



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения



PerЛек

Практические аспекты определения активности гепаринов хромогенным методом (анти-IIa факторная активность и анти-Xa факторная активность)

Ведущий эксперт лаборатории
биотехнологических
препаратов

к.х.н. Бендрышева С.Н.

27 апреля 2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



Нефракционированные гепарины (НФГ)

Показатели качества:

Подлинность А: ЛС проявляет анти-IIa факторную активность.

Подлинность Б: отношение значения анти-Ха факторной активности к значению анти-IIa факторной активности.

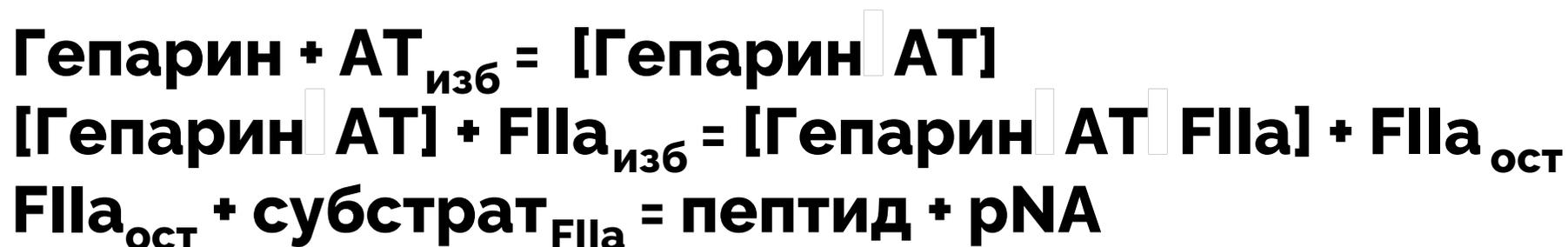
Количественное определение: анти-IIa факторная активность.

Низкомолекулярные гепарины (НМГ)

Показатели качества:

Подлинность Б: отношение значения анти-Ха факторной активности к значению анти-IIa факторной активности.

Количественное определение: анти-Ха факторная активность,
анти-IIa факторная активность



Гепарин – НФГ или НМГ, АТ – антитромбин, FIIa – фактор IIa (тромбин), pNA – п-нитроанилин, субстрат_{FIIa} – синтетический пептидный субстрат, специфичный для FIIa.

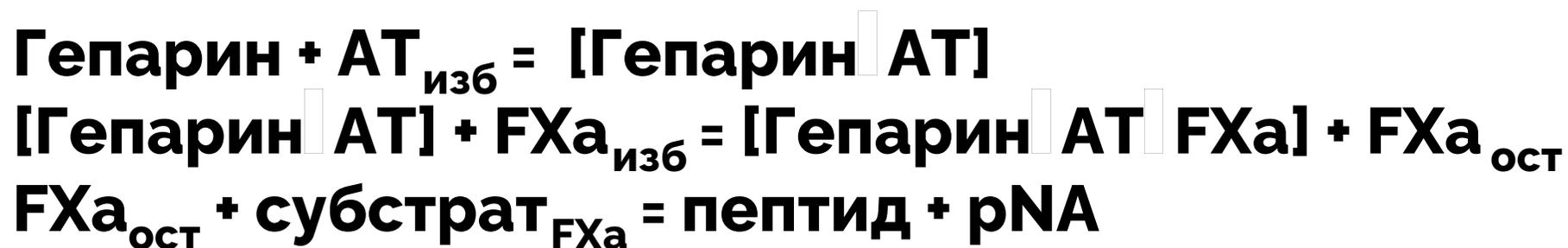
Количество pNA обратно пропорционально анти-IIa факторной активности гепарина.

Измеряют:

- изменение оптической плотности за единицу времени при 405 нм или

- оптическую плотность после остановки реакции при 405 нм

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают анти-IIa факторную активность гепарина, используя статистическую модель параллельных линий.



Гепарин – НФГ или НМГ, АТ – антитромбин, FXa – фактор Ха, pNA – п-нитроанилин, субстрат_{FXa} – синтетический пептидный субстрат, специфичный для FXa.

Количество pNA обратно пропорционально анти-Ха факторной активности гепарина.

Измеряют:

- изменение оптической плотности за единицу времени при 405 нм или
- оптическую плотность после остановки реакции при 405 нм

Проверяют достоверность результатов испытания и рассчитывают анти Ха-факторную активность, используя статистическую модель параллельных линий.



