



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA (11) 97067 (13) C2  
(51) МПК  
G01N 33/68 (2006.01)

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ГЕПАРИНІВ ДЛЯ СУБСТАНЦІЙ І ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ ГЕПАРИНІВ

1

2

(21) a201101810

(22) 16.02.2011

(24) 26.12.2011

(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.

(72) РИБАЧУК ВАЛЕНТИНА МИКОЛАЇВНА, ЛЕВ-  
ЧУК ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА, РОКА-МОЙЯ ЯНА  
МАРІОВНА, РЯСНЕНКО ЛЮДМИЛА ПЕТРІВНА,  
ЮСОВА ОЛЕНА ІВАНІВНА, ГРИНЕНКО ТЕТЯНА  
ВІКТОРІВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НА-  
ЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) European Pharmacopoeia 6.0, 2.7.5. Heparins,  
low-molecular-mass. 01/2008:0828, P.2041-2043.  
(Зарк.)

European Pharmacopoeia 6.0, 2.7.5. Protamine  
sulfate. 01/2008:0569, P.2780-2781. (2 арк.)

US20090236238 A1, 24.09.2009.

US 6140062, 31.10.2000.

SU 1448890 A1, 21.10.86

US 4175182, 20.11.1979.

US 4250041, 10.02.1981.

Методы определения активности гепарина. Моск-  
ва, 2011. [знайдено 2011-10-25]. Знайдено в Інтер-  
нет:

<URL:http://www.renam.ru/dokumentaciya/metodiche  
skie-

posobiya/Metody%20opredeleniya%20aktivnosti%20  
%20geparina.pdf/at\_download/file

(57) 1. Спосіб визначення активності гепаринів для  
субстанцій і готових лікарських форм гепаринів,  
який **відрізняється** тим, що активність гепаринів  
визначають шляхом застосування каліброваного  
за стандартними розчинами гепаринів протаміну  
сульфату.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для  
нефракціонованого гепарину антикоагулянтну ак-  
тивність визначають шляхом титрування розчину  
нефракціонованого гепарину з невідомою активні-  
стю розчином протаміну сульфату, каліброваного  
за стандартним розчином зразку нефракціонова-  
ного гепарину, до точки еквівалентності на авто-  
матичному титраторі з фототродом при довжині  
хвилі 555 нм.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для  
низькомолекулярного гепарину анти-Ха-факторну  
активність визначають шляхом титрування розчи-  
ну низькомолекулярного гепарину з невідомою  
активністю розчином протаміну сульфату, калібро-  
ваного за стандартним розчином зразка низько-  
молекулярного гепарину, до точки еквівалентності  
на автоматичному титраторі з фототродом при  
довжині хвилі 555 нм.

Винахід належить до біохімії та може бути ви-  
користаний у фармацевтичній промисловості для  
контролю якості субстанцій низькомолекулярних  
та/або нефракціонованих гепаринів і готових лі-  
карських форм (ГЛФ) на їх основі.

Гепарин, сульфатований глюкозаміноглікан,  
має унікальну поліфункціональність, яка не харак-  
терна жодній біологічній молекулі. Взаємодіючи з  
багатьма хімічними сполуками, гепарин може мо-  
дифікувати їх вплив на організм та, навіть, нада-  
вати їм нові властивості. Було показано модулюю-  
чий вплив гепарину на фермент-субстратну  
взаємодію, активність фактору росту, дію гормонів  
і т.д. [1].

Одна із головних властивостей гепарину, що  
забезпечує його широке застосування в клініці та  
експериментах *in vitro*, є його антикоагулянтна  
активність. Вона базується на здатності регулюва-

ти активність багатьох ферментів, при цьому ме-  
ханізм їх дії може бути різний. Гепарин здатний  
взаємодіяти з усіма сериновими протеїназами сис-  
теми зсідання крові з утворенням комплексів, в  
яких активність протеїназ блокується безпосеред-  
ньо або на такі протеїнази більш ефективно діє їх  
інгібітор - антитромбін III. Біологічна активність  
гепаринів залежить від довжини їх молекул: неф-  
ракціоновані гепарини (НГ), середня молекулярна  
маса яких складає 15 кДа, однаковою мірою галь-  
мують активність фактору IIa і фактору Ха; низь-  
комолекулярні гепарини (НМГ), молекулярна маса  
яких складає від 4,0 до 6,5 кДа, мають, практично,  
анти-Ха-факторна активність [2, 3]. Основною ха-  
рактеристикою НГ є їх антикоагулянтна активність,  
для НМГ - анти-Ха факторна активність.

