

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2012

*А. Л. Берковский, Е. В. Сергеева, А. В. Суворов, А. А. Козлов*

## ТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГЕПАРИНА В ПРЕПАРАТАХ И СУБСТАНЦИЯХ

Гематологический научный центр, Москва, Россия

В настоящее время актуальным является развитие эффективного производства низкомолекулярных гепаринов, широко применяемых в клинической практике. Система обеспечения качества получения фармацевтических препаратов по руководствам ВОЗ требует, в частности, применения специфических и избирательных методов контроля активности гепарина в препаратах и субстанциях. На основании созданной из очищенных реагентов (тромбин, фактор Ха, антитромбин III) тест-системы разработана методика измерения низкомолекулярного гепарина по рекомендуемому Европейской фармакопеей хромогенному методу определения антиХа- и антиIIа-активности. Разработанный на базе данной тест-системы метод был оценен по основным аналитическим характеристикам. Установленные правильность, точность, линейность и воспроизводимость позволяют рекомендовать валидированный хромогенный метод, адаптированный к созданной тест-системе, для внедрения в контроль производства низкомолекулярных гепаринов.

**Ключевые слова:** низкомолекулярные гепарины, хромогенные методы, тест-системы, контроль производства.

В настоящее время в РФ интенсифицируется производство низкомолекулярных гепаринов (НМГ) из различных отечественных и импортных субстанций.

Гепарин, сульфатированный гликозаминогликан, — общее название гетерогенной смеси сульфатированных полисахаридных цепей, в состав которых входят повторяющиеся единицы D-глюкозамина, L-идуроновой или глюкуроновой кислот. Антикоагулянтная активность гепарина обусловлена его способностью повышать скорость инактивации сериновых протеаз, участвующих в свертывании крови, под действием антитромбина (АТ) III. Связывание гепарина с АТ III изменяет конформационное состояние активного центра, увеличивая ингибирующую способность АТ III, например, относительно тромбина в 1000 – 5000 раз. В присутствии гепарина АТ III быстро ингибирует активность факторов (Ф) IIa (тромбин), IXa, Xa, XIa и XIIa свертывания крови. Гетерогенность состава нефракционированного гепарина определяет наличие фракций с высоким (33 %) и низким сродством к АТ III. Наиболее специфичными для антикоагулянтной гепаринотерапии являются низкомолекулярные и высокоаффинные фракции гепарина. Критической молекулярной массой является 5400Д (18 – 19 моносахаридных единиц). Фракции гепарина с молекулярной массой ниже этой величины после комплексобразования с АТ III ингибируют ФХа (антиХа-активность гепарина), а с большей массой обладают и антитромбиновой (антиIIа) и антиХа-активностью. Низкомолекулярные гепарины (НМГ) получают из нефракционированного гепарина различными способами химиче-

ской или ферментативной деполимеризации, а также синтетически, поэтому НМГ различаются по своей антикоагулянтной активности [1 – 5].

В настоящее время препараты гепарина, особенно НМГ, широко используются для профилактики и лечения тромбозов коронарных, легочных и периферических сосудов, при гиперкоагуляционной фазе синдрома внутрисосудистого диссеминированного свертывания, при применении искусственного кровообращения и гемодиализа [6 – 8].

Широкое клиническое применение НМГ обуславливает необходимость эффективного производства таких препаратов. Процесс производства НМГ требует контроля по функциональной активности гепарина в исходной субстанции, полупродуктах и целевых препаратах НМГ. Эффективность производства фармацевтических препаратов во многом зависит от контроля качества выполняемых работ. Современная система обеспечения качества производства предъявляет, в частности, соответствующие требования к определению биологически активного вещества в субстанциях и готовых лекарственных формах. Согласно руководствам ВОЗ и Европейской фармакопее к таким требованиям относятся выбор специфических и избирательных методов измерения, аттестация и чистота компонентов используемых тест-систем, аналитическая валидация применяемой методики по ряду характеристик (правильность, точность, воспроизводимость, линейность и др.). Европейской Фармакопеей 4 рекомендован хромогенный метод количественной идентификации

НМГ по измерениям антиХа- и антиIIa-активности [9, 10].

Цель настоящей работы заключается в создании и внедрении в практику контроля производства НМГ тестирования функционально активного НМГ с помощью валидированного хромогенного метода и соответствующей тест-системы на основе полученных авторами высокоочищенных и аттестованных реагентов. Разработанный метод тестирования позволяет измерять ингибиторную активность гепарина в препаратах и субстанциях НМГ как по конечной точке, так и по кинетике процесса. Для решения этой задачи были разработаны способы получения высоко очищенных тромбина (ФIIa), ФХа и АТ III, а также специфических для тромбина и ФХа хромогенных субстратов.

