

М. А. Кривых, О. Г. Корнилова, Н. Д. Бунятян, Е. В. Парамонова, Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА

ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Минздрава России, Россия, Москва

Валидирована методика определения антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов (Ig) человека для внутривенного введения методом реакции связывания комплемента по показателям правильность, прецизионность (повторяемость, внутрилабораторная прецизионность), предел количественного определения, линейность и аналитическая область. Методика может быть использована для оценки качества по показателю “Антикомплементарная активность” в рамках проведения фармацевтической экспертизы качества лекарственных препаратов Ig человека.

Ключевые слова: антикомплементарная активность; валидация методики; иммуноглобулины человека; специфическая безопасность.

Антикомплементарная активность (АКА) инфузионных препаратов Ig человека является одним из ключевых показателей специфической безопасности иммуноглобулинотерапии. АКА обусловлена присутствием в них агрегированных и/или поврежденных при фракционировании молекул Ig, на Fc-участке которых происходит спонтанная активация комплемента в отсутствие комплексов антиген — антитело [1, 2]. Согласно рекомендациям экспертов ВОЗ, все серии инфузионных препаратов Ig человека подлежат обязательному испытанию на АКА. Методика определения АКА сопряжена с рядом критических параметров [1], связанных с использованием биологических реагентов, таких как комплемент морских свинок, эритроциты барана и гемолитическая сыворотка, вариabельность которых обуславливает необходимость использования стандартного образца (СО), положительный и отрицательный контроли которого подтверждают достоверность получаемых результатов в различных диапазонах значений АКА. Оптимизированная методика определения АКА [3, 4] предусматривает использование желатин-солевого раствора, как альтернатива — желатин-барбиталового буферного раствора, предусмотренного стандартизированной методикой Европейской фармакопеи (ЕФ) [5].

Целью данного исследования является валидация оптимизированной методики определения АКА препаратов Ig человека для использования ее в фармакопейном анализе.

Экспериментальная часть

Использовали гемолитические сыворотки производства Siemens, Германия, ЗАО “ЭКОлаб” и ФГУП “НПО “Микроген” Минздрава России, Россия, пулированный (in house) комплемент морских свинок [4], СО иммуноглобулина человека BRP (Biological Reference Preparation), серия 1 (кат. № Y0001504), который является СО ЕФ, утвержденным Европейским

директоратом по качеству лекарственных средств и здравоохранения (EDQM), Франция, 2011 г.

Определение АКА проводили в реакции связывания комплемента по оптимизированной методике [4]. Расчет статистических параметров (среднего значения, стандартного отклонения, коэффициента вариации, доверительного интервала, фактических и табличных значений *F*-критериев Фишера, *t*-критериев Стьюдента) с достоверностью 95 % выполняли с помощью формул [6, 10], используя программное обеспечение MS Excel 2007.

Применяли цифровой спектрофотометр PD-303S (Apel, Япония); центрифугу многофункциональную 5810R (Eppendorf AG, Германия); весы прецизионные Adventurer AR-5120 (Ohaus, США); термостат BD 115 (Binder, Германия); pH-метр S220 SevenCompact (Mettler Toledo AG, Китай).

Результаты и их обсуждение

Валидацию методики определения АКА проводили согласно требованиям отечественных и зарубежных руководств по валидации аналитических методик [7 – 9]. По типу аналитической процедуры данная методика является количественным испытанием на смеси, поэтому при валидации оценивали правильность, прецизионность (повторяемость, внутрилабораторная прецизионность), линейность, предел количественного определения и аналитическую область.

При оценке правильности критерием приемлемости служили значения АКА отрицательного и положительного контролей СО ЕФ, соответствующие аттестованным интервалам: 10 – 40 % для отрицательного контроля; 60 – 100 % для положительного контроля [11]. Значения АКА СО ЕФ, полученные в настоящем исследовании, находились в аттестованных интервалах и составляли от 17,1 до 23,5 % (среднее значение составило 20,0 %) для отрицательного контроля и от

79,1 до 88,5 % (среднее значение составило 85,4 %) для положительного контроля. Таким образом, валидируемая методика характеризуется приемлемой правильностью.

Для характеристики прецизионности оценивали повторяемость и внутрилабораторную прецизионность (по фактору время и операторы).

Проводили многократные измерения АКА отрицательного и положительного контролем СО ЕФ: 7 групп ($L = 7$) измерений в условиях повторяемости ($n = 2$). Рассчитывали среднее значение (\bar{x}) и выборочную дисперсию (S_i^2) результатов единичных измерений, гипотезу о равенстве генеральных дисперсий проверяли, используя критерий Кохрена (G) [10]. Расчетное значение критерия Кохрена ($G_{\text{расч.}}$) вычисляли как отношение наибольшей дисперсии для данной выборки к сумме всех дисперсий. Полученную величину сравнивали с критическим значением для критерия Кохрена $G_{\text{табл}}$ ($G_{\text{табл}} = 0,727$), которое выбирали в зависимости от 3 основных параметров: заданной доверительной вероятности $p \geq 0,95$; числа степеней свободы наибольшей дисперсии $\nu = 2 - 1 = 1$; количество дисперсий, по которым рассчитывают сумму, стоящую в знаменателе $f = L = 7$ [10]. Таким образом, соотношение ($G_{\text{расч.}} < G_{\text{табл}}$) для отрицательного и положительного контролем выполнено, следовательно, дисперсии можно считать однородными и по ним рассчитывать стандартное отклонение.

Стандартное отклонение показателя повторяемости (σ_r) считали равным выборочному стандартному отклонению повторяемости (S_r), которое рассчитывали как корень квадратный из общей средней дисперсии повторяемости [10].

Исследование повторяемости (табл. 1) позволило сделать вывод о том, что для отрицательного контроля СО ЕФ коэффициент вариации составил 1,07 и 1,03 % для оператора I и II соответственно, для положительного контроля — 0,18 и 0,31 % для оператора I и II соответственно, что удовлетворяет критерию приемлемости — не более 2 % [8].

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам 7 определений, рассчитывали стандартное отклонение внутрилабораторной прецизионности по фактору время (σ_R) [10]. Получили следующие значения: оператор I — для отрицательного контроля $\sigma_{R^-} = 2,39$ %; для положительного контроля $\sigma_{R^+} = 1,80$ %; оператор II — для отрицательного контроля $\sigma_{R^-} = 2,26$ %; для положительного контроля $\sigma_{R^+} = 3,02$ %. Аналогичным образом рассчитывали стандартное отклонение внутрилабораторной прецизионности по фактору время и операторы, получили значения для отрицательного контроля, равные 2,23 %; для положительного контроля — 2,68 %.

Проведенные исследования внутрилабораторной прецизионности (табл. 2) позволили сделать вывод о том, что коэффициент вариации внутрилабораторной прецизионности (по фактору время) для отрицательного контроля СО ЕФ составил 11,97 % (оператор I) и 11,23 % (оператор II), для положительного контроля

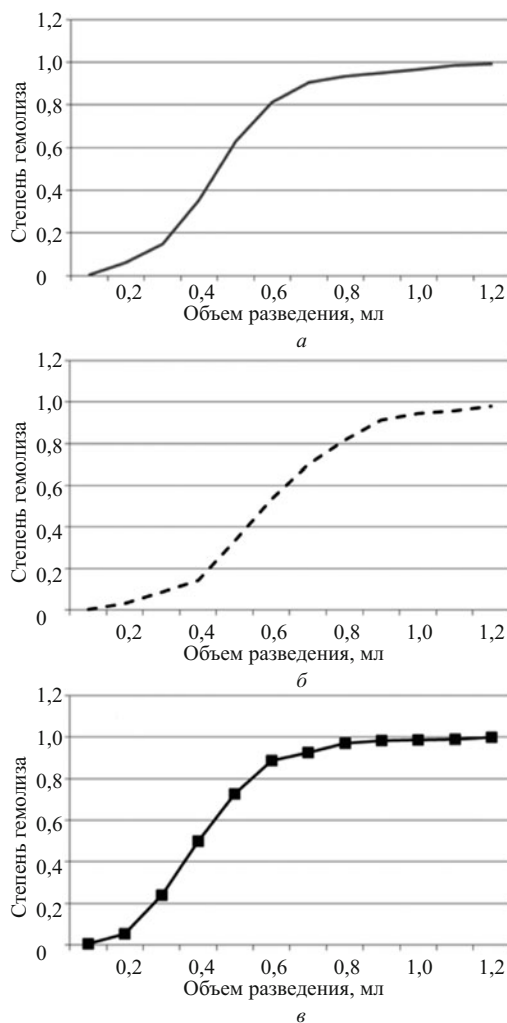


Рис. 1. Графики зависимости степени гемолиза от объема разведения комплемента в: (а) — контроле комплемента, (б) — отрицательном контроле, (в) — положительном контроле.

— 2,08 % (оператор I) и 3,59 % (оператор II). Коэффициент вариации внутрилабораторной прецизионности (по фактору время и операторы) для отрицательного контроля СО ЕФ составил 11,16 %, для положительного контроля — 3,14 %, что удовлетворяет критерию приемлемости — не более 15 % (для биологических методов контроля) [8].

В случае оценки приемлемости внутрилабораторной прецизионности нормативные и методические документы в сфере GMP [13, 14] рекомендуют рассчитывать статистические критерии Фишера (F) и Стьюдента (t) и сравнивать фактические значения $t_{\text{факт}}$ и $F_{\text{факт}}$ с табличными — максимальными значениями критериев под влиянием случайных факторов при текущих степенях свободы и при заданном уровне значимости ($t_{\text{табл}}$ и $F_{\text{табл}}$). Как следует из данных табл. 2, табличные значения F и t превосходят фактические значения, что свидетельствует о статистической незначимости различий между средними значениями и стандартными отклонениями результатов измерений 2 операторов с достоверностью 95 %.

Для подтверждения линейности измеряли оптическую плотность в контроле комплемента, отрицатель-

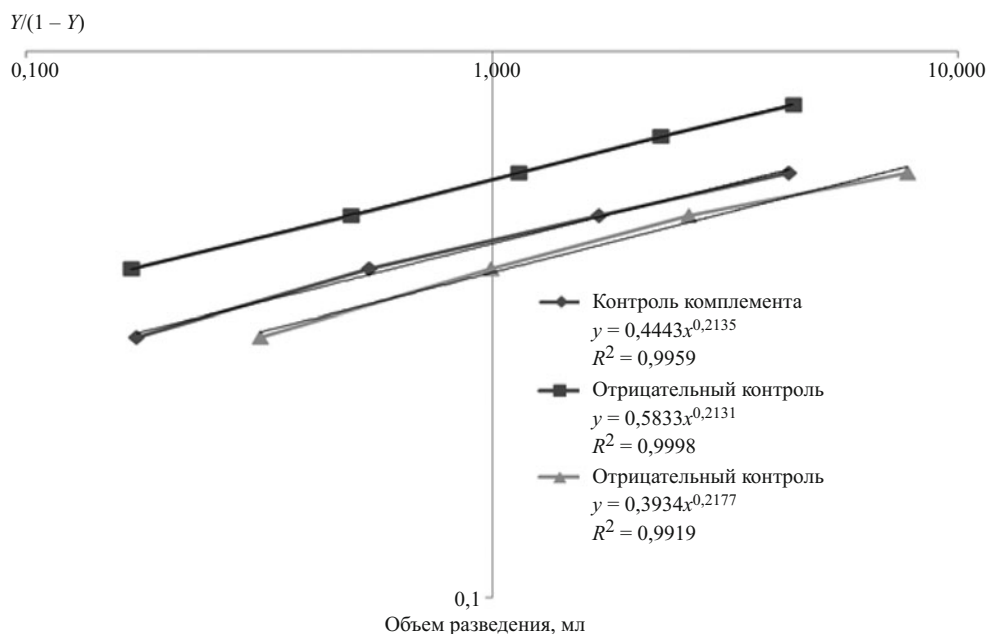


Рис. 2. Определение объема разведения компонента, приводящего к 50 % гемолизу ($Y/(1 - Y) = 1$), в контроле компонента, положительном и отрицательном контроле СО ЕФ.

Т а б л и ц а 1

Оценка повторяемости результатов измерений стандартного образца Европейской фармакопеи

Оператор	Номер испытания ($L_i, i = 1 \dots 7$)	Результат измерения, полученный в условиях повторяемости (в условиях повторяемости) S_i^2		Выборочная дисперсия результатов измерений	Сумма всех дисперсий, $\sum_{i=1}^7 S_i^2$	Расчетное значение $G_{расч}$	Стандартное отклонение повторяемости $\sigma_p, \%$	Коэффициент вариации (CV), %
		X_{i1}	X_{i2}					
Отрицательный контроль								
I	1	17,5	17,6	0,005	0,314	0,388	0,212	1,07
	2	17,1	17,5	0,078				
	3	18,8	18,3	0,122				
	4	22,7	22,7	0,000				
	5	20,8	20,6	0,019				
	6	23,1	23,4	0,045				
	7	19,1	19,4	0,045				
II	1	19,5	19,2	0,045	0,300	0,416	0,207	1,03
	2	19,4	18,9	0,125				
	3	17,1	17,3	0,020				
	4	23,4	23,5	0,005				
	5	22,5	22,9	0,080				
	6	18,4	18,6	0,020				
	7	20,3	20,2	0,005				
Положительный контроль								
I	1	86,6	86,6	0,000	0,175	0,640	0,158	0,18
	2	86,7	86,7	0,000				
	3	82,9	82,9	0,000				
	4	87,3	87,4	0,013				
	5	87,8	87,8	0,000				
	6	88,3	88,5	0,050				
	7	85,8	86,1	0,112				
II	1	86,9	87,1	0,050	0,476	0,420	0,261	0,31
	2	85,8	86,2	0,200				
	3	79,1	79,2	0,013				
	4	82,8	82,8	0,000				
	5	81,9	81,7	0,050				
	6	85,3	85,5	0,050				
	7	87,1	87,4	0,113				

Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности валидируемой методики

Исследование	Оператор I		Оператор II	
	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Отрицательный контроль	Положительный контроль
1	17,6	86,6	19,4	87,0
2	17,3	86,7	19,2	86,0
3	18,6	82,9	17,2	79,2
4	22,7	87,4	23,5	82,8
5	20,7	87,8	22,7	81,8
6	23,3	88,4	18,5	85,4
7	19,3	86,0	20,3	87,3
Среднее значение, %	19,9	20,1	86,5	84,2
Стандартное отклонение, %	2,39	2,26	1,80	3,02
Коэффициент вариации, %	11,97	11,23	2,08	3,59
Доверительный интервал ($p \geq 95\%$), %	$\pm 2,21$	$\pm 2,09$	$\pm 1,67$	$\pm 2,79$
Объединенное среднее значение, %			20,0	85,4
Объединенное стандартное отклонение, %			2,23	2,68
Объединенный коэффициент вариации, %			11,16	3,14
Объединенный доверительный интервал, %			$\pm 1,29$	$\pm 1,65$
F-критерий Фишера ($F_{\text{табл}} = 4,28$)			$F_{\text{факт}} = 1,12$	$F_{\text{факт}} = 2,81$
t-критерий Стьюдента ($t_{\text{табл}} = 2,18$)			$t_{\text{факт}} = 0,16$	$t_{\text{факт}} = 1,73$

ном и положительном контролях СО ЕФ (в 3 повторениях), далее рассчитывали степень гемолиза и значения соотношения $Y/(1 - Y)$, необходимые для дальнейшего построения графиков зависимости степени гемолиза от объема разведения комплемента, а также графиков определения объема разведения комплемента, приводящего к 50 % гемолизу.

Критерии приемлемости: график зависимости степени гемолиза от объема разведения комплемента при визуальном осмотре должен иметь линейный характер на участке от 0,15 до 0,85 степени гемолиза; коэффициент корреляции для графика определения объема разведения комплемента, приводящего к 50 % гемолизу, должен быть более 0,95 [12], тангенс наклона прямой должен быть между 0,15 и 0,40, предпочтительно в интервале 0,18 – 0,30 [4, 5].

