

Валидация метода определения содержания активатора прекалликреина в препарате Альбумин человека

М. В. Томилин¹, Е. В. Филатова¹, М. М. Кузнецова¹, В. В. Судакова¹, Н. В. Зубкова²

¹ Филиал Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-производственное объединение «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио», Нижний Новгород, Россия

² Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-производственное объединение «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 09.02.2017 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Активатор прекалликреина (ПКА) рассматривается как один из важнейших факторов, определяющих безопасность препаратов крови, таких как альбумин и иммуноглобулин для внутривенного введения. Примеси ПКА в высокой концентрации могут вызывать нежелательные побочные эффекты у пациентов при введении препаратов крови. В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи (ГФ) Российской Федерации (XIII издание) препараты альбумина человека должны выдерживать испытание на количественное содержание активатора прекалликреина, однако описание метода отсутствует. Цель настоящей работы заключалась в валидации метода количественного определения ПКА в препаратах «Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий» 10 % и 20 % с использованием коммерческого набора PreKallikrein Activator Assay Kit PW301EP («Pathway Diagnostics Ltd», Великобритания). В результате валидации было установлено, что методика является правильной, линейной, прецизионной и специфичной. Метод характеризуется простотой проведения эксперимента, высокой точностью и сходимостью результатов, что позволяет использовать его в условиях контрольно-аналитической лаборатории. Показано, что во всех исследованных сериях препарата «Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий» 10 % и 20 %, выпущенных Филиалом ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио», содержание ПКА было менее 1 МЕ/мл, что соответствует требованиям, предъявляемым ГФ РФ к данным препаратам.

Ключевые слова: альбумин; активатор прекалликреина; валидация; метрологические характеристики; препараты крови.

Библиографическое описание: Томилин МВ, Филатова ЕВ, Кузнецова ММ, Судакова ВВ, Зубкова НВ. Валидация метода определения содержания активатора прекалликреина в препарате «Альбумин человека». БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 59–64.

Активатор прекалликреина (ПКА) представляет собой активную форму в виде продуктов распада XII фактора свертывания крови [1]. Фактор XII или фактор Хагемана циркулирует в крови в виде неактивного зимогена и легко разрушается до фрагментов — факторов XIIa и XIIf (последний образуется вследствие протеолиза тяжелых цепей фактора XIIa). Такое превращение фактора XII осуществляется в тесной связи с калликреин-кининовой сигнальной системой и другими каскадными протеолитическими реакциями плазмы крови [2, 3]. ПКА запускает трансформацию прекалликреина в калликреин, что, в свою очередь, через серию биохимических реакций приводит к синтезу вазоактивного пептида — брадикинина [4]. Брадикинин, обладая мощным сосудорасширяющим действием, может вызывать гипотензивный эффект у пациентов при введении препаратов крови с высоким содержанием примесей ПКА [4, 5]. Кроме того, ПКА в высоких концентрациях может приводить не только к гипотензии, но и к вазодилатации [6], в связи с этим ПКА рассматривается как один из важнейших факторов, определяющих безопасность препаратов крови, таких как альбумин и иммуноглобулин для внутривенного введения.

В соответствии с Европейской фармакопеей (ЕФ) концентрация ПКА в инфузионных препаратах не должна превышать 35 МЕ/мл [7]. Отечественные производители в на-

стоящее время не контролируют препараты крови на содержание ПКА. В связи с утверждением Государственной Фармакопеи (ГФ) РФ (XIII издание), регламентирующей нормы содержания ПКА в препаратах альбумина, такая задача возникла. Согласно фармакопейной статье (ФС) 3.3.2.006.15 «Альбумин человека» количественное определение ПКА рекомендуется проводить хромогенным методом, однако описание метода в ГФ РФ XIII отсутствует [8].

Способ оценки концентрации ПКА, изложенный в статье 2.6.15 ЕФ, включает в себя этап получения субстрата прекалликреина из крови или плазмы с применением ионообменной хроматографии [9]. Данная процедура является длительной, сложной и плохо воспроизводимой, что затрудняет ее использование в лабораторных условиях для рутинного тестирования препаратов альбумина. Альтернативой данному способу является метод количественного определения ПКА в препаратах крови с помощью коммерческих наборов реагентов, однако их применение для контроля качества лекарственных средств требует валидации [10].

Цель настоящей работы заключалась в валидации метода количественного определения ПКА в препаратах Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 % с использованием коммерческого набора

PreKallikrein Activator Assay Kit PW301EP («Pathway Diagnostics Ltd», Великобритания).