Нефракционированные гепарины - соединения природного происхождения, выделяемые из слизистой оболочки кишечника свиней.

Низкомолекулярные гепарины получают фракционированием или деполимеризацией гепарина природного происхождения.

Поэтому необходимо при каждом испытании подтверждать, что зависимость «доза-эффект» для стандартного образца и зависимость «доза-эффект» для испытуемого лекарственного средства не имеют статистически значимых отличий.

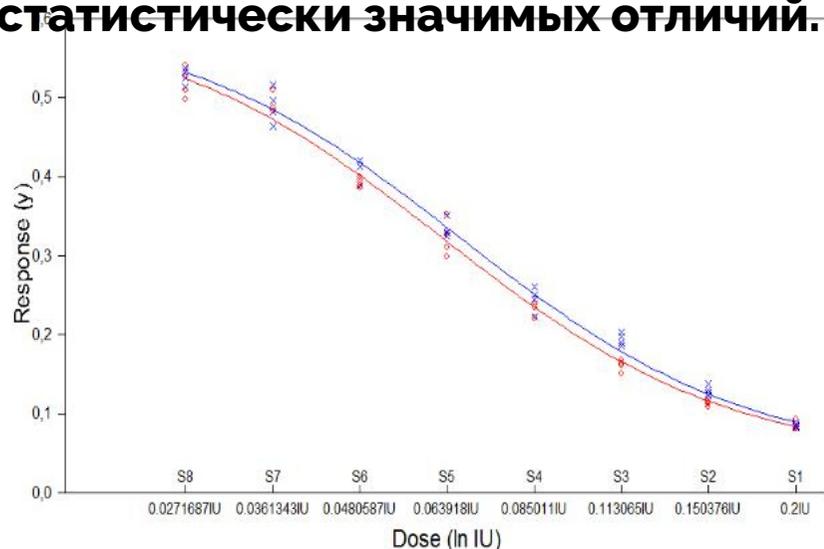


Рис. 1. График зависимости оптической плотности стандартных растворов от логарифма их анти-Ха факторной активности (красная линия), график зависимости оптической плотности испытуемых растворов от логарифма заявленных значений анти-Ха факторной активности (синяя линия).

Условия: Евр.Ф. (0828), 0,027 – 0,2 анти-Ха МЕ/мл, фактор Ха 1,8 нкат/мл.



В каждом испытании готовят:

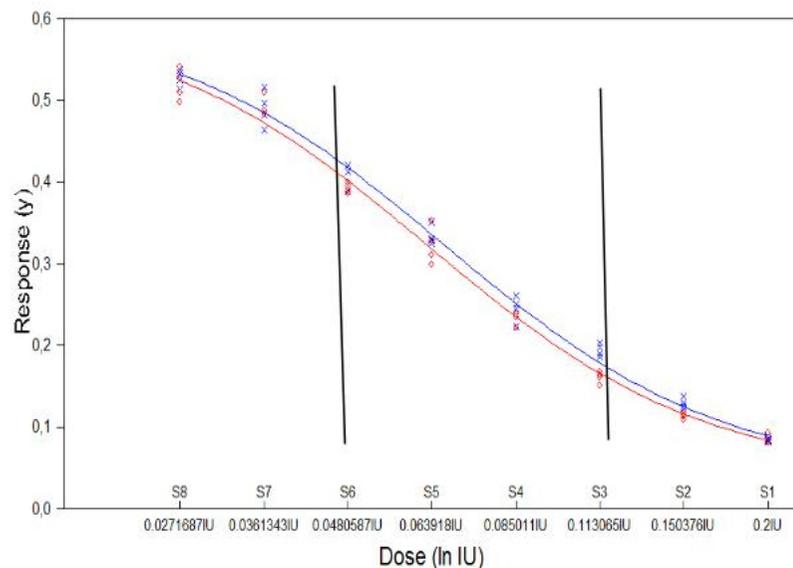
серии растворов стандартного образца S_1, S_2, S_3, S_4

серии растворов испытуемого образца T_1, T_2, T_3, T_4

Требования к серии разведений стандартного образца:

1) Значения активностей растворов $S_1 - S_4$ должны находиться в диапазоне, указанном в фармакопейной статье.