Тромбин выделяли из свежезамороженной бычьей плазмы, получая протромбиновый комплекс сорбцией на DEAE-Sepharose FF, активацией ионами кальция и хроматографической очисткой на CM-Sepharose FF. Удельная активность получаемого тромбина была не менее 2000 МЕ/мг.

Высоко очищенный ФХа получали из протромбинового комплекса плазмы крови человека хроматографией на колонне с DEAE-Sepharose FF, активацией ядом гадюки Рассела с последующей очисткой активированного фактора хроматографией на DEAE-Sepharose FF. Удельная активность ФХа была равна 33 – 35 МЕ/мг [11].

Высоко очищенный АТ III выделяли из фракции плазмы крови человека, лишенной протромбинового комплекса. Выделение осуществлялось аффинной хроматографией на Heparin-Sepharose FF. Фактор очистки АТ III разработанным способом был равен 560.

Специфические для тромбина (ФIIa) и ФХа хромогенные субстраты были синтезированы в ООО “Синтез пептидов”, Москва. Степень чистоты применяемых субстратов по данным ВЭЖХ была не менее 98 %.

На базе полученных авторами реагентов и специфических для ФIIa и Ха хромогенных субстратов была сформирована тест-система для определения НМГ по рекомендуемому Европейской Фармакопеей методу.

Активность НМГ в препаратах и субстанциях определяли, добавляя к ним избыток АТ III и ФХа или ФIIa, что вызывает ингибирование факторов комплексом АТ III-НМГ пропорционально количеству НМГ в препарате или субстанции. Оставшееся количество

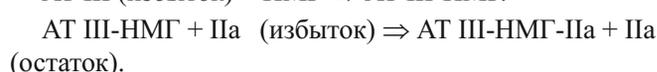
ФХа или ФIIa катализирует отщепление *пара*-нитроанилина (pNA) от синтетических хромогенных субстратов. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна антиХа- или антиIIa-активностям НМГ. Идентификацию функциональных свойств НМГ в препаратах и субстанциях проводили по отношению антиХа/антиIIa-активности.

Схематично измерения осуществляются следующим образом:

1. При определении антиХа-активности НМГ



2. При определении антиIIa-активности НМГ



В состав набора входят следующие лиофильно высушенные компоненты: АТ III (1МЕ/флакон), ФХа (15 нКат/флакон), ФIIa (10 НИН/флакон), хромогенный субстрат для ФХа (ZdArgGlyArgpNA x 2AcOH), хромогенный субстрат для ФIIa (TosGlyProArgpNA), рабочий стандартный образец (PCO) НМГ (с аттестованными против Международного стандарта НМГ антиХа- и антиIIa-активностями), бычий сывороточный альбумин (1 г), а также концентрат трис-NaCl буфера (5 мл). Срок годности набора реагентов при 2 – 8 °С составляет 2 года.

### Экспериментальная часть

В работе использовали Международный и Британский стандарты низкомолекулярного гепарина: Low Molecular Weight Heparin International Standard 01/608 и Low Molecular Weight Heparin British Standard CS30026, реагенты фирмы Chromogenix (Швеция) для определения НМГ, а также клинические препараты НМГ Фрагмин и Фраксипарин и субстанцию НМГ Эноксапарин.

При определении НМГ по конечной точке использовали планшетный спектрофотометр Multiscan EX (LabSystems, Финляндия) и термошейкер, а при кинетическом измерении – автоматический анализатор ACL ELITE PRO (IL, США). В ходе анализа применяли одно- и восьмиканальные пипетки, а также мерные колбы.

Для анализа использовали готовую лекарственную форму препарата НМГ или субстанцию НМГ, разведенную буфером для разбавления образцов до активности приблизительно 0,1антиХа МЕ/мл и 0,05антиIIa МЕ/мл. Из реагентов тест-системы соответствующим разведением готовили рабочие растворы для определения активного НМГ по рекомендуемому Европейской Фармакопеей [9] методу.