Сьогодні в медичній практиці для дослідження  
системи гемостазу та при використанні гепарино-

(19) UA (11) 97067 (13) C2

терапії застосовують методи і тест-системи на їх основі, чутливі до гепарину [4-6]. Методи базуються на використанні хромогенних субстратів, факторів згортання крові, спеціальних речовин та методологічних підходів.

Для визначення антикоагулянтної активності НГ, найбільш близьким до винаходу, що заявляється, за технічною суттю і результатом, що досягається, є спосіб визначення антикоагулянтної активності гепарину за умов зсідання плазми крові в присутності іонів кальцію [7]. Основні стадії методу: забір крові (бичачої чи овечої), отримання плазми крові, стандартизація плазми крові за концентрацією іонів кальцію, що необхідно для отримання певного часу зсідання, підбір концентрації стандартного зразку гепарину, яка б інгібувала зсідання плазми в присутності іонів кальцію та проведення порівняльного аналізу гепарину з невідомою активністю в порівнянні зі стандартним зразком гепарину. Недоліком даного методу є його працемісткість, використання крові тварин, тривалий час виконання аналізу (4 год.) та візуальна фіксація результатів досліджень.

Для визначення анти-Ха-факторної активності НМГ в медичній практиці використовують оптичні, електрохімічні та коагулологічні методи [8-10], проте ці методи потребують використання багатокомпонентних систем та спеціального обладнання.

Для визначення анти-Ха-факторної активності НМГ найближчим рішенням за технічною суттю до способу, що заявляється, є спосіб визначення анти-Ха-факторної активності НМГ, який базується на використанні хромогенних субстратів [11]. Принцип методу: анти-Ха-факторну активність гепарину визначають шляхом додавання в інкубаційне середовище надлишку антитромбіну III і фактору Ха. При цьому відбувається інгібування фактору Ха комплексом [антитромбін III - гепарин] пропорційно до кількості гепарину у зразку. Кількість фактору Ха, яка залишилась, каталізує відщеплення р-нітроаніліну (pNA) від синтетичного хромогенного субстрату. Абсорбція вільного pNA, яка визначається при довжині хвилі 405 нм, обернено пропорційна активності гепарину у зразку. Недоліком способу є потреба в спеціальному обладнанні, дорогих реактивах та витратних матеріалах.

В основу винаходу, що заявляється, поставлена задача створення високочутливого, простого у виконанні автоматичного способу визначення антикоагулянтної активності НГ та анти-Ха-факторної активності НМГ з використанням однієї речовини як реагенту.

Поставлена задача вирішується шляхом використання низькомолекулярного білка - протаміну сульфату з молекулярною масою близько 4300 Да, який виділяють із сперми різних видів лососевих риб. Відомо, що протамін сульфат нейтралізує дію гепарину за рахунок утворення стабільних комплексів, через що зникає здатність гепарину гальмувати зсідання крові *in vivo*. Комплексоутворення обумовлено великою кількістю катіонних груп (аргініну) в протаміні сульфаті, які зв'язуються з аніонними центрами гепарину.

Спосіб, що заявляється, здійснюють наступним чином. Протамін сульфат, який містить не менше, ніж 70 % моль аргініну і має залишкову протеолітичну активність не більшу, ніж 0,01 абс. од., калібрують стандартними зразками НГ (heparin sodium BRP) і НМГ (heparin low-molecular-mass for assay BRP) [12]. Для цього розчини протаміну сульфату титрують розчинами стандартних зразків гепаринів (НГ і НМГ) на автоматичному титраторі за допомогою фототроду при довжині хвилі 555 нм до точки еквівалентності. Калібрований таким чином протамін сульфат використовують для титрування розчинів гепаринів із невідомою активністю для визначення анти-Ха-факторної активності НМГ і антикоагулянтної активності НГ.

Калібрування протаміну сульфату стандартними зразками НГ та НМГ проводять один раз і зберігають його при температурі -20 °С протягом 2-х років.

Вирішення поставленої задачі ілюструють приклади конкретного виконання.

