

М. А. Кривых, О. Г. Корнилова, Н. Д. Бунятян, Э. Ю. Кудашева, О. Б. Рунова, В. И. Малкова, О. Б. Устинникова

РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России, Россия, 127059, Москва, Петровский бульвар, д. 8

Проведены исследования по определению антикомplementарной активности препаратов иммуноглобулинов человека в различных формах выпуска. Определены оптимальные условия получения положительного контроля стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомplementарной активности. Впервые разработан отечественный стандартный образец иммуноглобулина человека для определения антикомplementарной активности, который планируется внедрить в практику для проведения оценки качества препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения по показателю "Антикомplementарная активность". Внедрение стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомplementарной активности позволит повысить достоверность оценки производственных серий препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения.

Ключевые слова: антикомplementарная активность; стандартный образец; иммуноглобулины человека; стандартизация.

Анализ фармакопейных требований, предъявляемых к биологическим методам контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), показал, что стандартные образцы (СО) играют важную роль в системе обеспечения качества ИЛП. СО широко используют в практике в качестве носителей аттестованных значений состава и свойств исследуемых веществ [1, 2].

В настоящее время в международной практике для определения антикомplementарной активности (АКА) препаратов иммуноглобулинов человека (ИГ) для внутривенного введения используют стандартный образец иммуноглобулина человека (СО ИГ) ["Human immunoglobulin (ACA and molecular size), BRP batch 1"] с аттестованными значениями АКА отрицательного контроля в диапазоне от 10 до 40 % и положительного контроля в диапазоне от 60 до 100 % [3, 4]. Положительный и отрицательный контроли подтверждают достоверность полученных результатов в различных диапазонах значений АКА. Всемирная организация здравоохранения настоятельно рекомендует использование национальных стандартных образцов, применение которых более целесообразно с экономической точки зрения для производства и оценки качества [5].

Целью настоящего исследования являлась разработка стандартного образца для определения антикомplementарной активности препаратов иммуноглобулинов человека.

Экспериментальная часть

Для разработки СО использовали образцы препаратов ИГ в различных формах выпуска с содержанием белка более 45 мг/мл, а также образцы препаратов ИГ человека, подвергшиеся термической обработке на во-

дяной бане (температура воды $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$); длительность обработки ампул составила 5 – 7 мин; флаконов – 15 мин.

При определении АКА использовали комplement морских свинок (in house), представляющий собой пул сыворотки крови не менее чем от 10 морских свинок; коммерческие наборы реагентов "Сыворотка диагностическая гемолитическая жидкая" производства ФГУП "НПО "Микроген" филиал в г. Пермь, Россия; "Антисыворотка кролика к эритроцитам барана Амбоцептор 6000" производства Siemens, Германия; "Сыворотка диагностическая гемолитическая кроличья жидкая для РСК" производства ЗАО "ЭКОлаб", Россия; кровь баранью дефибрированную с цитратом натрия производства ЗАО "ЭКОлаб", Россия; (СО ИГ) – (АКА и молекулярные параметры) BRP серия 1 (Y0001504), European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Франция.

Значения АКА определяли в реакции связывания комplementа по методике, описанной в ОФС "Определение антикомplementарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения" [6]. Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистическими методами с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($x \pm S_x$).

В работе использовали цифровой спектрофотометр PD-303S (Apel, Япония); центрифугу многофункциональную 5810R (Eppendorf AG, Германия); весы прецизионные Adventurer AR-5120 (Ohaus, США); водяную баню Julado ED-19M (Julado GmbH, Германия); термостат BD 115 (Binder, Германия); рН-метр S220 SevenCompact (Mettler Toledo AG, Китай).

Результаты и их обсуждение

Были определены требования к кандидатам в СО ИГ человека для определения антикомплементарной активности:

1. Значения АКА отрицательного контроля должны составлять менее 50 %; положительного контроля — более 50 %.

2. Содержание белка в отрицательном и положительном контроле должно быть одинаковым и составлять не менее 12,5 мг/мл.

3. Положительный и отрицательный контроли должны представлять собой раствор ИГ человека в идентичной форме выпуска.

На основании анализа международного опыта получения СО выбрано 3 направления при разработке СО ИГ человека для определения АКА.

