

М. А. Кривых, О. Г. Корнилова, Н. Д. Бунтян, Е. В. Парамонова,  
Э. Ю. Кудашева, Е. В. Новикова, О. Б. Устинникова, Р. А. Волкова,  
О. В. Фадейкина

## АТТЕСТАЦИЯ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России, Россия, Москва.

Представлены материалы по аттестации и изучению стабильности впервые разработанного отечественного стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности, применяемого для оценки стабильности и приемлемости результатов испытания. По результатам проведенных исследований аттестованные значения антикомплементарной активности отрицательного контрольного стандартного образца находятся в интервале от 37,9 до 45,1 %, положительного контроля — в интервале от 73,6 до 82,8 % (с доверительной вероятностью 0,95). На основании материалов по изучению стабильности обоснован срок годности 1,5 года. Внедрение аттестованного стандартного образца в фармацевтический анализ лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения при проведении экспертизы и контроля качества в рамках государственных заданий, а также с целью подтверждения соответствия требованиям нормативной документации позволит обеспечить достоверность определения антикомплементарных свойств.

**Ключевые слова:** стандартный образец; аттестация; иммуноглобулины человека; антикомплементарная активность.

Методика определения антикомплементарной активности (АКА) лекарственных препаратов (ЛП) иммуноглобулинов человека для внутривенного введения (ИГВВ) сопряжена с рядом критических параметров [1–3], связанных с использованием биологических реагентов, таких как комплемент морских свинок, эритроциты барана и гемолитическая сыворотка. Вариабельность перечисленных параметров обуславливает необходимость стандартизации указанной методики. Методика определения АКА, указанная в Европейской фармакопее (ЕФ) [4], предусматривает использование стандартных образцов (СО) иммуноглобулина человека BRP (Biological Reference Preparation) в качестве отрицательного и положительного контролей, что обеспечивает контроль стабильности условий испытания и позволяет получать надежные результаты.

В настоящее время разработано и аттестовано достаточно большое количество международных и фармакопейных СО. ВОЗ рекомендует использование национальных (отечественных) СО [5], что также является экономически целесообразно. В 2015 г. впервые в Российской Федерации разработан отечественный СО для определения АКА, представляющий собой комплект, состоящий из отрицательного и положительного контролей [6]. При проведении аттестации разработанного отечественного СО целесообразно использовать СО иммуноглобулина человека BRP.

Аттестованные значения отрицательного контроля СО должны быть менее 50 %, так как целью его использования при определении АКА является получение значений, укладываемых в нормативные требования, предъявляемые к ЛП ИГВВ. Соответственно аттестованные значения положительного контроля

должны находиться в диапазоне свыше 50 %, так как использованием СО должна быть подтверждена достоверность получаемых результатов в различных диапазонах значений АКА [7].

Целью настоящего исследования является аттестация отечественного СО для определения антикомплементарной активности ЛП иммуноглобулинов человека.

### *Экспериментальная часть*

Использовали гемолитические сыворотки производства Siemens, Германия, ФГУП "НПО "Микроген" Минздрава России, Россия; пулированный (in house) комплемент морских свинок [8]; кровь баранью дефибрированную с цитратом натрия, производства ЗАО "ЭКОлаб", Россия; ЛП "Имуноглобулин человека нормальный", раствор для внутримышечного введения, ампулы по 1,5 мл, производства ФГУП "НПО "Микроген" Минздрава России; отечественный СО (СОС) содержания белка в иммуноглобулине (СОС 42-28-340-2014), производства ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России; СО иммуноглобулина человека BRP, серия 1 (кат. № Y0001504), утвержден Европейским директором по качеству лекарственных средств и здравоохранения (EDQM), Франция в 2011 г. [9].

АКА определяли в реакции связывания компонента [4, 8]; содержание белка — колориметрическим методом с биуретовым реактивом [10], молекулярно-массовое распределение молекул иммуноглобулина — методом ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием [11]. Расчет статистических параметров (среднего значения, стандартного отклонения, до-

верительного интервала) с достоверностью 95 % выполняли с помощью формул [12], используя программное обеспечение MS Excel 2007.

В работе использовали цифровой спектрофотометр PD-303S (Apel, Япония); хроматограф: ВЭЖХ-система Alliance 2695 (Waters Cor., США); центрифуга многофункциональная 5810R (Eppendorf AG, Германия); весы прецизионные Adventurer AR-5120 (Ohaus, США); термостат BD 115 (Binder, Германия); рН-метр S220 SevenCompact (Mettler Toledo AG, Китай).