#### Приклад 1

Калібрування протаміну сульфату стандартними зразками НГ і НМГ

По 50 мл розчинів протаміну сульфату в концентраціях 0,15; 0,10; 0,05 мг/мл відповідно титрують розчином стандартного зразку НГ (heparin sodium BRP) у концентрації 50 МО/мл. За об'ємом розчину стандартного зразку гепарину, що був використаний на титрування протаміну сульфату, визначають антикоагулянтну активність останнього та виражають її в гепаринових міжнародних одиницях активності (МО). Активність протаміну сульфату за стандартним зразком НГ складає 137 МО/мг.

По 50 мл розчинів протаміну сульфату в концентраціях 0,15; 0,10; 0,05 мг/мл відповідно титрують розчином стандартного зразку НМГ (heparin low-molecular-mass for assay BRP) з відомою анти-Ха-факторною активністю в концентрації 50 МО/мл. За об'ємом розчину стандартного зразку НМГ, що був використаний на титрування розчинів протаміну сульфату, визначають анти-Ха-факторну активність останнього, яку виражають в гепаринових міжнародних одиницях активності. Активність протаміну сульфату за стандартним зразком НМГ складає 74,44 МО/мл.

#### Приклад 2

Визначення активності субстанції та готової лікарської форми НГ

Наважку субстанції НГ для ін'єкцій масою 16,97 мг розчиняють в 100 мл води, відбирають 20 мл отриманого розчину та доводять водою до 200 мл; наважку каліброваного протаміну сульфату масою 18,96 мг розчиняють у 100 мл води. Розчин субстанції НГ з невідомою активністю об'ємом 50 мл титрують розчином протаміну сульфату. Об'єм розчину протаміну сульфату, що був використаний для трьох визначень антикоагулянтної активності нефракціонованого гепарину, становить  $5,875 \pm 0,017$  мл.

Активність субстанції НГ розраховують за формулою:

$$A_{C-HG} = \frac{M_{\Pi} \times A_{\Pi} \times V_{\Pi} \times 100 \times 200}{100 \times M_{\Gamma} \times 20 \times 50} = 179,8 \text{ МО/мг} \quad (1)$$

де:

$A_{C-HG}$  - активність субстанції НГ, МО/мг;

$M_{\Pi}$  - маса наважки каліброваного протаміну сульфату, мг;

$A_{\Pi}$  - активність каліброваного протаміну сульфату, МО/мг;

$V_{\Pi}$  - об'єм розчину каліброваного протаміну сульфату, який пішов на титрування 50 мл розчину субстанції НГ з невідомою активністю, мл;

$M_{\Gamma}$  - маса наважки субстанції НГ, мг.

1 мл готової лікарської форми (ГЛФ) НГ доводять водою до 100 мл. 10 мл отриманого розчину доводять водою до 200 мл. 50 мл цього розчину титрують розчином каліброваного протаміну сульфату (див. як для субстанції). Об'єм розчину каліброваного протаміну сульфату, що був використаний для трьох визначень активності становить  $5,141 \pm 0,028$  мл. Активність ГЛФ НГ, розраховують за формулою:

$$A_{\text{ГЛФ-НГ}} = \frac{M_{\Pi} \times A_{\Pi} \times V_{\Pi} \times 100 \times 200}{100 \times V_{\Gamma} \times 10 \times 50} = 5341 \text{ МО/мл} \quad (2)$$

де:

$A_{\text{ГЛФ-НГ}}$  - активність ГЛФ НГ, МО/мл;

$M_{\Pi}$  - маса наважки каліброваного протаміну сульфату, мг;

$A_{\Pi}$  - активність каліброваного протаміну сульфату, МО/мг;

$V_{\Pi}$  - об'єм розчину каліброваного протаміну сульфату, який пішов на титрування 50 мл розчину ГЛФ НГ з невідомою активністю, мл;

$V_{\Gamma}$  - об'єм ГЛФ НГ, мл.

Для порівняння одержаних результатів з прототипом проводять визначення антикоагулянтної активності субстанції НГ та ГЛФ НГ за [7] з використанням крові тварин. Інгібування зсідання плазми крові проводять у діапазоні концентрацій від 0,25 до 3,0 МО/мл в дослідному та стандартному зразках НГ. Антикоагулянтна активність за [7] для субстанції НГ складає 182 МО/мл, для ГЛФ НГ - 5250 МО/мл.

Приклад 3

Визначення анти-Ха-факторної активності субстанції НМГ та ГЛФ НМГ.