1. *Однокомпонентный СО (аналогично СО ИГ человека BRP)*: использование коммерческой серии препарата ИГ человека для внутривенного введения (ИГВВ), отрицательный и положительный контроли формируются путем изменения исходного количества СО (0,2 и 0,6 мл для отрицательного и положительно-контроля соответственно);

2. *Двухкомпонентный СО*: отрицательный контроль — коммерческая серия препарата ИГВВ, положительный контроль — коммерческая серия препарата ИГ человека для внутримышечного введения (ИГВМ);

3. *Двухкомпонентный СО*: отрицательный контроль — коммерческая серия препарата ИГВВ/ИГВМ, положительный контроль — препарат ИГ человека, подвергшийся термической обработке.

В табл. 1 представлены результаты исследования образцов 9 серий препаратов ИГВВ, свидетельствующие о возможности использования изученных препаратов в составе однокомпонентного СО ИГ человека для определения АКА в качестве отрицательного контроля и их непригодность в качестве положительного

контроля. Таким образом, разработка однокомпонентного СО ИГ человека для определения АКА невозможна.

По мнению отечественных и зарубежных авторов, одним из факторов, обуславливающих спонтанную активацию комплемента, является присутствие в препаратах агрегированных и поврежденных при фракционировании молекул ИГ [7 – 9]. Согласно требованиям нормативной документации на препараты ИГВМ содержание полимеров и агрегатов (суммарно) не должно превышать 10 %, в препарате “Иммуноглобулин человека противоаллергический” полимеры и агрегаты должны отсутствовать.

Для оценки возможности использования препаратов ИГВМ в качестве кандидата в СО ИГ человека для определения АКА проведен ретроспективный анализ молекулярно-массового распределения молекул ИГ и последующее исследование АКА препаратов ИГВМ.

В табл. 2 представлены результаты ретроспективного анализа молекулярно-массового распределения молекул ИГ в 330 сериях препаратов ИГВМ. Содержание полимеров и агрегатов во всех исследованных сериях препаратов ИГВМ не превысило 1,32 % и соответствует требованиям, предъявляемым Европейской фармакопеей и ФС “Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения” к содержанию полимеров и агрегатов в инфузионных препаратах ИГ человека — не более 3 %, что позволило рассматривать указанные препараты в качестве кандидатов в положительный/отрицательный контроли СО ИГ человека для определения АКА [3, 10].

В табл. 3 представлены результаты исследования АКА образцов 17 серий препаратов ИГВМ, свидетельствующие о непригодности изученных препаратов в качестве кандидата в положительный контроль СО ИГ человека для определения АКА и в то же время возможности их использования в качестве отрицательного контроля.

С целью получения положительного контроля СО ИГ человека для определения АКА была проведена термическая обработка препаратов ИГ человека. Представленные в табл. 4 результаты исследований образцов препаратов ИГ человека до и после термической обработки позволили сделать вывод о том, что кратко-

Таблица 1
Антикомплементарная активность препаратов ИГ человека для внутривенного введения

ИГ человека нормальный в лекарственной форме	№ образца / количество исследований	Антикомплементарная активность, % ($\bar{x} \pm S_x$)	
		отрицательный контроль	положительный контроль
Лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения	1/6	15,7 ± 3,3	Определить невозможно*
	2/5	19,4 ± 3,8	
	3/7	22,3 ± 5,8	
Раствор для внутривенного введения	1/4	12,0 ± 2,2	Определить невозможно*
	2/4	13,0 ± 1,8	
	3/4	22,2 ± 6,4	
Раствор для инфузий	1/3	20,1 ± 3,8	Определить невозможно*
	2/5	22,4 ± 1,7	
	3/4	24,2 ± 5,2	

* — определить невозможно, т.к. минимальная степень гемолиза превышает 50 %.

Таблица 2
Молекулярно-массовое распределение молекул ИГ в препаратах ИГВМ

Препарат	Количество серий	Диапазон значений содержания полимеров и агрегатов, %
ИГ человека противостолбнячный	13	от 0,06 до 0,86
ИГ человека против гепатита В	9	от 0,09 до 1,04
ИГ человека нормальный	110	от 0,0 до 0,98
ИГ человека антистафилококковый	46	от 0,0 до 0,56
ИГ человека против клещевого энцефалита	131	от 0,0 до 1,32
ИГ человека противоаллергический	21	отсутствуют

