

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения	ОФС
	Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения.

Метод определения антикомплементарной активности (АКА) в препаратах иммуноглобулинов человека основан на способности высокомолекулярных и денатурированных белков (агрегатов) связывать комплемент в отсутствие комплексов антиген-антитело и, таким образом, препятствовать лизису сенсibilизированных эритроцитов. Количество высокомолекулярных и денатурированных белков (агрегатов), обладающих антикомплементарной активностью, в препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного введения должно быть минимальным.

Антикомплементарную активность испытуемого препарата иммуноглобулинов (в процентах) выражают как расход комплемента в испытуемом образце по отношению к контрольному комплементу, принятому за 100%. Допустимый предел связывания комплемента – не более 50% (т.е. не более 1 CH_{50} /мг белка).

Методика определения

Для определения антикомплементарной активности иммуноглобулина человека для внутривенного введения берут фиксированное количество

испытуемого образца (10 мг иммуноглобулина в объеме 0,2 мл 5% раствора) и инкубируют с определенным количеством комплемента морских свинок (20 CH_{50}); затем добавляют сенсibilизированные эритроциты барана и определяют количество несвязавшегося комплемента.

Подготовка 5% суспензии эритроцитов барана. Эритроциты барана отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной крови барана в течение 5 мин при 3000 об/мин (1000 g). Осадок эритроцитов промывают не менее трех раз 10-кратным (к объему эритроцитов) объемом буферного раствора до получения бесцветной промывной жидкости. Отбирают определенный объем отмытых эритроцитов и смешивают с рассчитанным количеством буферного раствора для получения 5% суспензии (об/об).

Плотность клеточной суспензии определяют следующим образом: 0,2 мл полученной суспензии эритроцитов прибавляют к 2,8 мл воды очищенной, перемешивают, центрифугируют полученный раствор в течение 5 мин при 3000 об/мин, измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 541 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (раствор сравнения – вода очищенная). Суспензия пригодна для испытания, если измеренная оптическая плотность супернатанта составляет $0,62 \pm 0,01$.

Корректируют плотность суспензии до указанного показателя добавлением необходимого количества отмытых эритроцитов, если оптическая плотность ниже 0,61, либо рассчитанным по формуле (1) количеством буферного раствора, если оптическая плотность выше 0,63:

$$V_{БР} = (V_{Н} \times A / 0,62) - V_{Н} ,$$

где: $V_{БР}$ – добавочный объем буферного раствора, мл;

$V_{Н}$ – начальный объем суспензии, мл;

A – значение оптической плотности исходной суспензии;

0,62 – целевое значение оптической плотности.

Титрование гемолитической сыворотки

Готовят серию разведений гемолитической сыворотки, в соответствии с Таблицей 1 (значения разведений гемолитической сыворотки могут быть изменены).

Таблица 1 - Порядок приготовления разведений гемолитической сыворотки

Разведение гемолитической сыворотки	Используемые растворы		
	Объем буферного раствора, мл	Гемолитическая сыворотка	
		Разведение	Объем, мл
1:50	4,9	Без разведения	0,1
1:100	1,0	1:50	1,0
1:250	4,0	1:50	1,0
1:500	2,0	1:250	2,0
1:1000	2,0	1:500	2,0
1:2000	1,5	1:1000	1,5
1:3000	2,0	1:1000	1,0
1:4000	1,0	1:2000	1,0

Далее из каждой пробирки с полученными разведениями гемолитической сыворотки переносят по 1,0 мл в новые пробирки, добавляют по 1,0 мл 5% суспензии эритроцитов и осторожно перемешивают. Пробы инкубируют при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

По окончании инкубации по 0,2 мл каждой из этих инкубированных проб переносят в новые пробирки и прибавляют по 1,1 мл буферного раствора и по 0,2 мл предварительно приготовленного раствора компонента (например, разведение 1:150). Испытание выполняют в двух повторностях.

Для приготовления контрольных проб без гемолиза в три пробирки вносят по 1,4 мл буферного раствора и по 0,1 мл 5% суспензии эритроцитов.

Для приготовления контрольных проб с полным гемолизом в три пробирки вносят по 1,4 мл воды очищенной и по 0,1 мл 5% суспензии эритроцитов.

Пробы инкубируют в термостате при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 60 мин, затем охлаждают 10 мин при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Определяют оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 541 нм.