13,9 мг субстанції НМГ розчиняють у 200 мл води, по 50 мл отриманого розчину титрують розчином каліброваного протаміну сульфату за стандартом НМГ (37,28 мг каліброваного протаміну сульфату розчиняють в 100 мл води) (див. приклад 1).

Об'єм розчину протаміну сульфату, що був використаний для трьох визначень анти-Ха-факторної активності субстанції НМГ, становить  $11,372 \pm 0,007$  мл. Активність субстанції складає 90,82 МО/мг.

0,5 мл ГЛФ НМГ доводять водою до 100 мл, 10 мл отриманого розчину доводять водою до 200 мл, по 50 мл одержаного розчину титрують розчином каліброваного протаміну сульфату (67,78 мг каліброваного протаміну сульфату розчиняють в 200 мл води). Анти-Ха-факторна активність ГЛФ НМГ складає 10000,3 МО/мл.

Для порівняння з найближчим аналогом анти-Ха-факторну активність субстанції НМГ та ГЛФ НМГ визначають за [11] з використанням хромогенного субстрату, N-а-бензилоксикарбоксил-D-аргініл-L-гліцил-L-аргінін-4-нітроанілід дигідрохлориду, антитромбіну III, фактора Ха, дослідних і стандартних зразків у діапазоні концентрацій від 0,025 до 0,200 МО/мл анти-Ха-факторної активності. Анти-Ха-факторна активність субстанції НМГ становить 92,3 МО/мл, ГЛФ НМГ - 10080 МО/мл.

Приклад 4

Валідація методу за критеріями "точність визначення" та "лінійність".

Валідацію методу за критерієм "точність визначення" проводять для визначення анти-Ха-факторної активності ГЛФ НМГ. Використовують 6 зразків ГЛФ НМГ однієї серії. Зазначена активність комерційного препарату ГЛФ НМГ складає 10000 МО/мл та може бути в діапазоні від 90 % до 110 % зазначеної активності. Із кожного зразка готують розчини за наступною схемою: 0,5 мл препарату доводять водою до 100 мл, 10 мл отриманого розчину розбавляють водою до 200 мл. Наважку протаміну сульфату масою 67,78 мг розчиняють в 200 мл води і титрують 6 приготовлених зразків ГЛФ НМГ в трьох повторностях. Отримані результати наведені в табл.1.

Таблиця 1

Валідація способу, що заявляється, за критерієм "точність визначення",  $n=3$  для кожного зразка

Номер зразка	Об'єм каліброваного розчину протаміну сульфату, мл	Активність ГЛФ НМГ, МО/мл
1	$4,955 \pm 0,001$	10000,3
2	$4,954 \pm 0,000$	9998,2
3	$4,954 \pm 0,000$	9998,2
4	$4,953 \pm 0,0003$	9996,2
5	$4,935 \pm 0,024$	9959,9
6	$4,958 \pm 0,005$	10008,3

Відносне стандартне відхилення для анти-Ха-факторної активності ГЛФ НМГ складає  $\pm 0,17$  %.

Валідацію методу за критерієм "лінійність" проводять для визначення антикоагулянтної акти-

вності субстанції НГ в діапазоні концентрацій від 10,250 мкг/мл до 86,600 мкг/мл.

Розчини субстанції НГ концентрацій 86,600, 51,960, 32,475, 21,050 та 10, 250 мкг/мл титрують відповідно розчином каліброваного протаміну су-

сульфату (92,2 мг каліброваного протаміну сульфату на 250 мл води). Активність гепарину розраховують за методом, як описано в приклад 2, формула

(1) для кожної взятої концентрації. Результати представлені в табл. 2 та на Фіг.1.

Таблиця 2

Валідація способу, що заявляється, за критерієм "лінійність" для визначення антикоагулянтної активності субстанції НГ, n=3

Номер зразка	Концентрація дослідного розчину субстанції НГ, мкг/мл	Об'єм каліброваного розчину протаміну сульфату, мл	Активність субстанції НГ, МО/мл
1	10,250	1,926±0,003	176,15
2	21,050	3,756±0,002	175,30
3	32,475	5,680±0,001	177,04
4	51,960	9,012±0,001	175,56
5	86,600	14,856±0,0015	173,65

Активність субстанції НГ, визначена за [7], складає 175 МО/мг.

