

На правах рукописи

КОРНИЛОВА ОЛЬГА ГЕННАДЬЕВНА

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПОДХОДОВ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
И СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук**

Пермь – 2021

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) и в федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор фармацевтических наук, профессор
доктор медицинских наук, старший научный сотрудник

Бунятян Наталья Дмитриевна
Олефир Юрий Витальевич

Официальные оппоненты:

Зубкова Наталия Васильевна - доктор фармацевтических наук, Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», начальник управления научных разработок, стандартизации и внедрения

Грушевская Любовь Николаевна - доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», ведущий научный сотрудник химико-технологической лаборатории опытно-технологического отдела

Петров Александр Юрьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармации и химии

Ведущая организация:

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск.

Защита состоится «_____» _____ 20__ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2, тел. (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «_____» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.068.02
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Государственной стратегией лекарственного обеспечения населения Российской Федерации (РФ) на период до 2025 года предусмотрена оптимизация системы обращения лекарственных средств (ЛС), гарантирующая их безопасность, эффективность и качество. Лекарственные препараты (ЛП) иммуноглобулинов человека (ИГЧ) и альбумина человека (АЧ) являются наиболее востребованными из группы препаратов, получаемых из плазмы крови человека, как высокоэффективные ЛС в терапии неотложных и иммунодефицитных состояний, трансплантологии, гематологии, неврологии. В соответствии с Резолюцией от 12 февраля 2016 года № АД-П12-718 об обеспечении выполнения поручений Президента России о дополнительных мерах по развитию фармацевтической промышленности от 07.02.2016 № Пр-226 отечественные ЛП ИГЧ и АЧ являются приоритетными в предложениях по увеличению объемов производства по полному технологическому циклу. Импортозамещение предопределяет применение ЛП ИГЧ и АЧ российского производства в больших объемах при широком спектре заболеваний, терапия которых в настоящее время осуществляется аналогичными зарубежными ЛП.

В последнее десятилетие мировая практика применения ЛП ИГЧ и АЧ характеризуется расширением показаний к применению и увеличением диапазона терапевтических доз, которые сопровождаются увеличением частоты возникновения нежелательных реакций (НР), связанных с активацией ряда систем гомеостаза (калликреин-кининовой, плазминовой, свертывающей системы и системы комплемента) [Buchacher A. et al., 2010, Kimber M.C., 2015]. Указанные НР обусловлены влиянием остаточных количеств компонентов плазмы крови человека (ПКЧ), которые не являются основным действующим веществом ЛС: антиэритроцитарных антител, факторов свертывания крови (ФСК), ферментов и др. [Bellac C.L. et al., 2014, Ammann EM et al., 2016].

Вследствие появления новых данных системы фармаконадзора о НР регуляторными органами многих стран, были модернизированы требования к производству и качеству ЛП из ПКЧ, усовершенствованы и стандартизованы методы контроля их качества по показателям «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела», «Активатор прекалликреина».

Российские стандарты качества на ЛП ИГЧ и АЧ в течение длительного времени не подвергались актуализации. В частности, ФС 42-3159-95 «Имуноглобулин человека

нормальный для внутривенного введения», ФС 42-3198-95 «Иммуноглобулин человека нормальный», ФС 42-122-04 «Альбумин человека» нуждаются в серьезной доработке ввиду отсутствия необходимых показателей качества относительно содержания антиэритроцитарных антител (анти-А и анти-В гемагглютининов (ГА), анти-Д антител), активатора прекалликреина (АПК) и методов контроля, гармонизированных с международными фармакопейными требованиями. Существующая методика оценки уровня антикомплементарной активности (АКА) ЛП ИГЧ нуждается в оптимизации и стандартизации. Контроль качества ЛП ИГЧ по их тромбогенному потенциалу не регламентирован. Отсутствуют отечественные стандартные образцы (СО) содержания ГА, анти-Д антител, АПК, АКА.

Таким образом, все вышесказанное обуславливает актуальность и целесообразность формирования современных методологических подходов к стандартизации и контролю качества отечественных ЛП ИГЧ и АЧ с целью обеспечения их специфической безопасности в соответствии с международными требованиями.

Степень разработанности темы исследования.

Научная литература, посвященная вопросам изучения качества ЛП ИГЧ и АЧ, а также НР при их применении, представлена в основном зарубежными исследованиями. Крупнейшие производители ЛП из плазмы крови СиЭсЭл Беринг, Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес М.б.Х, Грифолс, Биотест Фарма Г.м.б.Х проводят исследования и публикуют результаты оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ [Farrugia A., 2011, Dhainaut F. et al., 2013, Voges-Haas R. et al., 2014], взаимосвязи риска развития гемолитических осложнений с количественным содержанием в указанных ЛП антиэритроцитарных антител [Bellac C.L. et al., 2013, Branch D.R., 2015], проблемы модернизации производства ЛП ИГЧ и АЧ с целью уменьшения вероятности их нежелательного влияния на системы гомеостаза (калликреин-кининовую, плазминовую, свертывающую, комплемента) [Jordan S. et al., 2013, Kimber M.C., 2015]. Специалисты Национального института биологических стандартов и контроля (NIBSC), Европейского медицинского агентства, Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов освещают проблемы разработки и аттестации международных и фармакопейных СО для контроля ЛП ИГЧ и АЧ [Thorpe S.J. et al., 2006, Sandberg E. et al., 2012, Lackner F. et al., 2015].