ВАЖНО! S_1 и S_4 не обязаны совпадать с границами диапазона.



2) Выбранные значения активностей растворов $S_1 - S_4$ должны находиться в области линейной зависимости оптической плотности от логарифма активности.

3) Шаг разведения (отношение активности предшествующего раствора S_n или T_n к активности последующего раствора S_{n+1} или T_{n+1} , соответственно) должен быть постоянным и одинаковым для растворов стандартного и испытуемого образца.

(обычно шаг разведения 1,25 – 1,5)



Требования к серии разведений испытуемого образца:

- 1) Значения активностей растворов стандартного образца $S_1 - S_4$ и предполагаемые значения активностей растворов испытуемого образца $T_1 - T_4$, рассчитанные исходя из заявленной активности, должны быть одинаковые.

Цель эксперимента в рамках хромогенного кинетического метода определения активности гепарина состоит в том, чтобы экспериментально измерить значение коэффициента, связывающего действительную активность образца с его предполагаемой активностью, которую брали в расчет при разведении лекарственного средства в ходе испытания.



В качестве стандартов НФГ используют:

Международный стандартный образец: 6th International Standard for Unfractionated Heparin, WHO International Standard (NIBSC code 07/328)

Вторичные стандартные образцы:

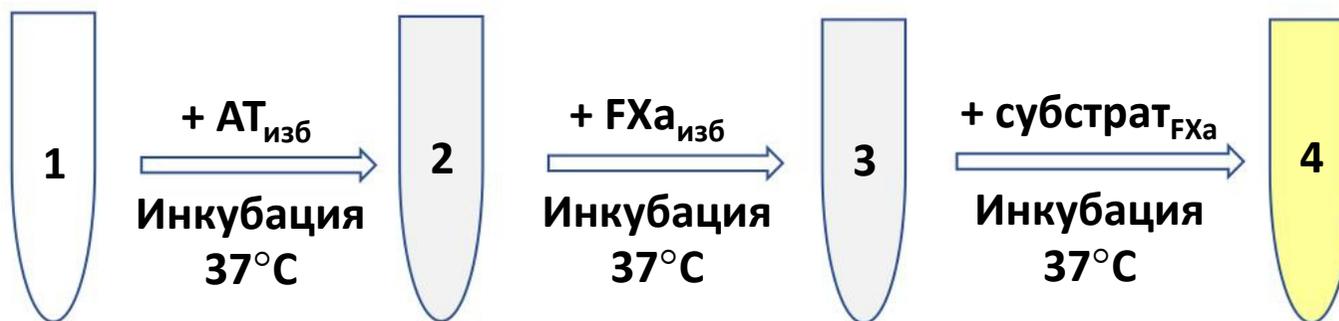
- ❖ **Heparin Sodium BRP, Ph.Eur.Reference Standard (cat. code H0200000)**
- ❖ **Heparin Sodium for Assays, USP Reference Standard (cat. No.: 1304016)**
- ❖ **Стандарт фирмы**

В качестве стандартов НМГ используют:

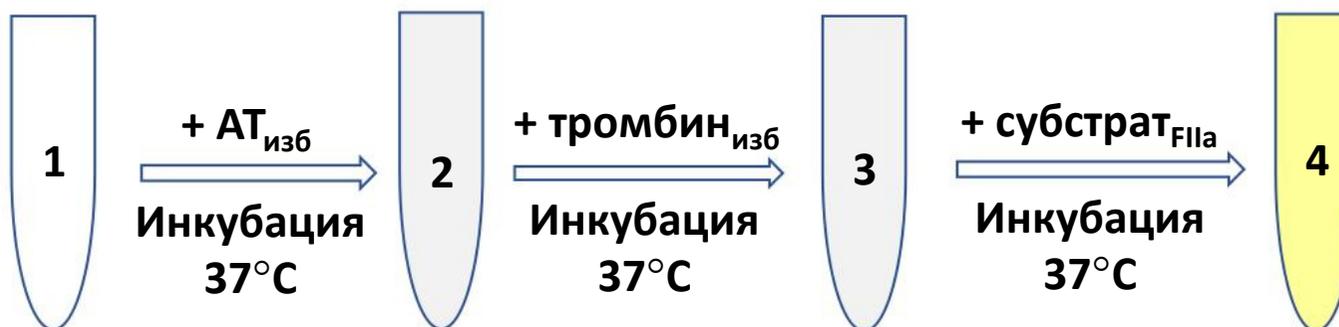
Международный стандартный образец: 3rd International Standard for Low Molecular Weight Heparin, WHO International Standard (NIBSC code 11/176)

