневная и междневная). Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным показателям.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тест «Аномальная токсичность» является обязательным в Российской Федерации для стандартизации определенного типа субстанций (преимущественно биологического происхождения). Изучение аномальной токсичности субстанции инсулина по стандартной методике невозможно, поскольку его введение вызывает гибель животных в результате гипогликемического шока. Изменение фармакопейной методики определяет необходимость её последующей валидации.

На примере субстанции человеческого генно-инженерного инсулина «Росинсулин» (ООО «Завод «Медсинтез») с использованием в качестве биологической тест-системы аутбредных мышей-самцов установлены оптимальные условия выполнения теста, включающие внутрибрюшинное введение раствора глюкозы за 60 мин до внутривенного введения инсулина.

Оценено изменение показателей интоксикации, массы тела и уровня глюкозы в крови при выполнении теста для трех серий субстанции.

Методика теста «Аномальная токсичность» валидирована по показателям «Робастность» (с оценкой влияния малых изменений объема вводимого раствора инсулина и времени между введением раствора глюкозы и инсулина) и «Прецизионность» (внутридневная и междневная). Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным показателям.

## ЛИТЕРАТУРА

1. С.В. Шилова. Валидация процессов производства лекарственных средств // Медицинский бизнес. 2000. № 2. С. 18–20.
2. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств Good Manufacturing Practice for medicinal products (GMP).
3. В.Г. Макаров, Л.И. Соколова, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков. Эликсиры «Демидовский» и «Алтайский»: Ретроспективная валидация // Фармация, 2001. № 2. С. 18–21.
4. Е.Л. Ковалева, В.Л. Багирова, К.С. Шахназаров. Совершенствование методологических подходов к стандартизации субстанций // ХФЖ. 2010. Т. 44. № 1. С. 35–42.
5. Й.Х.О. Гарбе, С. Озборн, К. Беггс, М. Бопст, А. Йос, А.А. Киташова, О.М. Ковбасенко, К.-Д. Шиллер, М. Швингер, Н.Ю. Семенова, Л.А. Смирнова, Ф. Стодарт, Т. Визалли, Л. Вроманс. Исключение теста на аномальную токсичность как теста контроля качества: исторический анализ данных и научные знания // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 2(11). С. 184–192.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации, изд. 13-е, URL: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856> (дата обращения 02.02.2016).
7. Directive 2010/63/EU of 22/09/2010 Guide for the care and use of laboratory animals 8th edition. National Academy of Sciences. Washington, D.C. 2010.
8. R. Isbrucker, R. Levis, W. Casey, R. McFarland, M. Schmitt, J. Arciniega, J. Descamps, T. Finn, C. Hendriksen, Y. Horiuchi, J. Keller, J. Kojima, D. Sesardic, P. Stickings, N.W. Johnson, D. Allen. Alternative methods and strategies to reduce, refine, and replace animal use for human vaccine post-licensing safety testing: state of the science and future directions // *Procedia in Vaccinology*. 2011. V. 5. P. 47–59.
9. Н.П. Неугодова, Г.В. Долгова, А.В. Гавриков. Некоторые вопросы оценки токсичности генно-инженерных лекарственных препаратов // *Биомедицина*. 2011. № 3, С. 98–100.
10. М.С. Рябцева, Т.А. Батушвили, Г.А. Сапожникова, Н.П. Неугодова, Ю.В. Олефир, В.А. Меркулов. История развития и современное состояние биологических тестов в России // *Ведомости НЦЭСМП*. 2016. № 1. С. 11–14.
11. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. – М., Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации. 2007. 49 с.
12. Human insulin. European pharmacopoeia. 8th edition // *European Pharmacopoeia Commission, Council of Europe*. Strasbourg: EDQM, 2014. P. 2491.
13. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA, in: *Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1994*, pp. 1–5.
14. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA, in: *Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1996*, pp. 1–8.
15. ОСТ 91500.05.001-00 Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. М., 2000. 54 с