

УДК: 616.633.963.42-07-08

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА ЭКУЛИЗУМАБ (СОЛИРИС)

*Е.Ю. Прудникова, Г.Н. Порошин, Н.К. Кудина, И.В. Лягоскин, Е.В. Сазонова,
А.Ю. Вишнеvский, С.Г. Аббасова*

Международный биотехнологический центр «Генериум»

Адрес: МБЦ «Генериум», 601125, Россия, Владимирская область, п. Вольгинский

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR DETERMINATION OF ANTIHEMOLYTIC ACTIVITY OF ECULIZUMAB (SOLIRIS)

*E. Yu. Prudnikova, G.N. Poroshin, N.K. Kudina, I.V. Lyagoskin, E.V. Sazonova,
A. Yu. Vishnevskiy, S.G. Abbasova*

International Biotechnology Center «Generium»,

601125, Russia, Vladimir region, Volginskiy

prudnikova@ibcgenerium.ru

Биоаналитические методы применяются как на стадии разработки и испытания препаратов, так и при серийном выпуске фармацевтической продукции. Оценка качества лекарственных препаратов (ЛП) и субстанций производится с помощью точных и воспроизводимых методов. Точность и воспроизводимость метода проверяются при проведении валидационных работ, которые являются обязательными при регистрации ЛП. Основной задачей валидации метода является экспериментальное доказательство его пригодности для целей, которые должны быть достигнуты. Валидация биоаналитических методик – это один из элементов валидации всего процесса производства лекарств [1, 2]. **Цель исследования:** валидация разработанного в ООО «МБЦ «Генериум» метода оценки специфической антигемолитической активности препарата экулизумаб. **Материалы и методы:** препарат экулизумаб, сенсibilизированные анти-телами куриные эритроциты, комплекс-содержащая сыворотка человека. **Результаты:** при валидации метода

Bioanalytical methods are applied at the development and test of drugs as well as at the step of pharmaceutical products issue. Drugs and excipients quality estimation is made by means of precise and reproducible methods. Accuracy and reproducibility of a method is established during validation which is obligatory for medicine registration. The principal task of method validation is experimental evidence of its suitability for the objectives to be achieved. Validation of bioanalytical methods is one of the elements of the whole medicine production validation [1, 2]. **The aim of research:** to validate a method for determination of specific anti-hemolytic activity of eculizumab developed in LCC "IBC Generium". **Materials and methods:** eculizumab, antibody-sensitized chicken erythrocytes, complement-containing human serum. **Re-**

показаны его специфичность и соответствие критериям — правильность определения относительной специфической активности ($103.0 \pm 1.4\%$), устойчивость ($CV - 11.5\%$), сходимость ($CV - (4.9 \pm 0.9)\%$), воспроизводимость ($CV - (3.5 \pm 0.4)\%$) и линейность ($k - 1.0275$; $R^2 - 0.9975$). При валидации в целом подтверждена пригодность системы (оборудование, материалы, аналитические операции и анализируемые образцы) для получения достоверного результата. **Обсуждение результатов.** При валидации метода получено экспериментальное доказательство его пригодности для достижения поставленной цели — оценки специфической активности препарата экулизумаб. Простота исполнения метода позволит получать точные результаты при его применении в других лабораториях. Разработанный метод может быть использован не только для определения специфической активности ЛС Солирис, но и других фармацевтических субстанций и лекарственных средств (ЛС) на основе антител аффинных к C5 компонента комплемента человека.

Ключевые слова: экулизумаб, антигемолитическая активность, валидация, специфичность, правильность, линейность, прецизионность, воспроизводимость

Введение. Эффективность и безопасность лекарственных средств (ЛС) гарантируется их соответствием национальным и международным стандартам качества. Соответствие качества ЛС регламентируемым требованиям устанавливается различными методами. Вывод о качестве ЛС в значительной степени зависит от качества самого метода, поэтому необходимо оценивать пригодность аналитических методов с помощью процедуры квалификации или полной валидации [1, 3].

Главной задачей валидации любой методики является экспериментальное

sults. We demonstrated the specificity of the method and its correspondence to criteria of accuracy ($103.0 \pm 1.4\%$), robustness ($CV - 11.5\%$), repeatability ($CV - (4.9 \pm 0.9)\%$), reproducibility ($CV - (3.5 \pm 0.4)\%$), and linearity ($k - 1.0275$; $R^2 - 0.9975$) during validation. The system validity (equipment, materials, analytical operations and analyzed samples) was confirmed for true results obtaining during validation. **Results discussion.** Experimental evidence of suitability of the method for eculizumab specific activity assessment was obtained in course of validation. The simplicity of the method allows obtaining accurate results in other laboratories. The developed method can be used not only for specific activity of Soliris determination but also for other pharmaceutical substances and drugs based on antibodies specific to human complement C5.

Keywords: eculizumab, anti-hemolytic activity, validation, specificity, accuracy, linearity, precision, reproducibility

Introduction. Efficiency and safety of drugs are guaranteed by their correspondence to national and international quality standards. Correspondence of drugs quality to the restricted requirements is established by different methods. The conclusion about medicine quality depends from the method quality at a significant rate; therefore it is necessary to assess suitability of analytical methods using qualification procedure or full validation [1, 3].

The main task of method validation is experimental confirmation of its appli-

доказательство пригодности ее применения для достижения заявленной цели.

Целью исследования была разработка и валидация метода оценки специфической активности ЛС экулизумаб (Солирис). Солирис применяется для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). ПНГ – это очень редкое заболевание крови, обусловленное экспансией одного или нескольких клонов гемопоэтических стволовых кроветворных клеток с соматической мутацией PIG-A гена [4, 5]. В 58% случаев причиной смерти пациентов с ПНГ являются тромбозы, хроническая болезнь почек, геморрагические осложнения на фоне тромбоцитопении [5, 6].

Солирис – гуманизированное моноклональное антитело против C5 компонента комплемента человека, его связывание с мишенью ингибирует расщепление компонента C5 на C5a и C5b и блокирует образование терминального комплекса комплемента C5b-9. Таким образом, экулизумаб восстанавливает регуляцию активности комплемента в крови и предотвращает внутрисосудистый гемолиз у больных ПНГ [4, 5, 7, 8, 9].

Для оценки специфической активности ЛС Солирис был разработан метод с использованием сенсibilизированных антителами куриных эритроцитов (СЭ) и комплемент-содержащей сыворотки человека (ЧС).

В результате проведенной валидации были получены экспериментальные данные, подтверждающие соответствие разработанной методики критериям приемлемости для количественных биоаналитических методов – специфичность, правильность, прецизионность, линейность и устойчивость и показана ее пригодность для оценки специфической активности разных серий препарата Солирис.

Материалы и методы. Сенсibilизация куриных эритроцитов: гепа-

cation suitability to achieve a stated purpose.

The aim of the study was to establish and validate the method of a specific activity of eculizumab (Soliris) assessment. Soliris is applied for treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). PNH is extraordinarily rare blood disease conditioned by expansion of one or several clones of hematopoietic stem cells with somatic mutation of PIG-A gene [4, 5]. Thrombosis, chronic kidney disease, hemorrhagic complications against the thrombocytopenia are reasons of death of 58% PNH patients [5, 6].