### Результаты и их обсуждение

Для СО должна быть установлена аттестуемая характеристика, однородность, а также срок годности на основании изучения стабильности. В целях обеспечения однородности использовали сертифицированную серию ЛП “Иммуноглобулин человека нормальный”, раствор для внутримышечного введения.

Установление значений аттестуемой характеристики СО для определения АКА проводили в одной лаборатории с использованием СО иммуноглобулина человека BRP [13, 14] и методики измерений, метрологические характеристики которой определены в рамках

внутрилабораторной валидации. Аттестацию проводили в соответствии с программой и методикой аттестации. Исследования провели 3 аналитика (ежедневно каждым из аналитиков исследовалось по 3 новых комплекта СО), получили 27 независимых результатов в условиях промежуточной прецизионности (табл. 1).

Средние значения АКА СО по результатам исследований, проведенных 3 аналитиками, составили для отрицательного контроля 41,5 %; для положительного контроля 78,2 %. Стандартное отклонение отрицательного контроля — 1,8 %; положительного контроля — 2,3 %.

Проведенные исследования позволили установить аттестованную характеристику СО, значения АКА для отрицательного контроля находятся в интервале от 37,9 до 45,1 %; для положительного контроля — в интервале от 73,6 до 82,8 % (с доверительной вероятностью 0,95).

Важной характеристикой, влияющей на стабильность получаемых результатов, является содержание белка, в связи с этим СО дополнительно охарактеризован по данному показателю, получены значения, равные  $(102 \pm 1,8)$  мг/мл (с доверительной вероятностью

Таблица 1

Результаты определения антикомплементарной активности СО иммуноглобулина человека

Аналитик	Дата проведения исследования	Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека BRP, %		Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека, %					
		отрицательный контроль (аттестованные значения 10 – 40 %)	положительный контроль (аттестованные значения 60 – 100 %)	отрицательный контроль			положительный контроль		
				x	$\bar{x} \pm S_x$		x	$\bar{x} \pm S_x$	
1	17.06.	23,1	84,1	39,4	42,3 ± 2,6	42,6 ± 1,6	76,5	76,1 ± 1,9	76,0 ± 2,1
				42,9			74,1		
				44,5			77,8		
	18.06.	13,8	80,4	42,9	43,4 ± 0,9	73,4	75,6 ± 3,3		
				42,9		74,0			
				44,5		79,4			
	19.06.	20,1	84,0	41,0	42,0 ± 1,1	77,4	76,3 ± 1,7		
				41,8		74,4			
				43,2		77,2			
2	17.06.	15,5	86,2	40,6	40,6 ± 1,9	40,9 ± 2,1	79,4	80,4 ± 1,0	80,0 ± 0,9
				38,7			81,4		
				42,4			80,4		
	18.06.	20,7	86,7	38,6	39,3 ± 1,2	81,0	80,1 ± 1,1		
				38,6		80,4			
				40,7		78,8			
	19.06.	16,5	84,6	42,9	42,9 ± 1,4	78,9	79,7 ± 0,8		
				41,5		80,5			
				44,3		79,6			
3	17.06.	18,9	77,5	41,4	40,9 ± 2,0	41,1 ± 1,3	80,1	79,7 ± 1,1	78,5 ± 1,7
				42,5			78,4		
				38,7			80,5		
	18.06.	23,3	88,4	42,3	41,3 ± 0,9	79,9	78,7 ± 1,7		
				40,7		76,7			
				40,9		79,5			
	19.06.	14,4	77,4	42,8	41,3 ± 1,6	78,7	77,2 ± 1,4		
				39,7		75,9			
				41,3		76,9			

0,95). В качестве дополнительного подтверждения стабильности свойств СО в процессе хранения проведено изучение молекулярно-массового распределения молекул иммуноглобулина методом ВЭЖХ [11].

По результатам изучения молекулярно-массового распределения молекул иммуноглобулина содержание полимеров и агрегатов в отрицательном контроле варьировало от 0,04 до 0,64 %, в положительном контроле — от 0,36 до 1,21 %, что не оказывало влияния на аттестованные значения АКА (табл. 2).