Материалы и методы

Для валидации методики использовали

– референс-стандарт (Prekallikrein activator in Albumin BRP batch 3) с аттестованным содержанием ПКА 30 МЕ/мл;

– производственные серии препарата Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % ($n = 3$) и 20 % ($n = 3$), выпущенные Нижегородским филиалом ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России.

Определение количественного содержания ПКА в исследуемых пробах выполняли в соответствии с инструкцией по применению набора PreKallikrein Activator Assay Kit («Pathway Diagnostics Ltd», Великобритания; кат. № PW301EP). Оценку результатов проводили после остановки реакции («по конечной точке», End point) с по-

мощью анализатора микропланшетного Sunrise™ («Тесап», Австрия) при основной длине волны 405 нм и референсной — 620 нм.

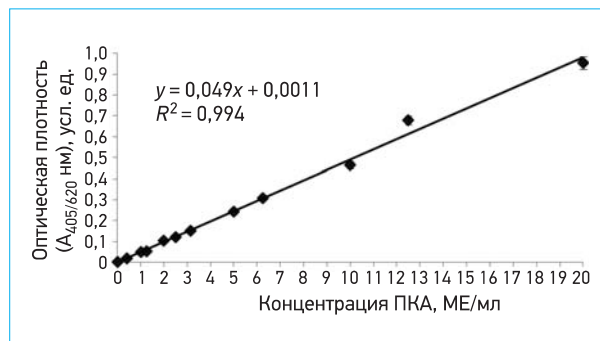


Рис. 1. График зависимости оптической плотности от концентрации ПКА.

Таблица 1. Метрологические характеристики результатов эксперимента по определению правильности

Значение концентрации ПКА в образце, принимаемое за истинное, МЕ/мл	№ исследования	Концентрация ПКА, МЕ/мл	$\bar{x}$	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	Доверительный интервал ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$)
0	1	0,1816	0,056	0,0039	0,0625	0,0255	0,066	0–0,122
	2	0,0184						
	3	0,0388						
	4	0,0184						
	5	0,0388						
	6	0,0388						
0,625	1	0,6714	0,641	0,0025	0,0496	0,0202	0,052	0,589–0,693
	2	0,651						
	3	0,6918						
	4	0,5898						
	5	0,6714						
	6	0,5694						
4,4	1	4,6306	4,413	0,1291	0,3593	0,1467	0,377	4,036–4,790
	2	3,9163						
	3	3,998						
	4	4,6102						
	5	4,5694						
	6	4,7531						
12,7	1	12,651	12,835	0,0731	0,2705	0,1104	0,284	12,551–13,115
	2	12,8959						
	3	13,1408						
	4	13,0592						
	5	12,8551						
	6	12,4061						
35	1	34,894	34,758	0,0750	0,2739	0,1118	0,287	34,471–35,045
	2	34,690						
	3	34,853						
	4	34,853						
	5	34,241						
	6	35,016						

При валидации методики определяли линейность, правильность, прецизионность и специфичность в соответствии с ОФС 1.1.0012.15 ГФ РФ XIII [11].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel в соответствии с ОФС 1.1.0013.15 ГФ РФ XIII [12].

Результаты и обсуждение

Проведена валидация методики определения количественного содержания ПКА в препаратах Альбумин (Альбу-

мин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 % с применением коммерческого набора реагентов PreKallikrein Activator Assay Kit («Pathway Diagnostics Ltd», Великобритания). В основе конструкции тест-системы лежит метод, описанный в ЕФ. Принцип метода основан на способности ПКА превращать прекалликреин плазмы в калликреин, который, в свою очередь, расщепляет хромофор синтетического пептида L-пролин-фенилаланин-L-аргинин-R-нитроанилина (калликреиновый субстрат) с образованием окрашенных продуктов. Степень окраски оценивали спектрофотометрическим методом, при этом интенсив-

Таблица 2. Метрологические характеристики результатов, полученных при оценке сходимости и внутрилабораторной прецизионности