Soliris is a humanized monoclonal antibody against the complement C5, its binding with a target inhibits C5 component splitting into C5a and C5b and blocks the formation of complement C5b-9 terminal complex. Thus, eculizumab restores regulation of complement activity in blood and prevents intravascular hemolysis of PNH patients [4, 5, 7, 8, 9].

A method using antibody-sensitized chicken erythrocytes (SE) and complement-containing human serum (HS) was developed for Soliris specific activity evaluation.

Experimental data confirming a consistency of developed method with eligibility criteria for quantitative bioanalytical methods such as specificity, accuracy, precision, linearity, and robustness were received as validation result, and its convenience for specific activity determination of different Soliris series was shown.

Materials and methods. *Sensibilization of chicken erythrocytes:* heparinized blood was washed by phosphate buffered saline, and 10% erythrocytes suspension was prepared in veronal buffer saline (VBS) (Lonza, Cat no. BW12624E). Then, an equal volume of antibody solution diluted in the ratio 1:50

ринизированную кровь отмывали фосфатно-солевым буферным раствором и готовили 10% суспензию эритроцитов в вероналовом буфере (ВБ) (Lonza, Cat. № BW12624E). После этого к эритроцитам добавляли равный объем раствора антител (разведенных в соотношении 1:50) (Rockland, Cat. № 203 – 4139) и инкубировали 1 час при 37°C при периодическом помешивании. Затем суспензию дважды отмывали ВБ. СЭ хранили при 4°C не более 2 недель.

Методика оценки специфической активности препаратов: в лунки 96-луночного круглодонного планшета вносили по 50 мкл ЛС Солирис (серия p0003703, Alexion Pharma International Sarl) в трипликатах в последовательных 2- и 3-кратных разведениях в ВБ от 2000, 1600 и 400 nM и по 50 мкл 5 или 10% нормальной комплемент-содержащей ЧС (Quidel Corporation, Lot# 016787) в ВБ. После 15-20 мин. инкубации вносили по 30 мкл 10% суспензии СЭ. Контроли: отрицательный – 100 мкл ВБ + 30 мкл СЭ; положительный – 50 мкл ВБ + 50 мкл 5 – 10% нормальной ЧС + 30 мкл СЭ.

После 40 мин. инкубации при 37°C эритроциты осаждали центрифугированием (1500 об/мин, 5 мин) и переносили по 100 мкл супернатанта в плоскодонный планшет. Оптическую плотность (OD) измеряли на спектрофотометре (Tecan Infinite M200) при длине волны 415 нм. Процент гемолиза рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = 100\% * (OD_{\text{образец}} - OD_{\text{отр. контр}}) / (OD_{\text{пол. контр.}} - OD_{\text{отр. контр}}).$$

$$\% \text{ of hemolysis} = 100\% * (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{negative control}}) / (OD_{\text{positive control}} - OD_{\text{negative control}}).$$

Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Excel и GraphPad Prism 6.0 с использованием 4-х параметрической логистической функции дозозависимого ингибирования, и функции “constrain – shared value” для значений верхней и нижней асимптот

(Rockland, Cat. No. 203 – 4139) was added to erythrocytes and incubated for 1 hour at 37 °C with periodic mixing. The suspension was washed by VBS twice. Erythrocytes suspension was kept at +4 °C no more than 2 weeks.

Method of a specific activity determination: Soliris (series p0003703, Alexion Pharma International Sarl) was applied to 96-well round-bottomed plate (50 µl per well) in triplicates in serial 2- and 3-fold dilutions in VBS starting from 2000, 1600, and 400 nM. Then, 5% or 10% normal complement-containing human serum (Quidel Corporation, Lot# 016787) in VBS was added to each well (50 µl per well). After 15-20 minutes of incubation 10% erythrocytes suspension was added (30 µl per well). The negative control was VBS (100 µl) with added 30 µl erythrocytes suspension. The positive control was VBS (50 µl) with added 50 µl of 5 – 10% of normal human serum and 30 µl of erythrocytes suspension.

After 40 minutes incubation at 37 °C the erythrocytes were spinned down at 1500 rounds per minute during 5 min. Then, the supernatant from each well was transferred in new flat bottom plate (100 µl per well) for measuring of optical density (OD). OD was measured on spectrophotometer (Tecan Infinite M200) at wave length of 415 nm. The level of hemolysis was calculated with the formula:

Data procession was done with Excel and GraphPad Prism 6.0 using 4 parametric logistic function “dose-response – inhibition” and “constrain – shared value” for values of upper and lower asymptotes and a

и угла наклона сигмоидной кривой (hill slope). Определяли дозу полумаксимального ингибирования (IC_{50}) и коэффициент достоверности аппроксимации функции (R^2).

Результаты валидации. На первом этапе определяли оптимальный диапазон тестируемых концентраций ЛС Солирис и комплемент-содержащей ЧС.

Показали, что оптимальная концентрация нормальной ЧС составляет 2.5%, а оптимальный диапазон концентраций – от 800 до 0.4 нМ с двукратным шагом разведения (рис. 1 А).

slope of sigmoid curve (hill slope). The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and coefficient of determination (R^2) were defined.

Validation results. An optimal range of Soliris test concentrations and complement-containing human serum were determined in the first series of experiments.

It was shown that optimal concentration of a normal human serum is 2.5%, and optimal concentration range is 800 – 0.4 нМ with dilution factor of 2 (figure 1A).