Вторичные стандартные образцы:

- ❖ **Heparin low-molecular-mass for assay BRP, Ph.Eur.Reference Standard (cat. code H0185000)**
- ❖ **Low Molecular Weight Heparin for Bioassays, USP Reference Standard (cat. No.: 1304016)**
- ❖ **Енохепарин Sodium for Bioassays, USP Reference Standard (cat. No.: 1235831)**
- ❖ **Стандарт фирмы (определённый НМГ, например эноксапарин натрия, надропарин кальция и др.)**



(1) – гепарин, (2) – [гепарин | AT], (3) – FXa_{ост.}



(1) – гепарин, (2) – [гепарин | AT], (3) – тромбин_{ост.}



Факторы, определяющие правильность результатов испытания:

1) Температура реакционной смеси.

Термостатируют при 37°C: пробирки/планшет до внесения в них образцов и реагентов, реагенты (антитромбин, фактор Ха/ тромбин, субстраты).

Если антитромбин или фактор Ха/тромбин при внесении имеют комнатную температуру, целесообразно увеличить время инкубации после внесения реагента.

2) Время инкубации на каждом этапе.

Отсчёт времени инкубации проводят с момента внесения реагента в реакционную смесь.

3) Перемешивание.

Перемешивание проводят сразу после внесения реагента, а не через неопределенный промежуток времени после раскапывания серии пробирок/всего планшета.

Исключение: допускается раскапывать гепарин и антитромбин во все лунки планшета, и только после этого проводить перемешивание.



Расчет активности: модель параллельных линий

- Используют специализированное программное обеспечение (необходимо указать в НД).

Пример расчетов в программе Combistats, версия 7.0

Combistats Version 7.0. Tuesday, 26 April 2022, 13:58:34 [+03:00]. Page 1 of 1

Substance	Remarks: anti-Xa, 4 min
Method	
Assay number	
Technician	
Date of assay	



Standard				
Id.	6th International Standard Unfractionated Heparin			
Ass. pot.	2145 IU/ vial			
Pre-dil. 1	1 vial / 1 ml			
Pre-dil. 2	0.094 ml / 4 ml			
Pre-dil. 3	0.200 ml / 20 ml			
Pre-dil. 4	0.162 ml / 1.5 ml			
Doses	S1	S2	S3	S4
(1)	0.57010	0.81160	1.07695	1.31310
(2)	0.53442	0.83399	1.08265	1.34460
(3)	0.55054	0.79784	1.04625	1.30110
(4)	0.54006	0.83680	1.07520	1.32130

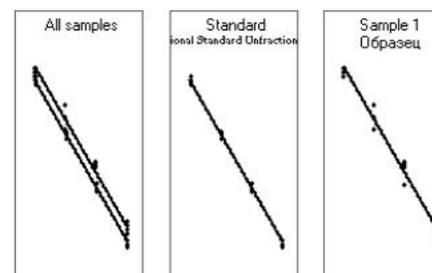
Sample 1				
Id.	Образец			
Ass. pot.	5000 IU/ml			
Pre-dil. 1	0.500 ml / 50 ml			
Pre-dil. 2	0.200 ml / 20 ml			
Pre-dil. 3	0.162 ml / 1.5 ml			
Pre-dil. 4				
Doses	T1	T2	T3	T4
(1)	0.61719	0.83065	1.09565	1.37870
(2)	0.63758	0.93882	1.20780	1.34370
(3)	0.60188	0.91313	1.15190	1.36055
(4)	0.66019	0.92864	1.15310	1.36150

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.0409323	0.0409323	49.887	0.000 (***)
Regression	1	2.50896	2.50896	>1000	0.000 (***)
Non-parallelism	1	0.00141443	0.00141443	1.724	0.202
Non-linearity	4	0.00477241	0.00119310	1.454	0.247
Standard	2	0.000548015	0.000274007	0.334	0.719
Sample 1	2	0.00422439	0.00211220	2.574	0.097
Treatments	7	2.55608	0.365154	445.036	0.000 (***)
Residual error	24	0.0196921	0.000820504		
Total	31	2.57577	0.0830893		