Анализ литературы свидетельствует о тщательном изучении вирусной безопасности отечественных ЛП ИГЧ и АЧ, совершенствовании технологии их изготовления и методов контроля вирусной контаминации. Различным аспектам эффективности и вирусной безопасности указанных препаратов посвящены работы Анастасиева В.В., Лютова А.Г., Исрафилова А.Г., Лаптевой Л.К., Зубковой Н.В.

В тоже время, вопросы стандартизации и контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ российского производства относительно содержания антиэритроцитарных антител, АПК, уровня АКА, тромбогенного потенциала в соответствии с международными требованиями не изучены.

Цель исследования: теоретическое и экспериментальное обоснование методологии обеспечения специфической безопасности, стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека.

Задачи исследования:

1. Обосновать понятие специфической безопасности препаратов крови человека и экспериментально определить методологию стандартизации и контроля качества иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности.

2. Гармонизировать с международными требованиями методические основы стандартизации и унифицировать методики контроля качества препаратов иммуноглобулинов человека по тромбогенному потенциалу, как одному из факторов специфической безопасности. Оценить уровень тромбогенного потенциала исследуемых препаратов по риску развития нежелательных реакций методами *in vitro* и *in vivo*.

3. Разработать унифицированные методики контроля качества препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по уровню антикомплементарной активности, содержанию анти-А и анти-В гемагглютининов, анти-Д антител, активатора прекалликреина, обеспечивающих их специфическую безопасность.

4. Валидировать разработанные методики контроля качества препаратов крови человека, основанных на иммунобиологических реакциях.

5. Провести экспериментальные исследования по выбору кандидатов в стандартные образцы уровня антикомплементарной активности и содержания анти-А и анти-В гемагглютининов, анти-Д антител, активатора прекалликреина в исследуемых препаратах крови человека.

6. Разработать и аттестовать стандартные образцы антикомплементарной активности, содержания анти-А и анти-В гемагглютининов, анти-Д антител, активатора прекалликреина, предназначенные для контроля качества препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности.

7. Унифицировать порядок обеспечения воспроизводимости результатов, получаемых при контроле качества отечественных препаратов крови человека по показателям специфической безопасности с целью гармонизации с международными требованиями.

8. Гармонизировать с международными требованиями национальные стандарты качества по методам контроля препаратов крови человека: ОФС «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения»; ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека»; ОФС «Испытание на анти-Д антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека»; ОФС «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека», ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека».

9. Разработать принципы и критерии экспертной оценки специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека и методические рекомендации для проведения экспертизы материалов регистрационного досье.

Научная новизна исследования. Впервые обосновано понятие специфической безопасности препаратов крови человека и определена методология стандартизации и контроля качества ИГЧ и АЧ по специфической безопасности; гармонизированы методические основы стандартизации и контроля качества препаратов ИГЧ по тромбогенному потенциалу; проведена оценка уровня тромбогенного потенциала исследуемых препаратов по риску развития нежелательных реакций методами *in vitro* и *in vivo*; разработаны унифицированные методики оценки уровня АКА, содержания ГА, анти-Д антител в ЛП ИГЧ, содержания АПК в ЛП ИГЧ и АЧ; разработаны и внедрены в практику ОФС на методы определения уровня АКА, содержания ГА, анти-Д антител, АПК; разработана методология валидации методик оценки специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ, основанных на иммунобиологических реакциях; разработаны СО содержания анти-А и анти-В ГА, анти-Д антител, АПК, иммуноглобулина человека

(АКА); определены принципы и критерии экспертной оценки ИГЧ и АЧ и разработаны «Методические рекомендации по экспертной оценке специфической безопасности препаратов крови».

Научная новизна работы подтверждена получением 3 патентов на изобретения РФ (№ 2577703 от 09.02.2015; № 2671415 от 05.06.2017; № 2682714 от 18.12.2017).