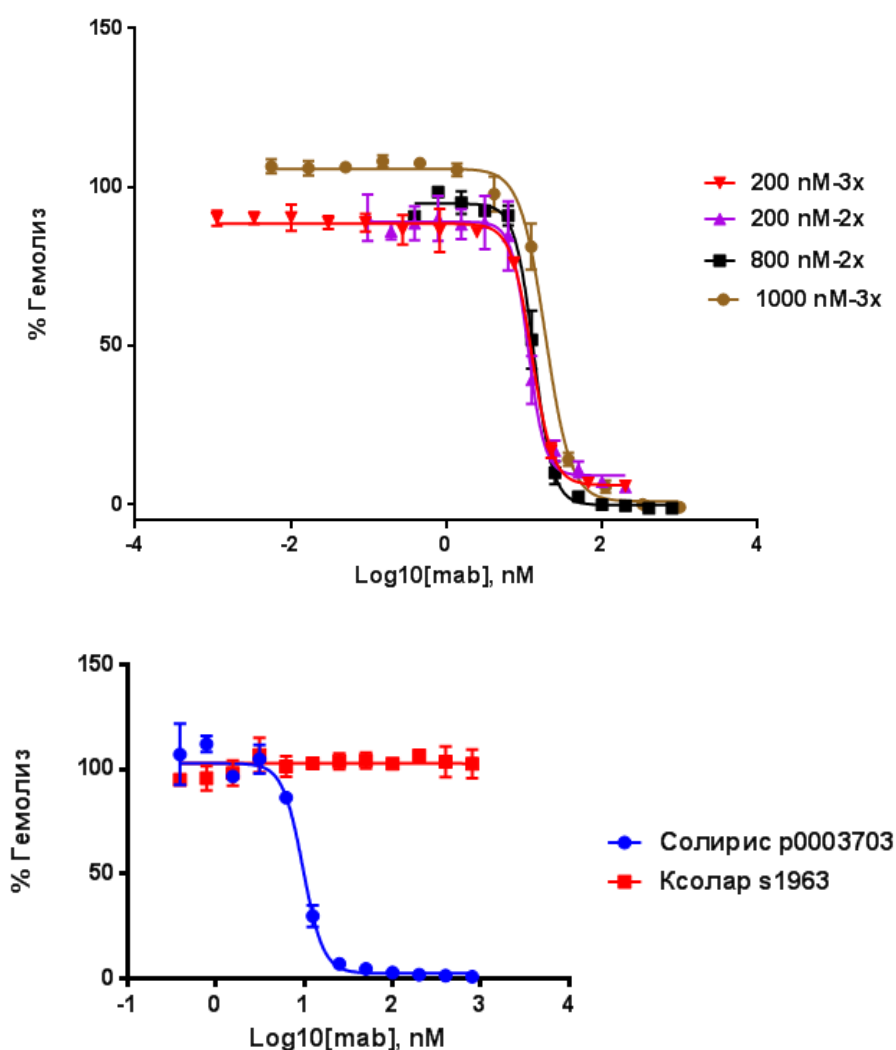


Рисунок 1. А – Определение оптимального диапазона титрования препарата Солирис (серия p0003703). В – Комплемент-зависимый гемолиз СЭ в присутствии препаратов Солирис и Ксолар. Последовательные разведения препаратов от 800 нМ с фактором разведения 2.

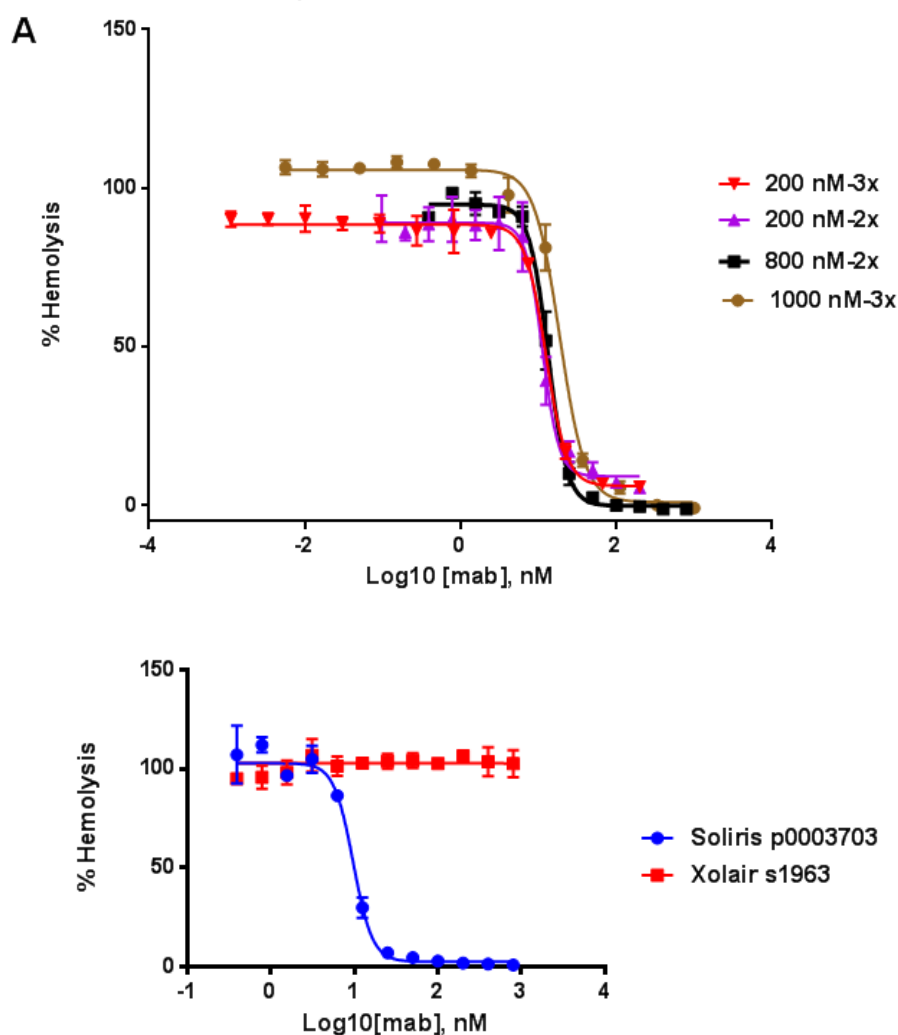


Figure 1. A – Determination of Soliris optimal concentration range (series p0003703). B – Complement-dependent hemolysis of sensitized chicken red blood cells in presence of Soliris and Xolair. Serial dilutions are from 800 nM with dilution factor of 2.

На втором этапе определяли специфичность, правильность, прецизионность, линейность и устойчивость (робастность) разработанного метода:

Специфичность. Специфичность метода проверяли, используя в тесте Mab Xolair, не способное связывать C5-компонент комплемента человека. При добавлении ЛС Ксолар, в отличие от ЛС Солирис, ингибирования гемолиза не наблюдали даже при высоких концентрациях Ксолара (рис. 1 B).

Правильность. Для оценки правильности метода измеряли IC_{50} в образцах с симулированной активностью – 60.0%,

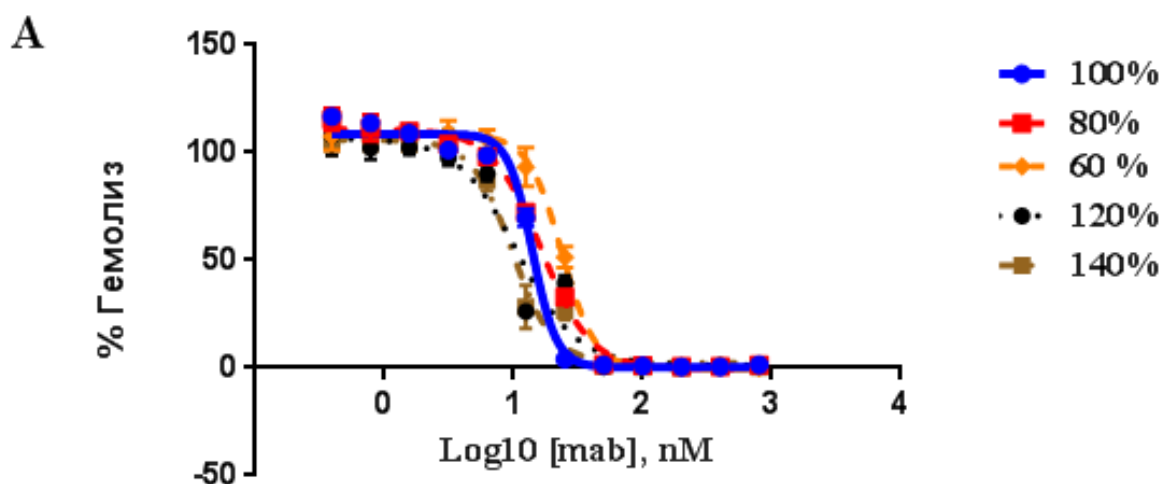
A specificity, accuracy, precision, linearity, and robustness of the developed method were defined on the second series of experiments.