Способ получения ОСО для определения АКА подразумевает термическую обработку образцов препарата иммуноглобулина человека при  $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение

5 мин, т.е. при повышении температуры наблюдается повышение АКА, следовательно, метод ускоренного старения при изучении стабильности исследуемого СО не применим, в связи с этим исследования проводили в реальном времени (естественное старение).

Для изучения стабильности СО хранили при температуре  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  и определяли контролируемые параметры (АКА, содержание белка) в момент закладки на хранение, далее — каждый месяц в течение первых 3 мес, далее — с интервалом в 3 мес до 21 мес. Представленные в табл. 3 данные позволяют сделать вывод о том, что изученный СО стабилен в течение 18 мес.

Таблица 2

**Изучение молекулярно-массового распределения молекул иммуноглобулина в СО для определения антикомплементарной активности**

Наименование определяемого компонента	Срок наблюдения, мес								
	0	2	3	6	9	12	15	18	21
Мономеры и димеры, %									
положительный контроль	99,64	99,50	99,54	98,97	98,94	98,84	99,25	98,20	98,62
отрицательный контроль	99,96	99,86	99,89	99,72	99,61	99,67	99,78	98,74	99,55
Полимеры и агрегаты, %									
положительный контроль	0,36	0,50	0,46	1,03	1,06	1,16	0,75	1,20	1,21
отрицательный контроль	0,04	0,14	0,11	0,28	0,39	0,33	0,22	0,64	0,33
Фрагменты, %									
положительный контроль	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,17
отрицательный контроль	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62	0,12

Таблица 3

**Изучение стабильности СО иммуноглобулина человека**

Характеристика	Срок хранения, мес									
	0	1	2	3	6	9	12	15	18	21
АКА положительного контроля СО $\bar{x} \pm S_x$ , %	79,0 ± 0,3	76,0 ± 2,0	80,0 ± 1,0	78,2 ± 1,8	78,9 ± 3,4	78,6 ± 1,1	80,0 ± 1,4	79,4 ± 2,1	76,9 ± 2,2	71,9 ± 3,0
АКА отрицательного контроля СО, $\bar{x} \pm S_x$ , %	41,0 ± 1,0	43,0 ± 2,0	41,0 ± 2,0	40,2 ± 1,6	39,3 ± 2,7	41,6 ± 2,7	39,1 ± 2,7	43,1 ± 1,6	39,2 ± 3,4	39,6 ± 2,0
Содержание белка*, $\bar{x} \pm S_x$ , мг/мл	101,0 ± 1,0	101,0 ± 0,7	102,0 ± 1,3	103,0 ± 0,5	103,0 ± 0,6	102,0 ± 0,8	100,0 ± 0,9	102,0 ± 0,8	101,0 ± 0,4	102,0 ± 2,0

\* Среднее значение ( $\bar{x} \pm S_x$ ) содержания белка в положительном и отрицательном контроле.

Таблица 4

**Изучение стабильности СО иммуноглобулина человека в течение 14 дней после вскрытия ампулы**

Характеристика	Значение аттестуемой характеристики на ... день наблюдения										$\bar{x} \pm S_x$
	1	2	3	6	7	8	9	10	13	14	
Антикомплементарная активность положительного контроля СО, %	79,8	76,9	80,5	78,2	78,9	84,4	77,4	81,4	79,6	80,9	79,8 ± 2,2
Антикомплементарная активность отрицательного контроля СО, %	41,2	42,1	41,1	38,8	39,3	40,7	38,6	39,5	40,2	40,7	40,2 ± 1,1
Содержание белка*, мг/мл	102 ± 0,0	н/и	н/и	н/и	102 ± 0,7	н/и	н/и	н/и	н/и	102 ± 1,4	102 ± 0,8

н/и — не исследовалось;

\* среднее значение ( $\bar{x} \pm S_x$ ) содержания белка в положительном и отрицательном контроле.

при хранении при температуре ( $5 \pm 3$ ) °С. Для установления окончательного срока годности наблюдения продолжаются.

Для оценки продолжительности использования вскрытых ампул СО проведены исследования по изучению стабильности аттестованной характеристики и содержания белка, которые позволили сделать вывод о том, что СО стабилен после вскрытия ампул в течение 14 сут при хранении при температуре ( $5 \pm 3$ ) °С (табл. 4).