Рассчитывают степень гемолиза в процентах ($Y\%$) в каждой пробирке по формуле (2):

$$Y\% = \frac{A_{\text{п}} - A_{\text{о}}}{A_{\text{к}} - A_{\text{о}}} \times 100\%,$$

где: $A_{\text{п}}$ – среднее значение оптической плотности разведений гемолитической сыворотки;

$A_{\text{о}}$ – среднее значение оптической плотности контрольных проб без гемолиза;

$A_{\text{к}}$ – среднее значение оптической плотности контрольных проб с полным гемолизом.

Строят график, откладывая по оси ординат степень гемолиза в процентах, а по оси абсцисс – обратные значения соответствующего разведения гемолитической сыворотки.

Результаты титрования гемолитической сыворотки считают достоверными, если максимальная степень гемолиза находится в пределах 50–70%. Если максимальная степень гемолиза не находится в этих пределах, титрование повторяют с использованием менее или более разбавленного раствора компонента, соответственно.

Определяют минимальное разведение, при котором дальнейшее повышение количества гемолитической сыворотки не вызывает существенного повышения степени гемолиза. Это разведение определяется как одна минимальная гемолитическая единица (1 МГЕ) в 1 мл.

В дальнейшем для приготовления суспензии сенсibilизированных эритроцитов барана используют разведение гемолитической сыворотки, содержащее 2 МГЕ/мл (например, если за 1 МГЕ/мл принимают разведение 1:500, то 2 МГЕ/мл – 1:250).

При проведении последующих испытаний с использованием образцов гемолитической сыворотки той же серии можно использовать данные, полученные ранее.

Рекомендуется определять гемолитическую активность используемой серии гемолитической сыворотки не реже одного раза в 6 месяцев.

Титрование комплемента

Готовят исходное разведение комплемента (например, 1:250) с помощью буферного раствора, затем из него готовят ряд разведений в двух повторностях в соответствии с Таблицей 2:

Таблица 2 - Порядок приготовления разведений комплемента

Номера пробирок	Объем разведения комплемента (например, 1:250), мл	Объем буферного раствора, мл
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1

Для приготовления контрольных проб без гемолиза в три пробирки вносят по 1,3 мл буферного раствора.

Для приготовления контрольных проб с полным гемолизом в три пробирки вносят по 1,3 мл воды очищенной.

Затем в каждую пробирку (с разведениями комплемента пробирки 1-12 и контрольными пробами) добавляют по 0,2 мл гемолитической системы (состоит из суспензии эритроцитов барана и гемолитической сыворотки),

тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 60 мин; затем охлаждают 10 мин при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре в кюветах с толщиной слоя 10 мм при длине волны 541 нм. Раствор сравнения – буферный раствор.

Рассчитывают степень гемолиза (Y) по формуле (3):

$$Y = \frac{A_{\text{п}} - A_{\text{о}}}{A_{\text{к}} - A_{\text{о}}},$$

где: $A_{\text{п}}$ – среднее значение оптической плотности испытуемой пробы;

$A_{\text{о}}$ – среднее значение оптической плотности контрольной пробы без гемолиза;

$A_{\text{к}}$ – среднее значение оптической плотности контрольной пробы с полным гемолизом.

С помощью программного обеспечения или на миллиметровой бумаге с логарифмическим масштабом строят график со значениями $Y/(1-Y)$ по оси абсцисс и количеством разведенного комплемента (в мл) по оси ординат. Получают оптимизированную кривую (при построении графика учитываются значения степени гемолиза, находящиеся в диапазоне от 0,15 до 0,85; значения, находящиеся за пределами указанного диапазона не учитываются), соответствующую нанесенным точкам, и определяют ординату для дозы комплемента, приводящей к 50% гемолизу, т.е. $Y/(1-Y)=1$.

Вычисляют активность комплемента в исходном растворе, выраженную в гемолитических единицах ($\text{CH}_{50}/\text{мл}$), по формуле (4):

$$\text{CH}_{50}/\text{мл} = \frac{B}{C \times 5},$$

где: B – величина, обратная степени разведения комплемента;

C – объем разведенного комплемента (мл), вызывающий 50% гемолиз ($Y/(1-Y)=1$);

5 – множитель для учета количества эритроцитов.

Результат титрования комплемента считают достоверным при условии, что наклон прямой составляет от 0,15 до 0,40, предпочтительно в интервале 0,18-0,30.