Препарат	n	Концентрация ПКА, МЕ/мл		$\bar{x}$	S^2		S	$S\bar{x}$	$S_r, \%$	$F_{\text{экс}}$	$F_{\text{таб}}$
		1 день	2 день	1 день	1 день	2 день	1 день	1 день	1 день		
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 %	140315	1	0,427	0,252	0,417	0,000132	0,000132	0,0115	0,0047	1,126	5,05
		2	0,406	0,273							
		3	0,406	0,252							
		4	0,427	0,273							
		5	0,427	0,273							
		6	0,406	0,252							
	160315	1	0,406	0,252	0,399	0,000107	0,000110	0,0103	0,0042	1,057	0,97
		2	0,406	0,231							
		3	0,386	0,231							
		4	0,406	0,252							
		5	0,386	0,231							
		6	0,406	0,252							
	170315	1	0,835	0,648	0,798	0,000896	0,000513	0,0299	0,0122	1,532	1,75
		2	0,794	0,71							
		3	0,774	0,669							
		4	0,774	0,669							
		5	0,835	0,648							
		6	0,774	0,67							
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 20 %	010315	1	0,330	0,346	0,348	0,000956	0,000485	0,0309	0,0126	3,632	2,00
		2	0,393	0,325							
		3	0,309	0,367							
		4	0,372	0,325							
		5	0,330	0,304							
		6	0,351	0,346							
	020315	1	0,456	0,513	0,456	0,000353	0,000110	0,0188	0,0077	1,682	3,24
		2	0,456	0,492							
		3	0,435	0,492							
		4	0,477	0,513							
		5	0,435	0,492							
		6	0,477	0,513							
	210315	1	0,540	0,617	0,526	0,002940	0,000804	0,0542	0,0221	4,208	3,63
		2	0,477	0,596							
		3	0,519	0,638							
		4	0,603	0,638							
		5	0,456	0,617							
		6	0,561	0,679							

Таблица 3. Метрологические характеристики результатов эксперимента по определению специфичности

Характеристика образца		$\bar{x}$	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	Теоретическое значение ПКА в образце, МЕ/мл	Recovery, %
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % (140315)	X_n	0,417	0,0001	0,0115	0,0047	—	0,417	100
	$X_n + 0,5$ мл	2,805	0,0102	0,1011	0,0720	0,909	2,710	103,51
	$X_n + 1$ мл	3,590	0,0300	0,1732	0,1230	1,557	3,470	103,46
Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 20 % (020315)	X_n	0,456	0,0004	0,0188	0,0077	—	0,456	100
	$X_n + 0,5$ мл	2,620	0,0221	0,1485	0,1050	0,334	2,728	96,04
	$X_n + 1$ мл	3,649	0,0318	0,1782	0,1260	1,601	3,485	104,71

ность окраски прямо пропорциональна концентрации ПКА в препарате.

Задачей валидации аналитической методики было определение ее метрологических характеристик, а именно, линейности, правильности, специфичности и прецизионности (в виде сходимости и внутрилабораторной прецизионности).

Для оценки линейности готовили и тестировали калибровочные образцы с концентрацией ПКА 0 МЕ/мл (буферный раствор) и растворы стандартного образца ПКА, входящего в состав тест-системы, в диапазоне концентраций 0,4–20 МЕ/мл. Находили оптическую плотность (ОП) образцов и строили калибровочный график зависимости значений ОП от концентрации ПКА (рис. 1). Полученные результаты обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной (трендовой) модели. Коэффициент достоверности аппроксимации (R^2) составил 0,994, что свидетельствует о линейности методики.

Правильность методики устанавливали путем оценки отклонения среднего результата от значения, принимаемого за истинное. Тестировали образцы с концентрацией ПКА 0 и 35 МЕ/мл, входящие в состав тест-системы, а также растворы референс-стандарта ЕФ с концентрацией ПКА 0,625; 4,4 и 12,7 МЕ/мл, и находили содержание ПКА в исследуемых образцах. В процессе обработки результатов определяли следующие метрологические характеристики: среднее значение определяемой величины ($\bar{x}$), дисперсия (S^2), стандартное отклонение (S), стандартное отклонение среднего результата ($S\bar{x}$). Устанавливали доверительный интервал средних результатов анализа ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$), полученных экспериментально, при доверительной вероятности 95 %. Показано, что значения, принимаемые за истинные, находятся внутри доверительного интервала, что позволяет считать методику правильной (табл. 1).

Для оценки сходимости (повторяемости) результатов, полученных в одинаковых условиях в пределах короткого промежутка времени, тестировали по 3 производственных серии препаратов Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % (технологические серии 140315, 160315 и 170315) и 20 % (технологические серии 010315, 020315 и 210315) на количественное содержание ПКА. Каждый образец анализировали в 6 повторах. Аналогичное исследование было выполнено в другой день с целью оценки внутрилабораторной прецизионности. Величина относительного стандартного отклонения (S_r) не превышала 6 %, т.е. результаты, полученные при оценке сходимости методики, удовлетворяли критериям приемлемости. Внутрилабораторную прецизионность устанавливали по критерию

Фишера (F), сравнивая значения критерия Фишера, полученного экспериментально ($F_{\text{эксп}}$), с табличным значением ($F_{\text{таб}}$) при доверительной вероятности 95 %. Как видно из данных, представленных в таблице 2, полученные результаты полностью удовлетворяли критериям приемлемости.