Коефіцієнт кореляції  $R^2$  залежності кількості протаміну сульфату від концентрації субстанції НГ складає 0,9999 (Фіг.1).

#### Приклад 5

Умови визначення антикоагулянтної активності субстанції НГ такі ж, як в прикладі 4 для цього ж зразка за виключенням вихідної концентрації дослідних розчинів субстанції НГ та концентрації каліброваного протаміну сульфату.

17,35 мг гепарину розчиняють в 200 мл води, відбирають 100 мл отриманого розчину, доводять водою до 1000 мл; наважку каліброваного зразку протаміну сульфату масою 7,58 мг розчиняють в 200 мл води, титрують розчини субстанції НГ з невідомою активністю, розраховують його активність та визначають відносне стандартне відхилення, яке становить ±8,5 %.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє визначати антикоагулянтну активність НГ і анти-Ха-факторну активність НМГ, як субстанцій, так і ГЛФ, та має ряд переваг порівняно з найближчими аналогами (приклади 1-4), а саме:

- дозволяє автоматично з високою точністю визначати об'єм розчину каліброваного протаміну сульфату, витраченого на титрування розчинів НГ та НМГ з невідомою активністю;

- дозволяє швидко (протягом 10 хв. визначати антикоагулянтну активність НГ та анти-Ха-факторну активність НМГ, використовуючи лише один реагент (протаміну сульфат) порівняно з найближчим аналогами, де для визначення антикоагулянтної активності НГ використовують кров тварин та декілька реагентів, а для визначення анти-Ха-факторної активності НМГ використовують реагенти високої вартості: (хромогенний суб-

страт, антитромбін III, фактор Ха та спеціальне устаткування);

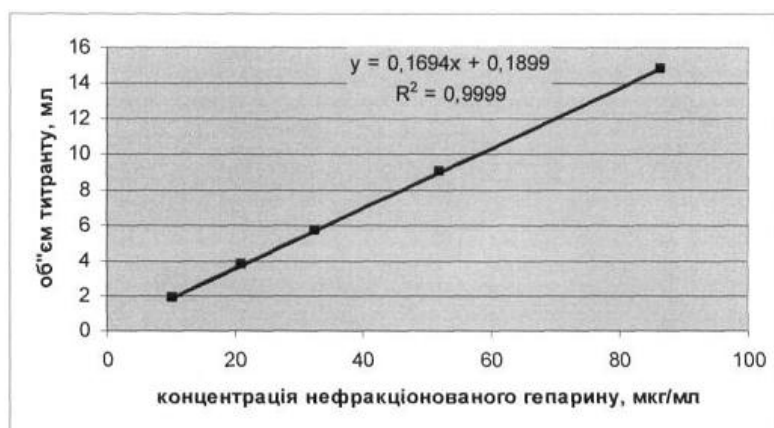
- є простим і зручним у виконанні та не праце-містким;

- дає можливість визначати антикоагулянтну активність НГ та анти-Ха-факторну активність НМГ для широкого діапазону значень вихідної концентрації НГ та/або НМГ.

Спосіб, що заявляється, знаходить застосування для контролю якості субстанцій та ГЛФ як НГ, так і НМГ, та для контролю очистки устаткування при їх виробництві.

#### Перелік посилань.

1. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. - 2001. - №1, біологія, - с. 128-133.
2. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. - Казань.- 2000. - С. 230-240.
3. Samma H.,Wajman A.Les nouvelles heparin de faible masse moleculaire // Coeur. - 1988. - 19. - p. 42-48.
4. Гепарин-тест, "Ольвекс Диагностикум", кат. №006, Росія.
5. АПТВ/АЧТВ-тест, "Ольвекс Диагностикум", кат. №152, Росія.
6. Pat. US 6140062, Oct. 31.2000.
7. European Pharmacopoeia 6,0, 2.7.5. Assay of heparin.01/2008:20705.
8. Pat US 20090236238, A1, Sept. 24, 2009.
9. Реахром-гепарин "Ренам", код ГП-1, Росія.
10. Реаклот-гепарин "Ренам", код ГП-2, Росія.
11. European Pharmacopoeia 6,0, "Heparins, Low-Molecular-Mass", 01/2008:0828. - p. 2041-2043.
12. European Pharmacopoeia 6,0, Protamine sulphate, 01/2008:0569, p. 2780-2781.



Фіг.

Залежність кількості протаміну сульфату від концентрації гепарину