Таким образом, по результатам проведенных исследований установлено, что аттестованные значения АКА СО (с доверительной вероятностью 0,95) для отрицательного контроля находятся в интервале от 37,9 до 45,1 %; для положительного контроля — в интервале от 73,6 до 82,8 %. СО дополнительно охарактеризован по содержанию белка, которое составило ( $102 \pm 1,8$ ) мг/мл (с доверительной вероятностью 0,95). СО стабилен в течение 18 мес при хранении при температуре ( $5 \pm 3$ ) °С, а также стабилен после вскрытия ампул в течение 14 дней при соблюдении указанных в инструкции по применению условий хранения. Результаты проведенных исследований по аттестации включены в разработанную нормативную документацию на СО (паспорт, инструкция по применению и макет первичной упаковки). Достоверность результатов исследований обусловлена достаточным объемом выборки и статистической обработкой полученных данных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. I. Ramasamy, E. Tran, A. Farrugia, *Biologicals: J. Int. Assoc. Biol. Standardization*, **25**(1), 87 – 92 (1997).
2. A. Buchacher, P. Schluga, J. Mullner, et al., *Vox Sang.*, **98**, 209 – 218 (2010).

3. М. А. Кривых, О. Г. Корнилова, Н. Д. Бунятян и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(7), 39 – 42 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(7), 473 – 476 (2016).
4. *European Pharmacopoeia*, 8.5 ed., [Электронный ресурс] URL: <http://online6.edqm.eu/ep801/#> (дата обращения: 21.08.2015).
5. *WHO manual for the establishment national and other secondary standard for vaccines*, World Health Organization the Department of Immunization, Vaccines and Biological, Geneva (2011). P. 228.
6. Патент РФ 2577703; *Бюл. изобрет.*, **8**, 2015104120 / 15 (2015).
7. М. А. Кривых, О. Г. Корнилова, Н. Д. Бунятян и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(6), 40 – 42 (2015); *Pharm. Chrm. J.*, **49**(6), 398 – 400 (2015).
8. *Общая фармакопейная статья “Определение антикомplementарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения”* (ОФС. 1.8.2.0007.15), [Электронный ресурс], URL: <http://193.232.7.120/feml/clinicalref/pharmacopoeia2/HTML/#937/z> (дата обращения: 07.10.2016).
9. E. Sandberg, A. Costanzo, A. Daas, et al., *Pharmeuropa Bio&SN*, 1 – 15 (2012).
10. *Общая фармакопейная статья “Определение белка”* (ОФС. 1.2.3.0012.15), [Электронный ресурс], URL: <http://193.232.7.120/feml/clinicalref/pharmacopoeia1/HTML/#757/z> (дата обращения: 07.10.2016).
11. *Общая фармакопейная статья “Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ”* (ОФС. 1.8.2.0006.15), [Электронный ресурс], URL: <http://193.232.7.120/feml/clinicalref/pharmacopoeia2/HTML/#933/z> (дата обращения: 07.10.2016).
12. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1999).
13. *Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards*, WHO Technical Report Series 932, annex 2, Geneva (2004), pp. 73 – 131.
14. *Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения*, ГОСТ 8.315–97 ГСИ. Изд-во стандартов, Москва (2004), сс. 1 – 23.

Поступила 20.10.16

## CERTIFICATION OF STANDARD SAMPLES OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN FOR DETERMINATION OF ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY

М. А. Krivykh, O. G. Kornilova, N. D. Bunyatyan, E. V. Paramonova, E. Yu. Kudasheva, E. V. Novikova, O. V. Ustinnikova, R. A. Volkova, and O. V. Fadeikina

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

Results of the evaluation and study of stability of the original Russian standard of human immunoglobulin intended for determining the anticomplementary activity and assessing the stability and acceptability of test results. According to the results of investigation, the certified values of anticomplementary activity of the negative control standard fall in the interval of 37.9 – 45.1% and values of the positive control fall within 73.6 – 82.8% (for  $P = 0.95$ ). Basis on the data on stability of the standard sample, its justified shelf life is 1.5 years. Introduction of the certified reference materials in the analysis of pharmaceutical preparation of human immunoglobulin for intravenous administration during the examination and quality control in the framework of government projects, and in order to confirm compliance with the requirements of regulatory documents will improve the accuracy of determining the anticomplementary properties of preparations.

**Keywords:** anticomplementary activity; standard sample; attestation; validation of method; human immunoglobulin.