Одним из важных критериев валидации методики является специфичность. Для оценки специфичности применяли метод добавок, используя раствор референс-стандарта ПКА с концентрацией 5 МЕ/мл. Добавляли к 0,5 мл препарата Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 % (X_n) раствор референс-стандарта ПКА в объеме 0,5 мл ($X_n + 0,5$) и 1,0 мл ($X_n + 1$). Рассчитывали теоретическое значение концентрации ПКА в пробах с добавками, учитывая содержание ПКА в препаратах альбумина, установленное при оценке прецизионности. Определяли практическое значение ПКА в исследуемых образцах, рассчитывали метрологические характеристики и оценивали коэффициент восстановления (Recovery), который по данным производителя набора должен находиться в диапазоне 96–105 %.

Как видно из результатов, представленных в таблице 3, для анализируемых образцов коэффициент восстановления находился внутри интервала, заявленного производителем, и составил 96,04–104,71 %.

Содержание ПКА в препаратах Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 %, было менее 1 МЕ/мл (табл. 2), что соответствует требованиям, предъявляемым ГФ РФ XIII к данным препаратам [8].

Таким образом, в рамках исследований по разработке методов контроля, направленных на обеспечение безопасности и качества препаратов из плазмы крови человека, рекомендованных ЕФ [13], были проведены валидационные исследования метода количественного определения активатора прекалликреина в препаратах Альбумин (Альбумин человека), раствор для инфузий 10 % и 20 %. В результате валидации было установлено, что методика является правильной, линейной, прецизионной и специфичной. Кроме того, метод характеризуется простотой проведения эксперимента, высокой точностью и сходимостью результатов, что позволяет использовать его в условиях контрольно-аналитической лаборатории.

Литература

1. Kuwahara SS. Prekallikrein activator (Hageman factor fragment) in human plasma fractions. *Transfusion* 1980; 20(4): 433–9.
2. Гельцер БИ, Жилкова НН. Активность калликреин-кининовой системы у больных витамин В12-дефицитной анемией. *Бюллетень СО РАМН*. 2005; 117(3): 131–4.

3. Аубакирова АК. Оценка состояния калликреин-кининовой системы крови у недоношенных детей с перинатальной асфиксией. Вестник КРСУ. 2010; 10(4): 105–111.
4. Cyr M, Eastlund T, Blais C Jr, Rouleau JL, Adam A. Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions. Transfusion 2001; 41(1): 136–50.
5. Nezlin R. Interactions between immunoglobulin G molecules. Immunol Lett. 2010; 132(1–2): 1–5.
6. WHO. Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series. 1985. № 725. P. 18.
7. Seifner A, Beck G, Bayer P, Eichmeir S, Lackner F, Rögelsperger O, et al. Assessment of immunoglobulin concentrates on thrombogenic activity by thrombin generation assay, prekallikrein activator assay, and size-exclusion chromatography. Transfusion 2014; 54(2): 376–83.
8. ФС. 3.3.2.0006.15. Альбумин человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 1234–8. Available from: <http://femb.ru/feml>.
9. 2.6.15. Prekallikrein activator. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
10. Приказ Минпромторга России от 14 июня 2013 № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств».
11. ОФС. 1.1.0012.15. Валидация аналитических методов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 222–34. Available from: <http://femb.ru/feml>.
12. ОФС. 1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 235–64. Available from: <http://femb.ru/feml>.
13. Human albumin solution. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

Об авторах

Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио». Российская Федерация, 603950, Нижний Новгород, ул. Грузинская, д. 44.

Томилин Михаил Вадимович. Начальник научно-производственной лаборатории научного отдела, кандидат биологических наук.

Филатова Екатерина Викторовна. Начальник научного отдела, кандидат биологических наук.

Кузнецова Мария Михайловна. Технолог цеха диагностических препаратов

Судакова Вера Вячеславовна. Микробиолог научно-производственной лаборатории научного отдела.

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России. Российская Федерация, 127473, Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10.

Зубкова Наталья Васильевна. Заместитель директора Центра разработок и внедрения (R&D) по препаратам крови, доктор фармацевтических наук.