Specificity. Specificity of the method was verified using another Mab Xolair that cannot bind human C5 complement. No hemolysis inhibition was detected even at high Xolair concentrations in contrast to Soliris, where significant hemolysis level was detected at low eculizumab concentrations (figure 1B).

Accuracy. IC_{50} in samples with simulat-

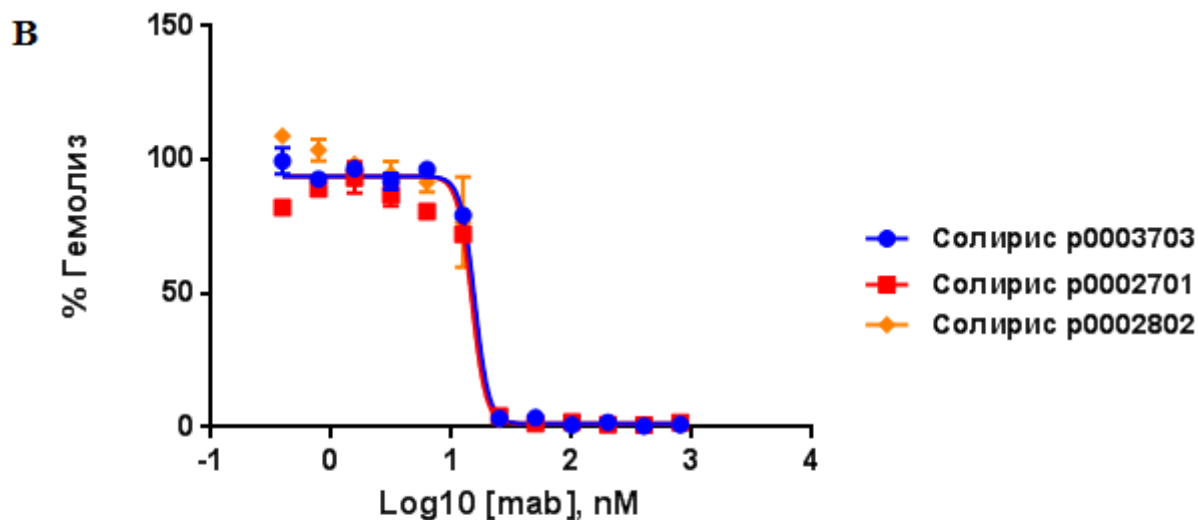
80.0%, 100.0%, 120.0% и 140.0%, в трех независимых опытах для каждого тестируемого диапазона (рис. 2 А).

ed activity (60.0%, 80.0%, 100.0%, 120.0%, and 140.0%) was measured for assessment of the method accuracy (Figure 2A).



	100%	80%	60 %	120%	140%
IC50	13.99	16.41	23.65	10.64	9.770

	100%	80%	60 %	120%	140%
R square	0.9922	0.9945	0.9937	0.9557	0.9778



	Солирис p0003703	Солирис p0002701	Солирис p0002802
IC50	15.65	14.66	15.24

	Солирис p0003703	Солирис p0002701	Солирис p0002802
R square	0.9966	0.9797	0.9789

Рисунок 2. Оценка правильности метода: А – определение специфической активности препарата в образцах с симулированной активностью – 60.0%, 80.0%, 100.0%, 120.0% и 140.0%. В – Определение антигемолитической активности препарата экулизумаб разных серий.

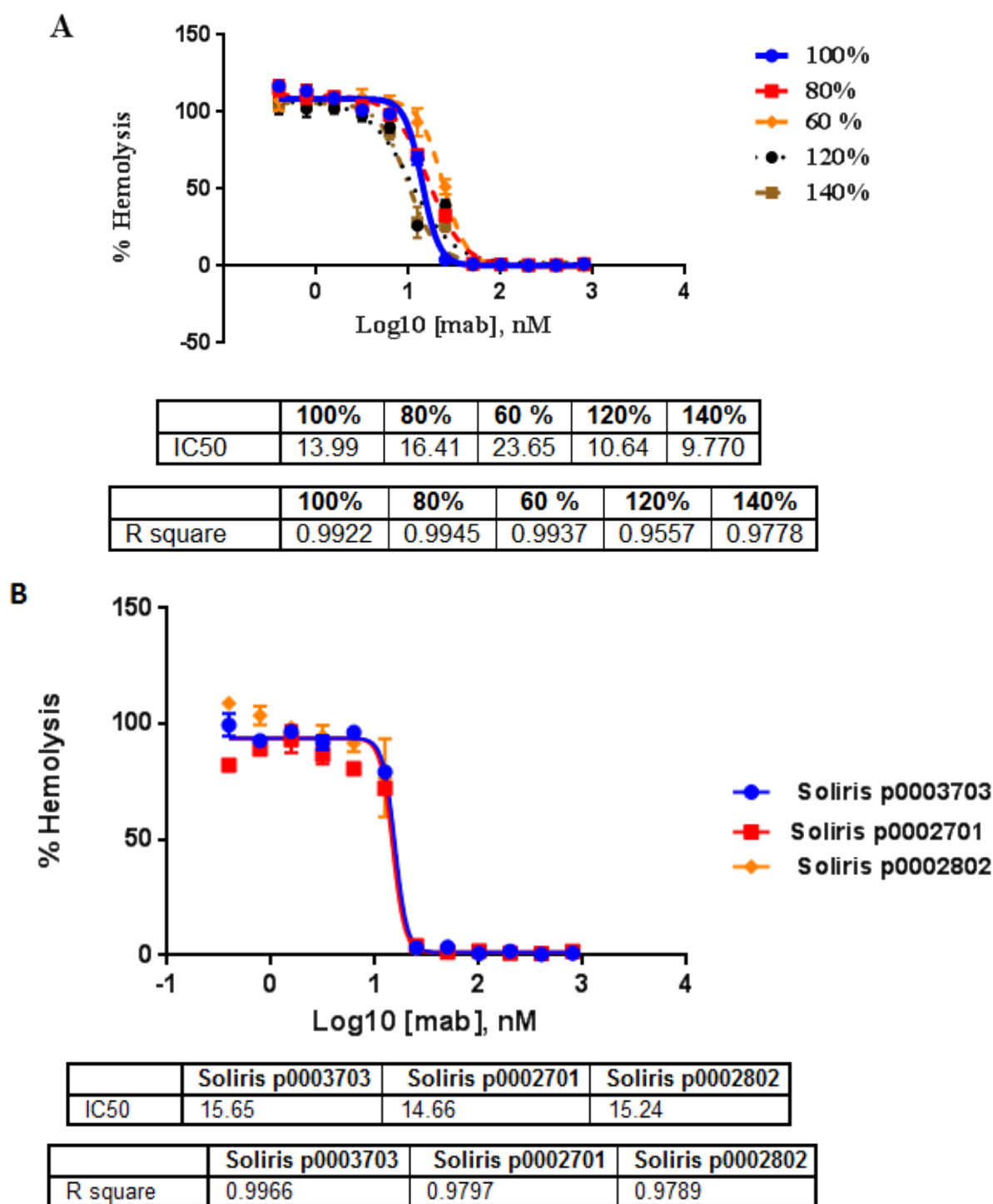


Figure 2. Evaluation of method accuracy: A – The determination of specific activity in samples with simulated activity (60.0%, 80.0%, 100.0%, 120.0%, and 140.0%). B – The determination of the anti-hemolytic activity of different eculizumab series.