Таблица 1

#### Порядок внесения реактивов при определении антиХа-активности

Образец препарата (T <sub>1</sub> -T <sub>4</sub> ) или стандарта (S <sub>1</sub> -S <sub>5</sub> )	20 мкл
Раствор АТ III	20 мкл
Раствор ФХа	40 мкл
<b>Инкубация при 37 °С и перемешивании в течение 2 мин</b>	
Раствор хромогенного субстрата для ФХа	100 мкл
<b>Инкубация при 37 °С и перемешивании в течение 4 мин</b>	
Кислота уксусная	40 мкл

## Проведение анализа с применением разработанной тест-системы

Из РСО НМГ с активностью 10,6 антиХа МЕ/мл и 3,1 антиПа МЕ/мл с помощью рабочего буферного раствора готовили растворы препаратов сравнения S<sub>1</sub>-S<sub>6</sub> с активностями: 0,212; 0,141; 0,094; 0,0628; 0,0418 и 0,0278 антиХаМЕ/мл и 0,062; 0,042; 0,0277; 0,0185; 0,0123; 0,0082 антиПаМЕ/мл.

Из испытуемого препарата НМГ соответствующим разведением готовили растворы испытуемой субстанции T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>.

### Метод по конечной точке

Определения антиХа- и антиПа-активности НМГ проводили поэтапно в полистирольных планшетах, помещая их в термошейкер при 37 °С (табл. 1, 2).

– С помощью одноканальной пипетки соответствующие разведения РСО НМГ(S<sub>1</sub>-S<sub>5</sub>), испытуемого препарата и буферный раствор для определения “холостой” пробы вносили в объеме 20 мкл/лунку (каждое разведение вносили в 4 лунки планшета).

– С помощью многоканальной пипетки вносили по 20 мкл раствора АТ III (1 МЕ/мл) последовательно во все задействованные ряды планшета.

– В эти же ряды с помощью многоканальной пипетки вносили по 40 мкл раствора ФХа или ФПа и выдерживали в термошейкере при 37 ± 0,5 °С по секундомеру 2 мин.

– Далее с помощью многоканальной пипетки вносили по 100 мкл раствора хромогенного субстрата для ФХа или ФПа и инкубировали точно 4 мин при 37 ± 0,5 °С.

– Для остановки реакции вносили по 40 мкл 70 % раствора уксусной кислоты.

Измеряли оптическую плотность (ОП) растворов при 405 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiscan EX.

Определяли среднее значение ОП для параллельных проб разведений стандартного образца НМГ. В программе Microsoft Excel строили график, на котором по оси абсцисс (линейной) откладывали величины ОП, а по оси ординат (логарифмической) — антиХа- или антиПа-активность стандартного образца НМГ. Проводили линию тренда в диапазоне 0,2 – 0,04 МЕ/мл антиХа-активности или 0,04 – 0,008 МЕ/мл антиПа-активности. Коэффициент корреляции линии тренда был не ниже 0,98.

Используя уравнение линии тренда по средним значениям ОП, рассчитывали антиХа- и антиПа-активности исследуемого препарата с учетом разведений. Результаты расчета активности для каждого разведения исследуемого образца не различались между собой более чем на 10 %. В этом случае за активность исследуемого препарата принимали среднее значение активностей, полученных для каждого разведения.

### Кинетический метод

Определение антиХа- и антиПа-активности НМГ по кинетике процесса инактивации соответствующих ферментов проводили на автоматическом анализаторе ACL ELITE PRO. Прибор измеряет скорость нарастания ОП и был запрограммирован авторами для проведения анализа в заданной системе. В данном варианте метода использовали те же реагенты тест-системы. Реакцию проводили в системе: 40 мкл соответствующего разведения РСО НМГ или исследуемого препарата, 40 мкл АТ III, 80 мкл ФПа или ФХа и 90 мкл специфического для этих факторов хромогенного субстрата. ОП измеряли при 405 нм.

Для получения надежных результатов при применении разработанной тест-системы необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

### Валидация разработанного аналитического метода

Оценку правильности измерений хромогенным методом функционально активного НМГ по величине отношения антиХа/антиПа активности с помощью созданной тест-системы провели на аттестованных по антиПа- и антиХа-активности Британском и Международном стандартах НМГ. Определяли антиХа- и антиПа-активности в каждом из стандартов, используя в качестве калибратора другой стандарт. Показано, что правильность тестирования разработанным методом, то есть близость результатов измерений с истинными значениями, составляла 97 – 99 %. Правильность тестирования была также оценена по сравнению результатов измерения активностей НМГ предлагаемым методом и валидированной методикой с использованием реагентов фирмы Chromogenix (Швеция). В этом варианте валидации правильность измерений также составляла 98 %.

Полагая доказанной правильность определения активностей НМГ, провели количественную аттестацию созданного нами РСО НМГ с использованием в качестве калибратора Британского стандарта. Полученные значения антиПа- и антиХа-активности РСО составляют 3,12 ± 0,05 и 10,57 ± 0,12 МЕ/мл соответственно. Результаты измерений международных стандартов с применением РСО НМГ в качестве калибратора свидетельствуют о правильности тестирования; относительная погрешность не превышала 5 %. Эти данные позволили включить РСО НМГ в тест-систему.