Адрес для переписки: Томилин Михаил Вадимович; tomilin@imbio.ru

Validation of the method for determination of prekallikrein activator in Human Albumin

M. V. Tomilin¹, E. V. Filatova¹, M. M. Kuznetsova¹, V. V. Sudakova¹, N. V. Zubkova²

¹ Branch of Federal State Unitary Enterprise «Scientific Production Association «Microgen»

Nizhny-Novgorod Enterprise of Bacterial Preparations Production «ImBio», Nizhny Novgorod, Russia

² Federal State Unitary Enterprise «Scientific Production Association «Microgen», Moscow, Russia

Prekallikrein activator (PKA) is regarded as one of the most important factors determining the safety of blood products such as albumin and intravenous immunoglobulin. PKA impurity at a high concentration may cause undesired side effects when administered to patients of blood products. According to requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (13th edition) human albumin preparations have to pass test for the quantitative determination of prekallikrein activator (PKA), but there is no description of the method. The purpose of this study consisted in validation of a method of the quantitative definition of PKA in the preparations Albumin (human albumin) solution for infusions 10 % and 20 % with use of the commercial kit PreKallikrein Activator Assay Kit PW301EP («Pathway Diagnostics Ltd», UK). It is established that the method is accurate, linear, high-precision and specific. The method is characterized by the simplicity of the experiment, high accuracy and reproducibility that can be used in terms of control and analytical laboratories. It is shown that in all investigated batches of the drug Albumin (human albumin) solution for infusion 10 % and 20 % PKA content was less than 1 IU/ml, which corresponds to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation to these drugs.

Key words: albumin; prekallikrein activator (PKA); validation; the metrological characteristics; blood products.

For citation: Tomilin MV, Filatova EV, Kuznetsova MM, Sudakova VV, Zubkova NV. Validation of the method for determination of prekallikrein activator in Human Albumin. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(1): 59–64.

References

1. Kuwahara SS. Prekallikrein Activator (Hageman Factor Fragment) In Human Plasma Fractions. Transfusion 1980; 20: 433–9.
2. Geltser BI, Zhilkova NN. The activity of the kallikrein-kinin system in patients with vitamin B12 is-deficiency anemia. Bulletin SB RAMS 2005; 117: 131–4 (in Russian).
3. Aubakirova AK. Assessment of the kallikrein-kinin blood system in preterm infants with perinatal asphyxia. Herald KRSU 2010; 10: 105–11 (in Russian).
4. Cyr M, Eastlund T, Blais Ch, Rouleau J, Adam A. Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions. Transfusion 2001; 41: 136–50.
5. Nezlin R. Interactions between immunoglobulin G molecules. Immunology Letters 2010; 132: 1–5.
6. WHO. Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 1985. № 725. P. 18.
7. Seifner A, Beck G, Bayer P, Eichmeir S, Lackner F, Rögelsperger O, et al. Assessment of immunoglobulin concentrates on thrombogenic activity by thrombin generation assay, prekallikrein acti-

- vator assay, and size-exclusion chromatography. *Transfusion* 2014; 54: 376–83.
8. Human albumin (ФС 3.3.2.006.15). *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*, 13th ed. 2015. V. 3. P. 1234–8. Available from: <http://www.femb.ru> (in Russian).
9. 2.6.15. Prekallikrein activator. *European Pharmacopoeia* 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
10. Order of the Industry and Trade Ministry of Russia from 14.06.2013 № 916 «On approval of the Rules of production and quality control organization Medicines» (in Russian).
11. Validation of analytical methods (ФС 1.1.0012.15). *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*, 13th ed. 2015. V. 1. P. 222–34. Available from: <http://www.femb.ru> (in Russian).
12. Statistical analysis of the results of chemical experiment (ФС 1.1.0013.15). *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*, 13th ed. 2015. V. 1. P. 235–64. Available from: <http://www.femb.ru> (in Russian).
13. Human albumin solution. *European Pharmacopoeia* 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.

Authors

Branch of Federal State Unitary Enterprise «Scientific Production Association «Microgen» Nizhny-Novgorod Enterprise of Bacterial Preparations Production «ImBio». The Russian Federation, 603950, Nizhny Novgorod, Gruzinskaja street, 44.

Tomilin MV. Head of the scientific and industrial laboratory of the scientific department. Candidate of biological sciences.

Filatova EV. Head of the scientific department, candidate of biological sciences.

Kuznetsova MM. Technologist of department of diagnostic products.

Sudakova VV. Microbiologist of scientific and industrial laboratory of the scientific department.

Federal State Unitary Enterprise «Scientific Production Association «Microgen», 127473, Moscow, 2nd Volkonsky lane, 10.

Zubkova NV. Deputy Director of R&D Center Microgene. Doctor of Pharmacy.