Таблица 3
Антикомплементарная активность препаратов ИГВМ

Препарат	№ образца	Значения антикомплементарной активности, % ($x \pm S_x$), $n = 3$
ИГ человека антистафилококковый	1	43,2 ± 1,4
	2	37,4 ± 5,1
ИГ человека противостолбнячный	1	40,5 ± 1,1
	2	34,7 ± 0,8
ИГ человека нормальный	1	43,0 ± 1,3
	2	42,5 ± 1,6
	3	41,0 ± 1,9
	4	40,5 ± 2,1
	5	39,9 ± 2,4
	6	40,9 ± 1,8
ИГ человека против гепатита В	1	32,6 ± 4,8
	2	35,2 ± 3,3
ИГ человека противоаллергический	1	29,5 ± 2,3
	2	33,4 ± 1,5
ИГ человека против клещевого энцефалита	1	41,0 ± 1,5
	2	42,4 ± 1,9
	3	40,7 ± 1,8

временное прогревание образцов препаратов ИГ человека приводит к увеличению значений их АКА до диапазона, превышающего 50 % (соответствует требованиям, предъявляемым к положительному контролю).

Таким образом, проведенные исследования позволили выбрать кандидата в СО ИГ человека для определения АКА и определить оптимальные условия получения положительного контроля. СО ИГ человека для определения АКА представляет собой: отрицательный контроль — образец ИГ человека для внутривенного/внутримышечного введения, положительный контроль — образец ИГ человека для внутривенного/внутримышечного введения, подвергшийся термической обработке на водяной бане (температура воды $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$) в течение заданного времени.

DEVELOPMENT OF A REFERENCE STANDARD FOR THE DETERMINATION OF ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN

M. A. Krivikh, O. G. Kornilova, N. D. Bunyatyan, E. Yu. Kudasheva, O. B. Runova, V. I. Malkova, and O. B. Ustinnikova

Scientific Center for expert evaluation of Medicinal Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

The results of studies devoted to determination of the anticomplementary activity of human immunoglobulin preparations in various formulations are presented. Based on the obtained data, it is possible to define optimal conditions for developing a positive control – a reference standard of human immunoglobulin that can be used for determining the anticomplementary activity. The first domestic reference sample of human immunoglobulin has been developed. This standard has to be used for the quality assessment of human immunoglobulin preparations for intravenous administration in terms of “anticomplementary activity” parameter. The use of the proposed reference standard of human immunoglobulin for determination of anticomplementary activity will improve the accuracy of evaluation of commercial human immunoglobulin preparations for intravenous administration.

Keywords: anticomplementary activity; reference standard; human immunoglobulin; standardization.

Таблица 4
Антикомплементарная активность препаратов ИГ человека до и после термической обработки

Препарат, подвергшийся термической обработке	Антикомплементарная активность, % ($x \pm S_x$), $n = 7$	
	до термической обработки	после термической обработки
ИГ человека для внутримышечного введения	40,5 ± 2,1	75,8 ± 2,0
ИГ человека для внутривенного введения	21,3 ± 4,9	75,1 ± 1,8

ЛИТЕРАТУРА

1. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты)*, Ч. 2, Гриф и К, Москва (2013), сс. 323 – 348.
2. В. П. Бондарев, И. В. Борисевич, Р. А. Волкова и др., *Ведомости НЦЭСМП*, № 2, 28 – 32 (2013).
3. *European Pharmacopoeia*, 8.1 edition [Электронный ресурс] URL: <http://online6.edqm.eu/ep801/#> (дата обращения: 21.03.2014).
4. E. Sandberg, A. Costanzo, A. Daas, et al., *Pharmeuropa Bio&SN*, 1 – 15 (2012).
5. *WHO. Technical Report Series* (1994), No 840.
6. *Общая фармакопейная статья “Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения”*, утв. Приказом Минздрава России № 768 от 21.11.2014 г.; [Электронный ресурс] URL: <http://www.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 03.02.2015).
7. A. Buchacher, P. Schluga, J. Mullner, et al., *Vox. Sang.*, **98**(3), 209 – 218 (2010).
8. *Определение антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения*, Методические указания МУК 3.3.2.1063-01, Москва (2001).
9. О. Г. Корнилова, М. А. Кривых, Н. Д. Бунятян и др., *Фармация*, № 2, 43 – 46 (2015).
10. *Фармакопейная статья “Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения”*, утв. Приказом Минздрава России № 768 от 21.11.2014 г.; [Электронный ресурс] URL: <http://www.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 03.02.2015).

Поступила 15.04.15