Sample 1			
Id.	Образец		
(IU/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	4338.16	4489.54	4644.70
Rel. to Ass.	86.8%	89.8%	92.9%
Rel. to Est.	96.6%	100.0%	103.5%

Model: Parallel lines
Design: Completely randomised
Transformation: $y' = y$
Variance: Observed residuals
Dilution step (Decreasing): 1.5

Common slope(factor) = -0.617680 (-0.636790 to -0.598569)
Correlation |r|: 0.994964





Критерии приемлемости результатов испытания:

- **«Линейная регрессия» (Regression) значима, если рассчитанное значение вероятности (Probability) менее 0,05.**
- **«Непараллельность» (Non-parallelism) незначима, если рассчитанная вероятность (Probability) составляет 0,05 более.**
- **«Нелинейность» (Non-linearity) незначима, если рассчитанная вероятность (Probability) составляет 0,05 более.**

ИЛИ

Критерии приемлемости результатов испытания:

- **Для источника вариации «Линейная регрессия» найденное значение F-критерия должно быть больше, чем критическое значение F-критерия при уровне значимости 0,05;**
- **Для источника вариации «Непараллельность» найденное значение F-критерия должно быть меньше, чем критическое значение F-критерия при уровне значимости 0,05.**
- **Для источника вариации «Нелинейность» найденное значение F-критерия должно быть меньше, чем критическое значение F-критерия при уровне значимости 0,05.**



Расчет активности: модель параллельных линий

- Используют математический аппарат для модели параллельных линий (формулы расчёта необходимо привести в НД).

Рассчитывают средние значения оптической плотности (A) (в случае кинетического метода средние значения скорости изменения оптической плотность в минуту) для каждого разведения стандартного образца и испытуемого образца, их сумму и линейный контраст по формулам, приведенным в табл. 1.

Таблица 1.

Параметр (величина)	Растворы стандартного образца	Растворы испытуемого образца
Среднее значение A растворов с минимальной концентрацией S4 и T4	A_{S4}	A_{T4}
Среднее значение A растворов с концентрацией S3 и T3	A_{S3}	A_{T3}
Среднее значение A растворов с концентрацией S2 и T2	A_{S2}	A_{T2}
Среднее значение A растворов с максимальной концентрацией S1 и T1	A_{S1}	A_{T1}
Сумма оптических плотностей	$P_S = A_{S4} + A_{S3} + A_{S2} + A_{S1}$	$P_T = A_{T4} + A_{T3} + A_{T2} + A_{T1}$
Линейный контраст	$L_S = 1 \times A_{S4} + 2 \times A_{S3} + 3 \times A_{S2} + 4 \times A_{S1} - \frac{1}{2}(d+1) \times P_S$	$L_T = 1 \times A_{T4} + 2 \times A_{T3} + 3 \times A_{T2} + 4 \times A_{T1} - \frac{1}{2}(d+1) \times P_T$

d – количество концентраций (разведений) в каждой серии стандартного (испытуемого) образца. $d = 4$ и для стандартного, и для испытуемого образцов.

Рассчитывают дополнительные параметры для дисперсионного анализа:

$$H_p = \frac{n}{d} = 1$$

$$H_L = \frac{12 \times n}{d^2 - d} = 0,8$$

$$K = \frac{n \times (P_S + P_T)^2}{h \times d}$$

n – количество повторений испытаний для каждой концентрации (количество серий), $n = 4$;

h – количество образцов, используемых при количественном определении, $h = 2$ (один стандартный образец и один испытуемый образец).

Рассчитывают сумму квадратов и число степеней свободы по формулам, приведенным в табл. 2.

Таблица 2.

Источник вариации	Степень свободы f	Сумма квадратов
Образцы	$h - 1 = 1$	$SS_{prep} = H_p \times (P_S^2 + P_T^2) - K$
Линейная регрессия	1	$SS_{reg} = \frac{1}{h} \times H_L \times (L_S + L_T)^2$
Непараллельность	$h - 1 = 1$	$SS_{par} = H_L \times (L_S^2 + L_T^2) - SS_{reg}$
Нелинейность	$h \times (d - 2) = 4$	$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par}$
Группы (разведения)	$h \times d - 1 = 7$	$SS_{treat} = n \times (A_{S1}^2 + A_{S2}^2 + A_{S3}^2 + A_{S4}^2 + A_{T1}^2 + A_{T2}^2 + A_{T3}^2 + A_{T4}^2) - K$
Остаточная вариация	$h \times d \times (n - 1) = 24$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
Общая вариация	$n \times h \times d - 1 = 31$	$SS_{tot} = \sum (A - \bar{A})^2$

A – единичное значение оптической плотности, измеренное при количественном определении;

\bar{A} – среднее значение оптической плотности, рассчитанное для всех измерений при количественном определении.