Правильность разработанного метода (accuracy) оценивали по формуле:

Accuracy of developed method was calculated by use of the formula:

$$A_{\text{измер.}}(\text{ТП}) = \text{IC}_{50}(\text{СП}) / \text{IC}_{50}(\text{ТП}) * 100\%,$$

$$A_{\text{measured}}(\text{TP}) = \text{IC}_{50}(\text{SP}) / \text{IC}_{50}(\text{TP}) * 100\%,$$

где $A_{\text{измер.}}(\text{ТП})$ – измеренная относительная специфическая активность тестируемого препарата (ТП) относительно стандартного препарата (СП), выраженная в процентах. Полноту выявления активности в тестируемой пробе (Recovery) вычисляли по формуле:

$$R = 100\% \cdot A_{\text{измер.}}(\text{ТП}) / A_{\text{теор.}}(\text{ТП}),$$

$$R = 100\% \cdot A_{\text{measured}}(\text{TP}) / A_{\text{theoretical}}(\text{TP})$$

где $A_{\text{теор.}}$ – активность приготовленного образца [2].

Критерий приемлемости для показателя R для тестируемых образцов, приготовленных независимо в 100%-ном диапазоне титрования – 85.0% – 115.0%, а для смещенных диапазонов титрования препарата – 80.0 – 120.0% от измеренной активности стандартного препарата [10].

Все эксперименты по оценке правильности метода выполняли 2 исследователя независимо в разные экспериментальные дни. Показали, что среднее значение R у исследователя 1 составило 102.0%, а у исследователя 2 – 104.0%, среднее значение R для метода составило $103.0 \pm 1.4\%$, что соответствует критерию, данные представлены в таблице 1.

Прецизионность. Прецизионность метода оценивали по двум параметрам – сходимость и воспроизводимость. Сходимость определяли как CV ($CV = SD / \text{mean} \cdot 100\%$) значений IC_{50} , вычисленного из шести независимых модельных экспериментов, выполненных в течение одного дня одним исследователем. Воспроизводимость оценивали, как CV значений IC_{50} , вычисленного из трех независимых модельных экспериментов, выполненных в течение трех дней разными исследователями. CV должно быть $\leq 20.0\%$ [10, 11].

CV сходимости метода у исследователя 1 составило 5.6%, а у исследователя 2 – 4.3%. Среднее значение CV сходимости

where $A_{\text{measured}}(\text{TP})$ is measured relative specific activity of tested medicine (TP) comparatively to standard probe (SP) expressed in percent. Fullness of activity revelation in tested probe (Recovery) was calculated by use of the formula:

where $A_{\text{theoretical}}$ is the activity of prepared sample [2].

Acceptance criteria R for test samples prepared independently in 100% range of titration is 85.0% to 115.0%, and it is 80.0 – 120.0% of the measured activity for staggered medicine titration ranges [10].

All assessment experiments of method accuracy were performed by two analysts independently in different experimental days. It was shown that the average value R was 102.0% for the 1st analyst, and it was 104.0% for the 2nd analyst, whereas the average value R for the method amounted to $103.0 \pm 1.4\%$ which corresponds to the criterion; the data are represented in the table 1.

Precision. Method precision was assessed with two parameters: the repeatability and the reproducibility. The repeatability was determined as CV ($CV = SD / \text{mean} \cdot 100\%$) of IC_{50} values calculated in six independent model experiments performed in one day by one analyst. The reproducibility was estimated as CV of IC_{50} values calculated in three independent model experiments which were performed in three days by different researches. CV must be less than or equal to 20.0% [10, 11].

CV of method repeatability was 5.6% for the 1st analyst, and it was 4.3% for the 2nd analyst. The average value of repeatability

сти – $4.9 \pm 0.9\%$. CV воспроизводимости у исследователя 1 – 3.7%, а у исследователя 2 – 3.2%. Среднее значение CV воспроизводимости составило $3.5 \pm 0.4\%$. Эти показатели соответствуют критериям приемлемости для биоаналитических методов (табл. 1).

CV was $4.9 \pm 0.9\%$. CV of the reproducibility was 3.7% for the 1st analyst, and it was 3.2% for the 2nd analyst. The average value of reproducibility CV was $3.5 \pm 0.4\%$. These indices correspond to suitability criteria for bioanalytical methods (table 1).

Таблица 1 – Экспериментальные и расчетные показатели валидации метода

Table 1 – Experimental and calculated data of method validation

Исследователь 1 / The 1 st analyst						
День / Day	Теоретическое (ожидаемое) значение ак- тивности,% / Expected poten- cy, (%)	Измеренное значение ак- тивности,% / Measured po- tency,%	Среднее значение активности,% / Mean of mea- sured potency,%	Стандартное отклонение, SD (%) / Standard deviation SD (%)	Процент вы- явления,% / Recovery,%	Коэффициент вариации, (CV),% Coefficient of variation,%
1	60.0	58.0	59.0	4.2	99.0	7.0
2		64.0				
3		56.0				
1	80.0	83.0	84.0	1.0	104.0	1.2
2		84.0				
3		85.0				
1	100.0	97.0	103.0	5.8	103.0	5.6
2		101.0				
3		96.0				
4		109.0				
5		107.0				
6		108.0				
1	120.0	124.0	122.0	2.0	101.0	1.6
2		122.0				
3		120.0				
1	140.0	142.0	143.0	4.6	102.0	3.0
2		139.0				
3		148.0				
Исследователь 2 / The 2 nd analyst						
1	60.0	59.0	59.0	3.5	98.0	5.9
2		63.0				
3		56.0				
1	80.0	81.0	82.0	1.0	102.0	1.2
2		83.0				
3		82.0				
1	100.0	99.0	101.0	4.4	101.0	4.3
2		101.0				
3		96.0				
4		106.0				
5		107.0				
6		98.0				
1	120.0	121.0	119.0	2.0	99.0	1.7
2		119.0				
3		117.0				
1	140.0	144.0	143.0	4.0	102.0	2.8
2		139.0				
3		147.0				

Линейность. Линейность метода определяли из графика зависимости измеренной от ожидаемой величины активности препарата в смещенных диапазонах титрования (60.0%, 80.0%, 100.0%, 120.0%, 140.0%) с применением линейного тренда.

В уравнении линейной зависимости $y=kx+/-b$ значение k должно быть равно $1.0+/-0.2$, а R^2 – не менее 0.9 [11]. Получены следующие показатели: значение $R^2=0.9974$, уравнение кривой $y=1.03x-0.8$ (для исследователя 1), $R^2=0.9976$, уравнение кривой $y=1.025x-1.7$ (для исследователя 1). Средние показатели линейности метода $R^2=0.9975$, уравнение кривой $y=1.0275x-1.25$ (рис. 3).

Linearity. Method linearity was determined from a scatter plot of a measured and expected value of drug activity in staggered titration range (60.0%, 80.0%, 100.0%, 120.0%, 140.0%) using linear trend.

K value should be equal to $1.0+/-0.2$ and R^2 should be at least 0.9 in linear dependence equation $y=kx+/-b$ [11]. The following coefficients were obtained: $R^2=0.9974$, curve equation $y=1.03x-0.8$ (for the 1st analyst), $R^2=0.9976$, curve equation $y=1.025x-1.7$ (for the 2nd analyst). The average values of method linearity were $R^2=0.9975$, curve equation $y=1.0275x-1.25$ (figure 3).