Определение антикомплементарной активности испытуемого образца иммуноглобулина

Проверяют рН испытуемого образца иммуноглобулина потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». При рН менее 7,0 его доводят до значений 7,0-7,3 с помощью 0,1М раствора натрия гидроксида (если нет иных указаний в фармакопейной статье). Определяют содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка». — Готовят пробу испытуемого образца иммуноглобулина, в зависимости от содержания белка. Например, при содержании белка в испытуемом образце иммуноглобулина 50 мг/мл, к 0,2 мл раствора иммуноглобулина добавляют 0,6 мл буферного раствора. Если содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина отличается от 50 мг/мл, используют большие или меньшие объемы испытуемого образца иммуноглобулина. Точный объем испытуемого образца иммуноглобулина (V) в мл рассчитывают по формуле (5):

$$V = \frac{50 \times 0,2}{C},$$

где 50 – необходимое содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина, мг/мл;

0,2 – объем испытуемого образца иммуноглобулина, взятый для испытания, мл;

C – фактическое содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина, мг/мл.

Объем пробы доводят буферным раствором до 0,8 мл.

Подготовку положительного и отрицательного контролей с использованием стандартного образца иммуноглобулина человека (BRP или аналогичного) проводят в соответствии с инструкцией по его применению.

Для приготовления пробы с контролем комплемента в пробирку вносят 0,8 мл буферного раствора.

Во все приготовленные пробы добавляют по 0,2 мл раствора комплемента, содержащего 100 СН₅₀/мл. Конечный объем проб – 1 мл.

Пробирки инкубируют в термостате при температуре 37±0,5⁰С в течение 60 мин.

По истечении срока инкубации готовят разведения 1:50 для проб с контролем комплемента и испытуемым образцом иммуноглобулина. Разведения контрольных образцов (положительный и отрицательный контроль) проводят в соответствии с инструкцией по применению к стандартному образцу.

Проводят определение остаточной активности комплемента (в двух повторностях) в соответствии с Таблицей 3.

Таблица 3 - Порядок подготовки проб для определения остаточной активности комплемента

Номера пробирок	Объем пробы, мл	Объем буферного раствора, мл
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1

Для приготовления контрольных проб без гемолиза в три пробирки вносят по 1,3 мл буферного раствора.

Для приготовления контрольных проб с полным гемолизом в три пробирки вносят по 1,3 мл воды очищенной.

Затем в каждую пробирку (пробирки 1-12 и пробирки с контрольными пробами) добавляют по 0,2 мл гемолитической системы, тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 60 мин, затем охлаждают 10 мин при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 541 нм. Раствор сравнения – буферный раствор. Рассчитывают степень гемолиза (Y) по формуле (3) и строят график, как и при титровании комплемента.

Если центрифугирование и/или считывание результатов не может быть проведено немедленно, пробы хранят при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ не более 1 ч.

Учет и интерпретация результатов

Вычисляют по формуле (4) активность комплемента в гемолитических единицах ($\text{CH}_{50}/\text{мл}$) для испытуемого образца иммуноглобулина, контрольных образцов (положительный и отрицательный контроли) и контроля комплемента.

Антикомплементарную активность испытуемого образца иммуноглобулина (в %) и контрольных образцов (положительный и отрицательный контроли) вычисляют относительно АКА в контроле комплемента, принятой за 100%, по формуле (6):

$$\text{АКА} = \frac{b-a}{b} \times 100 \%,$$

где: b – активность комплемента ($\text{CH}_{50}/\text{мл}$) в контроле комплемента, рассчитанная по формуле (4);

a – активность комплемента ($\text{CH}_{50}/\text{мл}$) в испытуемом образце иммуноглобулина и в контрольных образцах (положительный и отрицательный контроли), рассчитанная по формуле (4).

Антикомплементарную активность испытуемого образца иммуноглобулина в $\text{CH}_{50}/\text{мг}$ белка рассчитывают по формуле (7):

$$\text{АКА}(\text{СН}_{50}/\text{мг белка}) = \frac{20 \text{ СН}_{50} \times \left(\frac{b-a}{b}\right)}{10},$$

где: 20 СН₅₀ – количество комплемента, взятого для испытания;

b – активность комплемента (СН₅₀/мл) в контроле комплемента, рассчитанная по формуле (4);

a – активность комплемента (СН₅₀/мл) в испытуемом образце иммуноглобулина и в контрольных образцах (положительный и отрицательный контроли), рассчитанная по формуле (4);

10 – количество белка иммуноглобулина (мг), взятого для испытания.