Находят значения дисперсии и F-критерия в соответствии с формулами, приведенными в табл. 3.

Таблица 3.

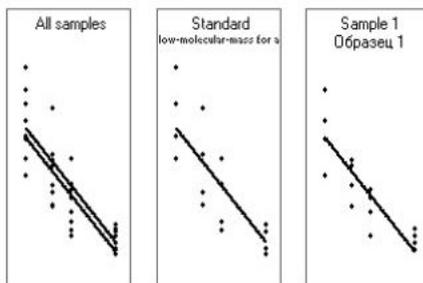
Источник вариации	Дисперсия	F-критерий	Критическое значение F ($p = 0,05; f_1, f_2$)
Линейная регрессия	$\frac{SS_{reg}}{f} = SS_{reg}$	$F_{reg} = \frac{SS_{reg}}{s^2}$	4,26 ($f_1 = 1, f_2 = 24$)
Непараллельность	$\frac{SS_{par}}{f} = SS_{par}$	$F_{par} = \frac{SS_{par}}{s^2}$	4,26 ($f_1 = 1, f_2 = 24$)
Нелинейность	$\frac{SS_{lin}}{f} = \frac{SS_{lin}}{4}$	$F_{lin} = \frac{SS_{lin}}{4 \times s^2}$	2,78 ($f_1 = 4, f_2 = 24$)
Остаточная вариация	$s^2 = \frac{SS_{res}}{f} = \frac{SS_{res}}{24}$	-	-



Пример 1: Евр.Ф. (0828)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.00209304	0.00209304	0.847	0.366
Regression	1	0.155360	0.155360	62.891	0.000 (***)
Non-parallelism	1	0.000766861	0.000766861	0.310	0.583
Non-linearity	4	0.00799663	0.00199916	0.809	0.532
Standard	2	0.00340730	0.00170365	0.690	0.511
Sample 1	2	0.00458933	0.00229467	0.929	0.409
Treatments	7	0.166217	0.0237452	9.612	0.000 (***)
Residual error	24	0.0592874	0.00247031		
Total	31	0.225504	0.00727432		

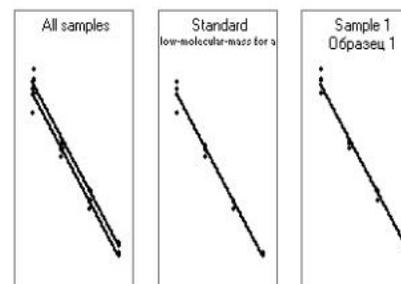
Sample 1			
Id.	Образец 1		
(IU/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	8187.71	10683.4	14179.5
Rel. to Ass.	86.2%	112.5%	149.3%
Rel. to Est.	76.6%	100.0%	132.7%



Пример 2: Евр.Ф. (0828)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	0.00652653	0.00652653	16.803	0.000 (***)
Regression	1	0.981412	0.981412	>1000	0.000 (***)
Non-parallelism	1	7.98062E-05	7.98062E-05	0.205	0.654
Non-linearity	4	0.00208163	0.000520406	1.340	0.284
Standard	2	0.000138175	6.90875E-05	0.178	0.838
Sample 1	2	0.00194345	0.000971725	2.502	0.103
Treatments	7	0.990100	0.141443	364.162	0.000 (***)
Residual error	24	0.00932175	0.000388406		
Total	31	0.999422	0.0322394		

Sample 1			
Id.	Образец 1		
(IU/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	8726.07	8961.19	9201.02
Rel. to Ass.	91.9%	94.3%	96.9%
Rel. to Est.	97.4%	100.0%	102.7%



В том случае, если на стадии валидации установлено, что верхняя и нижняя границы доверительного интервала выходят за пределы спецификации ЛС, необходимо провести расследование причин и устранить их.



PerLek – EAES

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения