

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИ-D ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы количественного определения анти-D иммуноглобулина человека в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

### МЕТОД 1

Активность анти-D иммуноглобулина человека определяют путем сравнения количества испытуемого образца, необходимого для агглютинации D-положительных эритроцитов, с необходимым для получения такого же эффекта количеством стандартного образца, активность которого выражена в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца анти-D иммуноглобулина человека, устанавливаемого Всемирной организацией здравоохранения.

Используют пулы D-положительных эритроцитов, собранные не ранее чем за 7 дней до испытания, хранившиеся соответствующим образом и полученные не менее чем от четырех доноров с группой крови  $0R_1R_1$ . К подходящему объему клеток, предварительно трижды промытых раствором 9 г/л *натрия хлорида P*, прибавляют равный объем раствора *бромелайнов P*, выдерживают при температуре 37 °C в течение 10 мин, центрифугируют, отделяют надосадочную жидкость и промывают трижды раствором 9 г/л *натрия хлорида P*. Суспендируют 20 объемов эритроцитов в смеси из 15 объемов инертной сыворотки, 20 объемов раствора 300 г/л *альбумина бычьего P* и 45 объемов раствора 9 г/л *натрия хлорида P*. Полученную суспензию охлаждают на ледяной бане при постоянном перемешивании.

Готовят подходящие разведения испытуемого образца и стандартного образца (например, *СО ФЕАЭС анти-D иммуноглобулина человека*), используя в качестве разбавителя раствор, содержащий 5 г/л *альбумина бычьего P* и 9 г/л *натрия хлорида P*.

Определение обычно проводят по изложенной ниже методике, используя соответствующий прибор для непрерывного автоматического анализа.

### МЕТОДИКА

Температуру в трубках, за исключением инкубационных петель, поддерживают на уровне 15,0 °C. В трубки аппарата, используя насос, вводят суспензию эритроцитов со скоростью 0,1 мл/мин и раствор 3 г/л *метилцеллюлозы 450 P* со скоростью 0,05 мл/мин. В течение 2 мин со

скоростью 0,1 мл/мин вводят растворы испытуемого и стандартного образцов в соответствующих разведениях. Перед введением каждого следующего раствора в течение 4 мин вводят разбавитель со скоростью 0,1 мл/мин.

Вводят воздух со скоростью 0,6 мл/мин. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 18 мин, после чего разбивают скопления эритроцитов путем введения со скоростью 1,6 мл/мин раствора 9 г/л натрия хлорида *P*, содержащего для предотвращения разрушения агрегированных эритроцитов подходящий смачивающий агент (например, *полисорбат 20 P* до получения концентрации 0,2 г/л). После оседания агглютинатов образовавшуюся суспензию дважды декантируют: вначале – со скоростью 0,4 мл/мин, затем – со скоростью 0,6 мл/мин. Не подвергшиеся агглютинации эритроциты лизируют раствором, содержащим 5 г/л октоксинола *10 P*, 0,2 г/л калия феррицианида *P*, 1 г/л натрия гидрокарбоната *P* и 0,05 г/л калия цианида *P*, подаваемым со скоростью 2,5 мл/мин. Для получения десятиминутной задержки, необходимой для конверсии гемоглобина, используют петлю. Оптическую плотность (2.1.2.24) гемолизата регистрируют непрерывно при длине волны от 540 нм до 550 нм. Определяют диапазон концентраций антител, в котором наблюдается линейная зависимость между концентрацией и полученным изменением оптической плотности ( $\Delta A$ ). Исходя из полученных результатов, строят калибровочную кривую, участок линейности используют для определения активности испытуемого образца.

Активность испытуемого образца рассчитывают с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

## МЕТОД 2

Активность анти-D иммуноглобулина человека определяют методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа, проводимого на титрационных микропланшетах, покрытых эритроцитами. Метод основан на конкурентном связывании между поликлональным анти-D иммуноглобулином и биотинилированными моноклональными анти-D антителами, специфичными в отношении эпитопа D антигена. Активность испытуемого образца сравнивают со стандартным образцом, активность которого выражена в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца анти-D иммуноглобулина человека, устанавливаемого Всемирной организацией здравоохранения.

## РЕАКТИВЫ

Реактивы, при отсутствии особых указаний, должны быть аналитической степени чистоты.

*Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ).* Растворяют в воде  $P$  8,0 г натрия хлорида  $P$ , 0,76 г динатрия гидрофосфата безводного  $P$ , 0,2 г калия хлорида  $P$ , 0,2 г калия дигидрофосфата  $P$  и 0,2 г натрия азиды  $P$  и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем.

*Трис-солевой буферный раствор (ТСБ).* Растворяют в воде  $P$  8,0 г натрия хлорида  $P$  и 0,6 г трис(гидроксиметил)аминометана  $P$ , корректируют рН раствора  $1 M$  хлороводородной кислотой до 7,2 и доводят водой  $P$  до объема 1000 мл.

*Раствор папаина.* При температуре  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  перемешивают в течение 30 мин 1 г папаина  $P$  в 10 мл  $0,067 M$  фосфатного буферного раствора с рН 5,4  $P$ , центрифугируют при 10 000  $g$  в течение 5 мин и фильтруют полученный раствор через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Для активации смешивают 1 мл фильтрата, 1 мл раствора 48,44 г/л  $L$ -цистеина  $P$  и 1 мл раствора 3,72 г/л натрия эдетата  $P$  и доводят  $0,067 M$  фосфатным буферным раствором с рН 5,4  $P$  до объема 10 мл. Аликвоты замораживают при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  или ниже.

*Эритроциты.* Пул D-положительных эритроцитов получают не менее чем от трех доноров с группой крови  $0R_2R_2$ . Клетки четырежды промывают ФСБ. Центрифугируют при 1800  $g$  в течение 5 мин, надосадочную жидкость сливают, подходящий объем осадка эритроцитов нагревают и смешивают с подходящим объемом предварительно нагретого раствора папаина (например, в объемном соотношении 2:1) и инкубируют при температуре  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Клетки четырежды промывают ФСБ. Хранят при температуре  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  с подходящим стабилизатором не более недели.

*Биотинилированный Brad-5.* Используют в соответствии с рекомендациями производителя.

*Реактив авидина или стрептавидина, конъюгированный со щелочной фосфатазой.* Предпочтительно использовать модифицированный реактив, сочетающий высокую специфическую активность с низким уровнем неспецифического связывания. Используют в соответствии с рекомендациями производителя.

*Раствор субстрата.* Используют пара-нитрофенилфосфат в соответствии с рекомендациями производителя.

*Буферный раствор для фиксации клеток.* Растворяют в воде  $P$  18,02 г глюкозы  $P$ , 4,09 г натрия хлорида  $P$ , 1,24 г борной кислоты  $P$ , 10,29 г натрия цитрата  $P$  и 0,74 г натрия эдетата  $P$ . Доводят рН раствора до 7,2 – 7,3, используя  $1 M$  раствор натрия гидроксида или

*1 M хлороводородную кислоту*, и разводят полученный раствор *водой Р* до объема 1000 мл. Хранят при температуре 4 °С и используют холодным.

*Раствор глутарового альдегида.* Непосредственно перед применением 750 мкл раствора 250 г/л *глутарового альдегида Р* прибавляют к 50 мл холодного ФСБ.

*Титрационные микропланшеты.* Плоскодонные планшеты из полистирола со свойствами поверхности, оптимизированными для иммуноферментного анализа, с высокой емкостью связывания с белками используют для покрытия эритроцитами. Планшеты из полистирола или поливинилхлорида с *U-* или *V-*образными формами лунок используют для приготовления разведений растворов иммуноглобулина.

### МЕТОДИКА

Готовят 0,1 % (*об/об*) суспензию обработанных папаином эритроцитов в холодном буферном растворе для фиксации клеток. В каждую лунку плоскодонного титрационного микропланшета помещают по 50 мкл суспензии.

Планшет центрифугируют при 350 *g* в течение 3 мин предпочтительно при температуре 4 °С. Не удаляя надосадочную жидкость, к содержимому каждой из лунок осторожно прибавляют по 100 мкл раствора глутарового альдегида и выдерживают 10 мин. Содержимое лунок сливают путем быстрого переворачивания планшета и трижды промывают каждую лунку (250 – 300) мкл ФСБ. Эту процедуру производят вручную или с использованием автоматического устройства для промывания планшетов. Затем планшет используют как указано в нижеописанном испытании или хранят при температуре 4 °С не более 1 месяца после сливания ФСБ и прибавления в каждую лунку по 100 мкл буферного раствора для фиксации клеток и запечатывания полимерной пленкой.

*Испытуемые растворы.* В случае лиофильно высушенных лекарственных препаратов их восстанавливают в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят 5 последовательных двукратных разведений, начиная с концентрации 30 МЕ/мл, с использованием ФСБ, содержащего 10 г/л *альбумина бычьего Р* в четырех повторностях. При необходимости, исходное разведение корректируют с целью получения эффектов, попадающих в область линейности графика зависимости доза-эффект.

*Растворы сравнения.* Восстанавливают стандартный образец (например, *СО ФЕАЭС анти-D иммуноглобулина человека*) в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят 5 последовательных

двукратных разведений, начиная с концентрации 30 МЕ/мл, с использованием ФСБ, содержащего 10 г/л *альбумина бычьего Р*, в четырех повторностях.

В каждую серию лунок титрационного микропланшета с *U*- или *V*-образными формами лунок вносят по 35 мкл соответствующего разведения испытуемого раствора или раствора сравнения. К содержимому каждой лунки прибавляют по 35 мкл биотинилированного *Brad-5* с содержанием 250 нг/мл.

Освобождают лунки планшета, покрытого эритроцитами, путем переворачивания и высушивания бумажным полотенцем. Прибавляют в каждую лунку по 250 мкл ФСБ, содержащего 20 г/л *альбумина бычьего Р* и выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С в течение 30 мин.

Освобождают лунки планшета, покрытого эритроцитами, путем переворачивания и высушивания бумажным полотенцем, и помещают в каждую серию лунок по 50 мкл соответствующего разведения испытуемого раствора или раствора сравнения, содержащих биотинилированный *Brad-5*.

50 мкл ФСБ, содержащего 10 г/л *альбумина бычьего Р*, используют в качестве отрицательного контроля. Планшет запечатывают полимерной пленкой и инкубируют при температуре от 15 °С до 25 °С в течение 1 ч.

Удаляют жидкость из лунок планшета, покрытого эритроцитами, и трижды промывают каждую лунку (250 – 300) мкл ТСБ.

В каждую лунку прибавляют по 50 мкл реактива авидина или стрептавидина, конъюгированного со щелочной фосфатазой, разбавленного ТСБ, содержащим 10 г/л *альбумина бычьего Р*. Инкубируют в течение 30 мин при температуре от 15 °С до 25 °С.

Удаляют жидкость из лунок планшета, покрытого эритроцитами, и трижды промывают каждую лунку (250 – 300) мкл ТСБ.

В каждую лунку прибавляют по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют в темноте при температуре от 15 °С до 25 °С в течение 10 мин. Для остановки реакции в каждую лунку прибавляют по 50 мкл *3 М раствора натрия гидроксида*. Измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм. Для построения кривой вычитают значение, полученное для отрицательного контроля. Значения оптической плотности в области линейности кривой используют для оценки активности испытуемого образца с использованием общепринятых статистических методов (2.3.12.0).

### МЕТОД 3

Активность анти-*D* иммуноглобулина человека определяют методом проточной цитометрии. Метод основан на специфическом

связывании между анти-D иммуноглобулином и D-положительными эритроцитами. Активность испытуемого образца сравнивают со стандартным образцом, активность которого выражена в международных единицах.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца анти-D иммуноглобулина человека, устанавливаемого Всемирной организацией здравоохранения.

### *РЕАКТИВЫ*

Реактивы, при отсутствии особых указаний, должны быть аналитической степени чистоты.

*ФСБ.* Растворяют в воде *R* 8,0 г натрия хлорида *R*, 0,76 г динатрия гидрофосфата безводного *R*, 0,2 г калия хлорида *R*, 0,2 г калия дигидрофосфата *R* и 0,2 г натрия азиды *R* и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем. Значение рН полученного раствора должно быть  $7,2 \pm 0,2$  (2.1.2.3).

*Раствор ФСБ-БСА (ФСБ-БСА).* ФСБ, содержащий 10,0 г/л альбумина бычьего *R*. Значение рН полученного раствора должно быть  $7,2 \pm 0,2$  (2.1.2.3).

*Эритроциты.* D-положительные эритроциты получают от донора с группой крови 0R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> не ранее, чем за 2 недели до определения. При необходимости хранят с соответствующим стабилизатором при температуре 4 °С. Клетки промывают не менее двух раз ФСБ-БСА и готовят суспензию, содержащую от  $1 \cdot 10^4$  до  $5 \cdot 10^4$  клеток в микролитре, с использованием ФСБ-БСА.

D-отрицательные эритроциты получают от донора с группой крови 0гг и подготавливают аналогичным образом.

*Вторичные антитела.* Подходящий фрагмент анти-IgG-антитела, связанный с флуоресцентным красителем, обладающий специфичностью в отношении человеческого IgG или его частей. Хранят и используют в соответствии с инструкциями производителя.

*Титрационные микропланшеты.* Плоскодонные планшеты для иммуноферментного анализа без поверхностной обработки.

### *МЕТОДИКА*

*Испытуемые растворы.* В случае лиофильно высушенных лекарственных препаратов их восстанавливают в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят не менее трех полутора- или двукратных разведений, начиная с концентрации в диапазоне (1,2 – 0,15) МЕ/мл, с использованием ФСБ-БСА не менее чем в трех повторностях. При необходимости исходное разведение корректируют с

целью получения эффектов, попадающих в область линейности графика зависимости доза-эффект.

*Растворы сравнения.* Восстанавливают стандартный образец (например, СО ФЕАЭС анти-D иммуноглобулина человека) в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят не менее трех полутора- или двукратных разведений, начиная с концентрации в диапазоне (1,2 – 0,15) МЕ/мл, с использованием ФСБ-БСА не менее чем в трех повторностях. При необходимости исходное разведение корректируют с целью получения эффектов, попадающих в область линейности графика зависимости доза-эффект.

В каждую лунку титрационного микропланшета вносят по 50 мкл D-положительных эритроцитов. К содержимому каждой серии лунок прибавляют по 50 мкл соответствующего разведения испытуемого образца или стандартного образца. В качестве отрицательного контроля в серию соответствующих лунок прибавляют по 50 мкл ФСБ-БСА. Для контроля неспецифического связывания вносят по 50 мкл D-отрицательных эритроцитов в свободные лунки того же микропланшета и к содержимому каждой серии лунок прибавляют по 50 мкл наименьших разведений испытуемого или стандартного образцов. В качестве отрицательного контроля в серию соответствующих лунок, содержащих 50 мкл D-отрицательных эритроцитов, вносят по 50 мкл ФСБ-БСА. Запечатывают пластиковой пленкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 40 мин.

Планшет центрифугируют при 50 g в течение 3 мин, удаляют надсадочную жидкость и промывают лунки (200 – 250) мкл ФСБ-БСА. Повторяют промывку не менее одного раза. Планшеты центрифугируют при 50 g в течение 3 мин, удаляют надсадочную жидкость и вносят по 50 мкл раствора вторичного антитела, полученного разведением с помощью ФСБ-БСА до подходящей концентрации (рабочий титр вторичных антител заранее устанавливают опытным путем). Запечатывают полимерной пленкой и инкубируют при температуре от 15 °С до 25 °С в защищенном от света месте в течение 20 мин.

По окончании инкубации с вторичными антителами планшет отмывают не менее двух раз путем центрифугирования при 50 g в течение 3 мин (200 – 250) мкл ФСБ. Удаляют надсадочную жидкость и ресуспендируют эритроциты в (200 – 250) мкл ФСБ.

Суспензию клеток переносят в пробирки, совместимые с имеющейся моделью проточного цитофлуориметра. При необходимости, для обеспечения подходящей скорости потока объем полученных образцов доводят ФСБ до оптимальных значений.

Накопление данных производят не позднее 20 мин от окончания пробоподготовки. Для статистического анализа накапливают не менее

10 000 событий без выхода за пределы установленного порогового значения какого-либо параметра с исключением нецелевых (дебрисных) включений (в том числе мертвых клеток). Учитывают медианную интенсивность флуоресценции и процент положительных клеток. Используя значение медианной интенсивности флуоресценции, в области линейности кривой зависимости доза-эффект оценивают активность испытуемого образца общепринятыми статистическими методами (2.3.12.0).