Воспроизводимость тестирования доказана при проведении анализа в лаборатории авторов в разное время различными сотрудниками, а также при измерении активностей одних и тех же образцов НМГ в дру-

Таблица 2

#### Порядок внесения реактивов при определении антиПа-активности

Образец препарата (T <sub>1</sub> -T <sub>4</sub> ) или стандарта (S <sub>2</sub> -S <sub>6</sub> )	20 мкл
Раствор АТ III	20 мкл
Раствор ФПа	40 мкл
<b>Инкубация при 37 °С и перемешивании в течение 2 мин</b>	
Раствор хромогенного субстрата для ФПа	100 мкл
<b>Инкубация при 37 °С и перемешивании в течение 4 мин</b>	
Кислота уксусная	40 мкл

гих лабораториях. Получаемые результаты не различались более чем на 8 %.

Анализ результатов тестирования функционально активного НМГ разработанной тест-системой в препаратах НМГ Фрагмин (2 лекарственных формы), Фраксипарин, в субстанции НМГ Эноксапарин и в РСО НМГ позволяет сделать следующие заключения об основных аналитических характеристиках методики.

Линейность определяемых значений антиХа-активности НМГ лежит в диапазоне от 0,2 до 0,04 МЕ/мл, при этом отклонение от линейности не превышает 4 %.

Линейность определяемых значений антиIIa-активности НМГ лежит в диапазоне от 0,06 до 0,008 МЕ/мл; при этом отклонение от линейности не превышает 6 %.

Коэффициент вариации (случайная погрешность) результатов определения антиХа- и антиIIa-активности НМГ не превышает 5 и 1,5 % соответственно.

Чувствительность метода определения антиХа- и антиIIa-активностей составляет 0,01 МЕ/мл.

Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии не превышает 10 %.

Таким образом, разработанное тестирование НМГ хромогенным, рекомендуемым Европейской фармакопеей методом соответствует предъявляемым к аналитическому контролю требованиям и может быть при-

менено для оценки эффективности этапов процесса производства и целевых лекарственных препаратов НМГ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Д. М. Зубаиров, *Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования*, ФЭН, Казань (2000), сс. 219 – 240.
2. Р. У. Колмен, *Нарушения реакций образования тромбина*, Медицина, Москва (1988), сс. 175 – 207.
3. A. J. Chen, *J. Lab. Clin. Med.*, **85**, 843 – 856 (1975).
4. M. Johnston, in: *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis.*, S. Kitchen, J. D. Olson and F. E. Preston (eds.), Wiley-Blackwell (2009), pp. 170 – 178.
5. J. Hirsh, *Low Molecular Weight Heparins*, Decker, Hamilton, Canada (2007).
6. J. Choay, M. Petitou, J. C. Lormeau, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 492 – 499 (1983).
7. S. D. Niles, R. G. Sutton, J. Ploessl, et al., *J. Extracorpor. Technol.*, **7**, 197 – 200 (1995).
8. A. G. Turpie, A. S. Gallus, J. A. Hoek, *N. Engl. J. Med.*, **344**, 619 – 625 (2001).
9. European Pharmacopoeia 4, Heparins, low-molecular-mass., 01 / 2002:0828, pp. 1297 – 1299.
10. In: *WHO Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations*, Thirtysecond report, WHO, Geneva (1992), pp. 117 – 121.
11. Патент РФ 2221578 (2004).

Поступила 04.10.10

## EVALUATING ACTIVITY OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARIN IN PREPARATIONS AND SUBSTANCES

A. L. Berkovskii, E. V. Sergeeva, A. V. Suvorov, and A. A. Kozlov

Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125167, Russia

The task of developing effective production of low-molecular-weight (LMW) heparins, which are widely used in clinical practice, is topical. The system of maintenance of the quality of pharmaceutical preparations under WHO guidance stipulates, in particular, the application of specific and selective quality monitoring of the activity of heparin in preparations and substances. Using a test system based on purified reactants (thrombin, factor Xa, antithrombin III), a technique for the measurement of LMW heparin according to the anti-Xa/anti-IIa chromogenic method recommended by the European Pharmacopoeia has been developed. The proposed technique has been evaluated with respect to the main analytical characteristics. The established accuracy, precision, linearity, and reproducibility allow the validated chromogenic method, adapted for the proposed test system, to be recommend for introduction in the quality control of LMW heparin production.

**Key words:** low-molecular-weight heparins, chromogenic methods, test systems, manufacture quality control