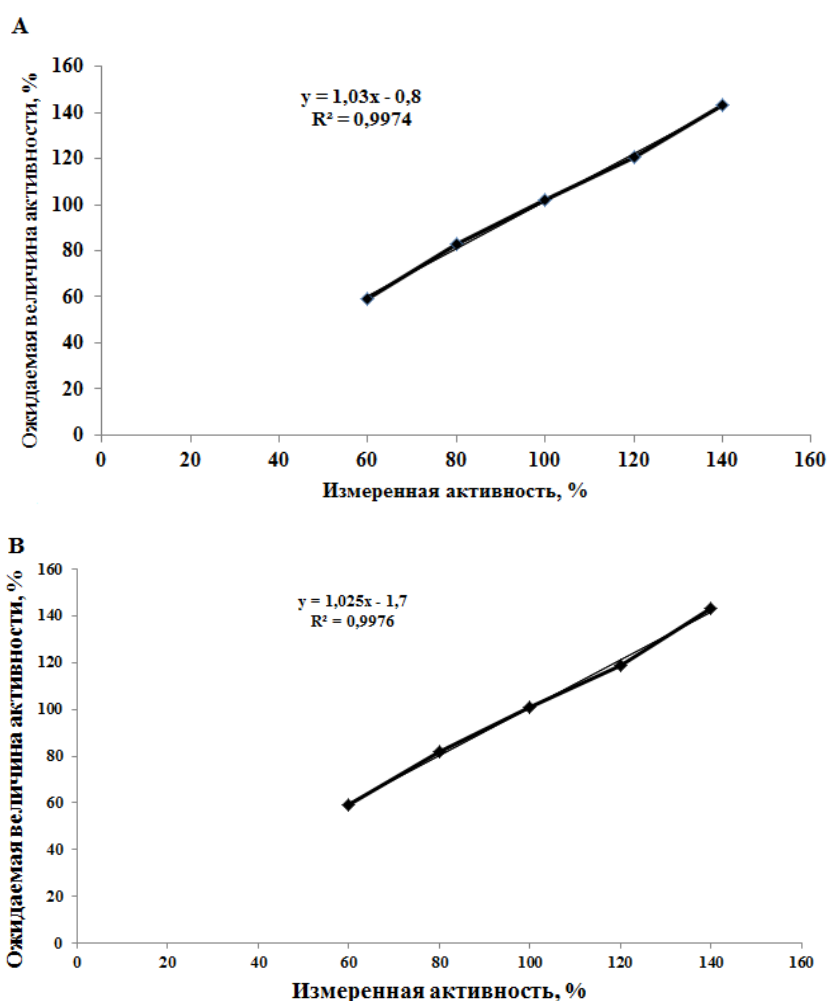


Рисунок 3. – Линейность разработанного метода определения специфической активности ЛС Солирис: А – график линейности значений, полученных исследователем 1; В – график линейности значений, полученных исследователем 2.

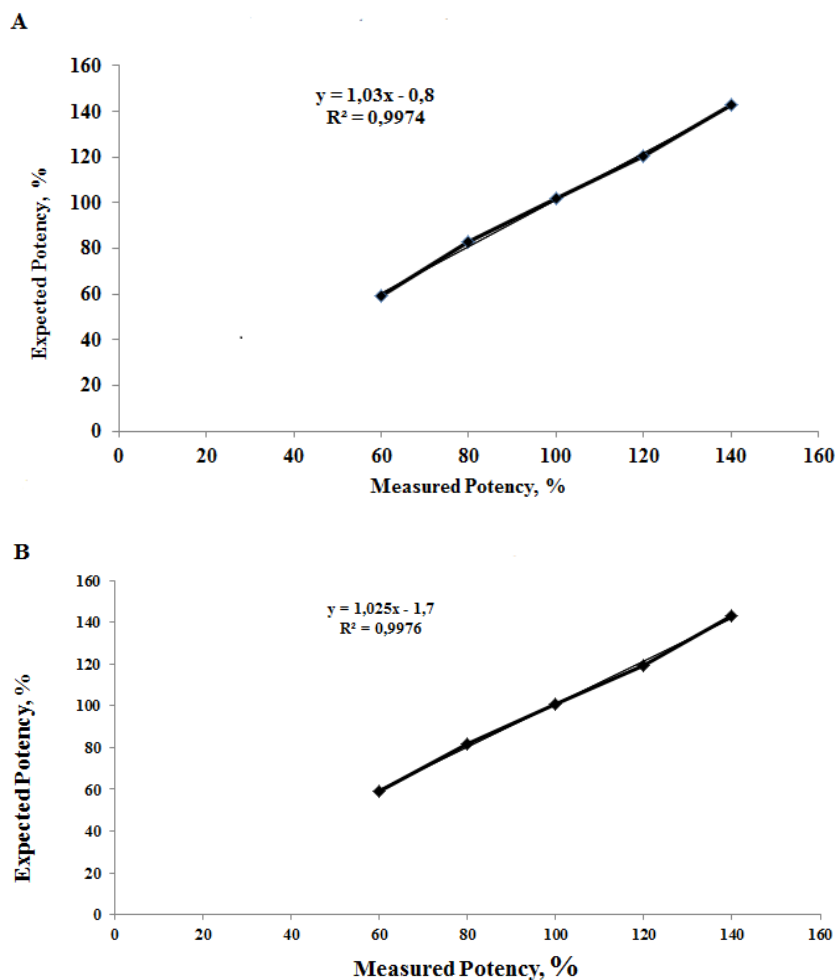


Figure 3. – The linearity of the developed method of Soliris specific activity determination: A – the graph of linearity values obtained by the 1st analyst; B – the graph of linearity values obtained by the 2nd analyst.

Устойчивость метода (Робастность).

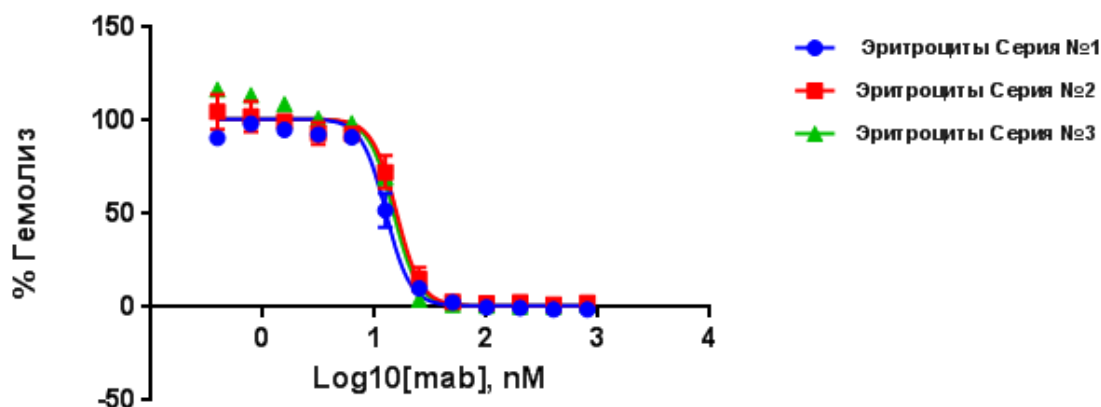
Устойчивость метода оценивали по вариабельности значений IC_{50} для одной серии препарата, по показателю CV, используя 3 серии сенсibilизированных эритроцитов, полученных в разные экспериментальные дни от разных животных. Для клеточных методов показатель CV не должен превышать 25.0% [12]. В экспериментах CV для разных партий эритроцитов составило не более 11.5% (рис. 4).