Результаты испытания препарата иммуноглобулина считают достоверными, если:

1. Анतिकомплементарная активность отрицательного и положительного контролей находится в пределах, лимитируемых в инструкции по применению к стандартному образцу;

2. Активность комплемента в контроле комплемента находится в пределах от 80 до 120 СН₅₀/мл.

В противном случае проводят повторный анализ.

Примечания

1. Приготовление буферных растворов (желатин-солевого или желатин-барбиталового).

1.1. Приготовление желатин-солевого раствора. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1 г желатина, прибавляют примерно 200 мл воды очищенной и оставляют набухать. Смесь нагревают при температуре 45±3°С до полного растворения. Полученный прозрачный раствор охлаждают до комнатной температуры.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 8,5 г натрия хлорида, 0,1 г кальция хлорида безводного, 0,04 г магния хлорида 6-водного, растворяют в небольшом количестве воды очищенной и прибавляют приготовленный раствор желатина. Общий объем раствора доводят водой очищенной до метки и перемешивают. Доводят рН раствора до 7,2-7,3 с помощью 0,1М раствора натрия гидроксида. Раствор используют свежеприготовленным.

1.2. Приготовление желатин-барбиталового буферного раствора.

1.2.1. Приготовление исходного раствора кальция и магния хлорида. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в небольшом количестве воды очищенной 4,412 г кальция хлорида дигидрата и 20,332 г магния хлорида 6-ти водного, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре $5\pm 3^\circ\text{C}$ в течение 1 мес.

1.2.2. Приготовление исходного барбиталового буферного раствора (рН 7,3). В мерной колбе вместимостью 2000 мл растворяют, постоянно перемешивая, 83,0 г натрия хлорида и 10,192 г барбитала натрия в 1700 мл воды очищенной. Показатель рН доводят до 7,3 1М с помощью раствора хлористоводородной кислоты. Добавляют 5 мл исходного раствора кальция и магния хлорида, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре $5\pm 3^\circ\text{C}$ в течение 1 мес.

1.2.3. Приготовление раствора желатина. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,25 г желатина, прибавляют 500 мл воды очищенной и тщательно перемешивают. Полученную смесь нагревают при температуре $45\pm 3^\circ\text{C}$ до полного растворения желатина. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Используют только свежеприготовленный раствор.

1.2.4. Приготовление желатин-барбиталового буферного раствора. Прибавляют 4 части раствора желатина к 1 части исходного барбиталового буферного раствора, тщательно перемешивают и доводят рН до 7,2-7,3 с помощью 1М раствора натрия гидроксида или 1М раствором хлористоводородной кислоты. Раствор используют свежеприготовленным.

2. Подготовка контрольных образцов. Подготовку отрицательного и положительного контролей осуществляют в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению к стандартному образцу (СО) иммуноглобулина человека.

3. Приготовление стабилизированной крови барана. Берут один объем крови барана и один объем цитратного раствора, перемешивают. Хранят при температуре $5\pm 3^\circ\text{C}$. Стабилизированную кровь барана можно использовать в течение 28 дней, но не ранее чем через 7 дней после взятия.

4. Приготовление цитратного раствора. Растворяют в 750 мл воды очищенной 20,5 г глюкозы, 8,0 г натрия лимоннокислого трехзамещенного и 4,2 г натрия хлорида, устанавливают рН раствора 6,1 раствором лимонной кислоты (100 г/л), доводят объем раствора до 1000 мл водой очищенной. Стерилизуют текучим паром в течение 30 мин при температуре 100°C . Хранят при температуре $5\pm 3^\circ\text{C}$ в течение 1 мес.

5. Приготовление гемолитической системы (суспензии сенсibilизированных эритроцитов барана). Гемолитическая сыворотка – иммунная сыворотка против эритроцитов барана, которую получают путем

иммунизации кроликов. (Такие гемолитические сыворотки предлагаются рядом коммерческих источников).

Для получения гемолитической системы гемолитическую сыворотку, разведенную до 2 МГЕ/мл, добавляют к 5% суспензии эритроцитов барана в соотношении 1:1. Инкубируют в термостате при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 15 минут, после чего хранят при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и используют в течение 6 часов.

6. Комплемент морских свинок. Готовят пул сыворотки из крови не менее 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от сгустка крови центрифугированием при температуре 4°C . Хранят в небольших количествах при температуре ниже минус 70°C .

7. Приготовление раствора комплемента, содержащего 100 CH_{50} /мл. В зависимости от исходной активности комплемента 1 мл раствора комплемента разбавляют буферным раствором до содержания 100 CH_{50} /мл.