На рис. 1 представлены графики зависимости степени гемолиза от объема разведения комплемента (в мл) в контроле комплемента, отрицательном и положительном контролях СО ЕФ, доказывающие линейный характер на участке от 0,15 до 0,85 степени гемолиза.

Далее с помощью программного обеспечения (MS Excel 2007) строили график (рис. 2) со значениями $Y/(1 - Y)$ по оси абсцисс и объемом разведения (в мл) по оси ординат (логарифмический масштаб) для контроля комплемента, отрицательного и положительного контролей СО ЕФ. Получили оптимизированные графики, соответствующие нанесенным точкам, и определили ординату для объема разведения комплемента, приводящего к 50 % гемолизу, т.е. $Y/(1 - Y) = 1$. Полученные графики имеют коэффициенты корреляции более 0,99 и тангенсы наклона прямых в интервале от 0,2131 до 0,2177, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Предел количественного определения равен $1 \text{ CH}_{50}/\text{мл}$, что соответствует значению АКА, равному 1 %, или $0,02 \text{ CH}_{50}/\text{мг}$ иммуноглобулина, т.к. единица гемолитической активности комплемента (1 CH_{50}) определяется как количество комплемента, которое в определенных условиях опыта вызывает гемолиз 50 % оптимально сенсibilизированных эритроцитов ($2,5 \cdot 10^8$ клеток) из общего количества ($5 \cdot 10^8$ клеток), объем соответствующим образом разбавленного комплемента, приводящий к 50 % степени гемолиза, определяется титрованием комплемента.

Аналитическая область определена гемолитической активностью в контроле комплемента от 80 до $120 \text{ CH}_{50}/\text{мл}$. При проведении валидационных исследований активность комплемента в контроле комплемента находилась в диапазоне от 80,5 до $115,3 \text{ CH}_{50}/\text{мл}$.

Таким образом, методика определения АКА методом реакции связывания комплемента была валидирована по основным параметрам с использованием СО ЕФ, что доказывает возможность ее применения для оценки антикомплемментарных свойств инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека при проведении фармакопейного анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Buchacher, P. Schluga, J. Mullner, et al., *Vox Sang.*, **98**, 209 – 218 (2010).
2. Определение антикомплемментарной активности препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения: Методические указания. МУК 3.3.2.1063-01, Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, Москва (2001), сс. 1 – 16.
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 (2015).

4. Общая фармакопейная статья “Определение антикомplementарной 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).
5. European Pharmacopoeia 8.5 Edition [Электронный ресурс] URL: <http://online6.edqm.eu/ep801/#> (дата обращения: 21.08.2015).
6. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1999).
7. Н. В. Юргель (ред.), *Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации)*, Спорт и культура-2000, Москва (2007).
8. Ж. И. Аладышева, *Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве*, “Издательский дом “Русский врач”, Москва (2005).
9. ICH Harmonised tripartite guideline. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, Geneva (2005).
10. РМГ 61-2010 ГСИ, *Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки*, Стандартиформ, Москва (2013).
11. E. Sandberg, A. Costanzo, A. Daas, et al., *Pharmeuropa Bio&SN*, 1 – 15 (2012).
12. С. Н. Быковский (ред.), *Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли*, Изд-во Перо, Москва (2015).
13. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation, WHO / VSQ / 97.02, Geneva (1999).
14. В. В. Береговых (ред.), *Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств*, Литерра, Москва (2008).

Поступила 22.06.16

VALIDATION OF PROCEDURES FOR DETERMINING THE ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN PREPARATIONS

M. A. Krivykh, O. G. Kornilova, N. D. Bunyatyan, E. V. Paramonova, R. A. Volkova, and O. V. Fadeikina

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

A method of determining the anticomplementary activity of human immunoglobulin (Ig) preparations for intravenous administration by complement fixation test has been validated in terms of accuracy, precision (repeatability, intermediate precision), limit of quantification (LOQ), linearity, and analytical domain. The proposed method can be used to assess the quality in terms of “anticomplementary activity” as part of the pharmaceutical quality examination of human Ig preparations.

Keywords: anticomplementary activity; method validation; human immunoglobulins; specific safety.