Валидационные характеристики разработанного метода представлены в таблице 2.

Robustness of the method.

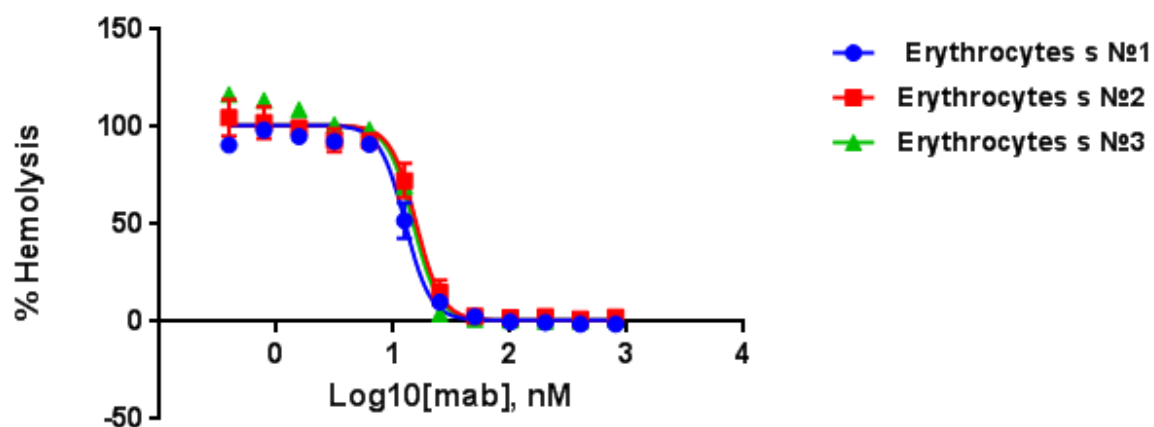
The robustness of the method was estimated according to variability of IC_{50} values for one drug series. CV index obtained using 3 series of the sensibilized erythrocytes received in various experimental days from different animals. CV index should not exceed 25% for cell methods [12]. CV should not exceed 11.5% for different erythrocytes series (figure 4).

Validational characteristics of the developed method are shown in the table 2.



	Эритроциты Серия №1	Эритроциты Серия №2	Эритроциты Серия №3
IC50	12.60	15.70	14.74

	Эритроциты Серия №1	Эритроциты Серия №2	Эритроциты Серия №3
R square	0.9858	0.9870	0.9817



	Erythrocytes s №1	Erythrocytes s №2	Erythrocytes s №3
IC50	12.60	15.70	14.74

	Erythrocytes s №1	Erythrocytes s №2	Erythrocytes s №3
R square	0.9858	0.9870	0.9817

Рисунок 4 – Специфическая активность препарата Солирис, измеренная на разных сериях сенсibilизированных куриных эритроцитов, полученных в разные дни от разных животных
Figure 4 – Soliris specific activity measured using 3 series of sensitized chicken red blood cells received in various experimental days from different animals

Разработанный метод применяли для сравнительной оценки специфической активности трех серий препарата Солирис (p0003703, p0002801, p0002701). Специфическую активность препаратов вычисляли по формуле: $A = IC_{50}(ST) / IC_{50}(T) * 100\%$, где $IC_{50}(ST)$ – IC_{50} серии препарата, принятой за стандарт; $IC_{50}(T)$ – IC_{50} серии анализируемого препарата. Значения специфической активности (A) для трех серий варьировали от 95.0 до 104.0% (рис. 2 В, табл. 3).

The developed method was applied for comparative assessment of three series of Soliris specific activity (p0003703, p0002801, p0002701). The specific drugs activity was calculated by use of the formula: $A = IC_{50}(ST) / IC_{50}(T) * 100\%$. $IC_{50}(ST)$ – IC_{50} of the drug series taken for a standard; $IC_{50}(T)$ – IC_{50} of the analyzed drug series. Values of specific activity (A) of three series varied from 95.0 to 104.0% (figure 2 B, table 3).

Таблица 2 – Обобщенные результаты валидации метода

Table 2 – Generalized results of the method validation

Наименование характеристики / Characteristics		Значения / Values
Специфичность / Specificity		+
Правильность, % / Accuracy, %		103.0±1.4
Робастность CV, % / Robustness CV, %		11.5
Прецизионность / Precision	Сходимость CV, % / Repeatability CV, %	4.9±0.9
	Воспроизводимость CV, % / Reproducibility CV, %	3.5±0.4
Линейность / Linearity	Коэффициент достоверности аппроксимации R^2 / Coefficient of determination	0.9975
	Уравнение кривой / Equation of the curve	$y=1.0275x-1.25$

Таблица 3 – Значения специфической активности ЛС Солирис разных серий

Table 3 – The Specific activity of different Soliris series

	Солирис / Soliris p0003703 (100%)	Солирис / Soliris p0002701 (100%)	Солирис / Soliris p0002802 (100%)
Солирис / Soliris p0003703	100.0	104.0	98.0
Солирис / Soliris p0002701	97.0	100.0	95.0
Солирис / Soliris p0002802	102.0	105.0	100.0
Mean±SD	99.5±3.54	104.5±0.71	96.5±2.12
Mean±SD (Aggregate)	100.2±4.04		

Заключение. Результаты валидационных испытаний метода оценки специфической активности ЛС Солирис удовлетворяют критериям приемлемости для количественных биоаналитических методов по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность и устойчивость (робастность).

Conclusion. The results of method validation of Soliris specific activity assessment comply with suitability criteria for quantitative bioanalytical methods for indices of specificity, linearity, accuracy, precision, and robustness.

Подтверждена пригодность системы. Все оборудование, выполняемые аналитические операции и анализируемые образцы составляют единую целостную систему, позволяющую получить удовлетворительный результат при оценке специфической активности ЛП Солирис (экулизумаб) концентрат для приготовления раствора для инфузий 10.0 мг/мл.

Разработанный метод может использоваться для контроля фармацевтической субстанции и/или ЛП на основе антител аффинных к C5 компонента комплемента человека, таких как ЛС Солирис.

The system suitability has been proven. All equipment, analytical operations and analyzed samples represent a uniform system which allows obtaining a satisfactory result in assessment of specific activity of Soliris (eculizumab) concentrate for preparation of 10.0 mg/ml solution for infusion.

The developed method can be used for the control of a substance and/or preparation on antibody basis specific to C5 human complement such as Soliris.

Библиографический список

1. ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств».
2. Findlay J.W.A., Smith W.C., Lee J.W., Nordblom G.D., Das I., DeSilva B.S., Khan M.N., Bowsher R.R. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000, N. 21, pp. 1249-1273.
3. Assay Validation Methods – Definitions and Terms. Available from: <http://www.fws.gov/aah/PDF/QI-Terms%20and%20Defs.pdf>
4. Hill A., Rother R. P., Arnold L., Kelly R., Cullen M.J., Richards S.J., Hillmen P. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica* April. 2010, N. 95, pp. 567-573.
5. Johnson R., Hillmen P. Johnson, R. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's gene therapy? *J Clin Pathol*. 2002, N. 55(3), pp.145–52.
6. Parker C.I., Omine M., Richards S., Nishimura J., Bessler M., Ware R., Hillmen P., Luzzatto L., Young N., Kinoshita T., Rosse W., Socié G.

References

1. GOST R 52249-2009. Good manufacturing practice for medicinal products (GMP).2010 (In Russian)
2. Findlay J.W.A., Smith W.C., Lee J.W., Nordblom G.D., Das I., DeSilva B.S., Khan M.N., Bowsher R.R. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000, N. 21, pp. 1249-1273.
3. Assay Validation Methods - Definitions and Terms. Available from: <http://www.fws.gov/aah/PDF/QI-Terms%20and%20Defs.pdf>
4. Hill A., Rother R. P., Arnold L., Kelly R., Cullen M.J., Richards S.J., Hillmen P. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica* April. 2010, N. 95, pp. 567-573.
5. Johnson R., Hillmen P. Johnson, R. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's gene therapy? *J Clin Pathol*. 2002, N. 55(3), pp. 145–52.
6. Parker C.I., Omine M., Richards S., Nishimura J., Bessler M., Ware R., Hillmen P., Luzzatto L., Young N., Kinoshita T., Rosse W., Socié G. International

- International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005, N. 106 (12), pp. 3699-709.
7. Hillmen P., Hall C., Marsh J., Elebute M., Bombara M.P., Petro B.E., Cullen M.J., Richards S.J., Rollins S.A., Mojcić C.F., Rother R.P. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004, N. 350 (6). pp. 552–9.
 8. Rother R.P., Rollins S.A., Mojcić C.F., Brodsky R.A., Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotech*. 2007, N. 25 (11), pp. 1256–64.
 9. Scientific discussion. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000791/WC500054212.pdf
 10. Guideline on bioanalytical method validation: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
 11. A Step-by-Step Approach to Establishing a Method Validation Program: <http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/A%20Step%20by%20Step%20Approach%20to%20Establishing%20a%20Method%20Validation%20Program.pdf>
 12. Hohensteina A., Hebella M., Zikryb H. Development and validation of a novel cell-based assay for potency determination of human parathyroid hormone (PTH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, N. 98, pp. 345-350.
- PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005, N. 106 (12), pp. 3699-709.
 7. Hillmen P., Hall C., Marsh J., Elebute M., Bombara M.P., Petro B.E., Cullen M.J., Richards S.J., Rollins S.A., Mojcić C.F., Rother R.P. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004, N. 350 (6). pp. 552–9.
 8. Rother R.P., Rollins S.A., Mojcić C.F., Brodsky R.A., Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotech*. 2007, N. 25 (11), pp. 1256–64.
 9. Scientific discussion. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000791/WC500054212.pdf
 10. Guideline on bioanalytical method validation: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
 11. A Step-by-Step Approach to Establishing a Method Validation Program: <http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/A%20Step%20by%20Step%20Approach%20to%20Establishing%20a%20Method%20Validation%20Program.pdf>
 12. Hohensteina A., Hebella M., Zikryb H. Development and validation of a novel cell-based assay for potency determination of human parathyroid hormone (PTH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, N. 98, pp. 345-350.

* * *

* * *

Елена Юрьевна Прудникова – кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник лаборатории биологических методов МБЦ «Генериум». Область научных интересов: биотехнология, вирусология, разработка и валидация биологических методов анализа лекарственных средств, многоцветная проточная цитометрия. orcid.org/0000-0002-7983-5312 E-mail: prudnikova@ibcgenerium.ru

Григорий Николаевич Порошин – научный сотрудник лаборатории биологических методов МБЦ «Генериум». Область научных интересов: биотехнология, иммунология, онкология, разработка и валидация биологических методов анализа лекарственных средств. E-mail: poroshin@ibcgenerium.ru.

Наталья Константиновна Кудина – химик лаборатории биологических методов МБЦ «Генериум». Область научных интересов: биотехнология, микробиология, разработка и валидация биологических методов анализа лекарственных средств. E-mail: kudina@ibcgenerium.ru.

Иван Владимирович Лягоскин – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биологических методов МБЦ «Генериум». Область научных интересов: биотехнология, микробиология, разработка и валидация биологических методов анализа лекарственных средств. E-mail: lyagoskin@ibcgenerium.ru.

Елена Викторовна Сазонова – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории биологических методов МБЦ «Генериум». Область научных интересов: патофизиология, иммунология, онкология, многоцветная проточная цитометрия. E-mail: sazonova@ibcgenerium.ru.

Александр Юрьевич Вишнеvский – кандидат биологических наук, начальник отдела аналитических методов МБЦ

Elena Yurievna Prudnikova – Ph.D. in Veterinary Science, Scientist, Laboratory of Biological Methods, IBC Generium. Research area: biotechnology, virology, development and validation of biological methods for medicine analysis, multicolor flow cytometry. E-mail: prudnikova@ibcgenerium.ru.

Grigoriy Nikolaevich Poroshin – Scientist, Laboratory of Biological Methods, IBC Generium. Research area: biotechnology, immunology, oncology, development and validation of biological methods for medicine analysis. E-mail: poroshin@ibcgenerium.ru.

Natalya Konstantinovna Kudina – Chemist, Laboratory of Biological Methods, IBC Generium. Research area: biotechnology, microbiology, development and validation of biological methods for medicine analysis. E-mail: kudina@ibcgenerium.ru.

Ivan Vladimorovich Lyagoskin – Ph.D. in Biology, Scientist, Laboratory of Biological Methods, IBC Generium. Research area: biotechnology, microbiology, development and validation of biological methods for medicine analysis. E-mail: lyagoskin@ibcgenerium.ru.

Elena Viktorovna Sazonova – Ph.D. in Medicine, Scientist, Laboratory of Biological Methods, IBC Generium. Research area: pathophysiology, immunology, oncology, multicolor flow cytometry. E-mail: sazonova@ibcgenerium.ru.

Aleksandr Yuryevich Vishnevskiy – Ph.D. in Biology, Head of Analytical Methods Department, IBC Generium. Research area:

«Генериум». Область научных интересов: биотехнология, разработка лекарственных препаратов, масс-спектрометрия, хроматография, иммунохимия. E-mail: vishnevskiy@ibcgenerium.ru.

Светлана Георгиевна Аббасова – доктор биологических наук, начальник лаборатории биологических методов МБЦ «Генериум». Область научных интересов: иммунология, онкология, биотехнология, разработка лекарственных препаратов. E-mail: abbasova@ibcgenerium.ru.

biotechnology, development of medicine, mass spectrometry, chromatography, immunochemistry. E-mail: vishnevskiy@ibcgenerium.ru.

Svetlana Georgievna Abbasova – D.Sc. in Biology, Head of Biological Methods Laboratory, IBC Generium. Research area: immunology, oncology, biotechnology, development of medicine. E-mail: abbasova@ibcgenerium.ru.

Поступила в редакцию 12.09.2016

Принята к печати 13.11.2016

Received 12.09.2016

Accepted for publication 13.11.2016