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе осуществлен направленный поиск решения приоритетных задач обеспечения специфической безопасности и стандартизации ЛП ИГЧ и АЧ на этапах обращения. Разработанные унифицированные методики оценки содержания анти-А и анти-В гемагглютининов, анти-Д антител, уровня АКА внедрены в систему качества отечественных ЛП ИГЧ (Акт о внедрении от 17.10.2019 г., Акт о внедрении от 09.01.2020 г.). Стандартные образцы ОСО 42-28-430 «Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)», ОСО 42-28-439 «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов», ОСО 42-28-440 «Набор для определения содержания анти-Д антител» внедрены в практику ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Акты о внедрении результата интеллектуальной деятельности №№ 6/ИЗ-2577703 от 20.04.2016, 12/ИЗ-2671415 от 03.12.2018, 13/ИЗ-2682714 от 16.05.2019) и предприятий по производству лекарственных препаратов из плазмы крови человека (Акт о внедрении от 09.01.2020 г.). Разработанные «Методические рекомендации по экспертной оценке специфической безопасности препаратов крови» внедрены в деятельность ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и используются при экспертной оценке препаратов крови человека. Результаты исследований по оценке специфической безопасности ИГЧ и АЧ включены в «Руководство по экспертизе лекарственных препаратов крови» (Акт внедрения от 28.12.2017 г.).

Разработанные ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения», ОФС 1.8.2.0005.15 «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека», ОФС.1.8.2.0004.15 «Испытание на анти-Д антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека», ОФС.1.8.2.0013.18 «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека» включены в ГФ РФ XIV издания; проект ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в

лекарственных препаратах из плазмы крови человека» рассмотрен на 63 заседании Совета по ГФ 02.07.2019 и рекомендован к включению в приложение ГФ РФ XIV издания; ФС.3.3.2.0007.15 «Иммуноглобулин человека нормальный», ФС.3.3.2.0008.15 «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения») включены в ГФ РФ XIV издания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методология стандартизации специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека.

2. Гармонизированные с международными требованиями методические основы стандартизации и контроля качества иммуноглобулинов человека по тромбогенному потенциалу.

3. Результаты определения тромбогенного потенциала иммуноглобулинов человека по содержанию прокоагулянтных факторов свертывания крови, антитромбина III, эндогенному тромбиновому потенциалу и способности к генерации тромбообразования.

4. Методики контроля качества препаратов ИГЧ и АЧ по показателям специфической безопасности: «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела», «Активатор прекалликреина».

5. Разработанные и аттестованные ОСО 42-28-430 «Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)», ОСО 42-28-439 «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов», ОСО 42-28-440 «Набор для определения содержания анти-Д антител», ОСО 42-28-445 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина», ОСО 42-28-446 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином) для оценки качества препаратов ИГЧ и АЧ по специфической безопасности.

6. Принципы и критерии экспертной оценки специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека.

Методология и методы исследования. Методология исследования базируется на проведении комплексной оценки особенностей фармацевтической разработки ЛП ИГЧ и АЧ, изучении их свойств, обуславливающих изменения реологических свойств крови, инициацию внутрисосудистого гемолиза, а также влияние на калликреин-кининовую систему и систему свертывания крови с последующей разработкой стандартизованных

унифицированных методик контроля качества этих ЛС, позволяющих минимизировать появление НР, а также рекомендаций по изучению тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ. При выполнении работы были использованы методы документального анализа; комплекс иммунобиологических методов исследований, статистические методы анализа и обработки результатов. Экспериментальные исследования выполнены на сертифицированном оборудовании лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Степень достоверности результатов. Необходимая степень достоверности обусловлена достаточным количеством экспериментальных исследований с применением адекватных методических подходов, отвечающих поставленным задачам исследования. Метрологическое обеспечение использованного в работе лабораторного оборудования подтверждено квалификацией соответствующего уровня. Применимость разработанных методик подтверждена валидационными исследованиями. В работе проанализирован достаточный объем литературных источников отечественных и иностранных авторов. Для всех данных использованы методы статистической обработки полученных результатов в соответствии с монографией ЕФ 5.3. Statistical analysis of results of biological assays and tests и ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента», ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» ГФ РФ, что это позволило сформулировать адекватные и точные выводы.

Апробация результатов исследования. Основные положения теоретических и экспериментальных исследований представлены и обсуждены на XV Всероссийском научном форуме с международным участием им. акад. В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015); Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2015), I Калининградском Научном иммунологическом форуме (Калининград, 2016 г), XIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2017 г), XVI Всероссийском научном форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2017 г), V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018 г), III международной научной конференции

«Стандартные образцы в измерениях и технологиях» (Екатеринбург, 2018 г), IV Объединенном иммунологическом форуме (Новосибирск, 2019 г.). Апробация диссертационной работы проведена на объединенном заседании кафедр фармацевтической технологии и фармакологии; фармацевтической технологии; фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева; аналитической токсикологии, фармацевтической химии и фармакогнозии; фармацевтического естествознания; химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Испытательного центра экспертизы качества МИБП, Центра экспертизы и контроля МИБП, Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва декабрь, 2019 г., протокол № 11 от 23.12.2019 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 35 научных работ, в том числе 3 патента на изобретения Российской Федерации; 20 статей – в изданиях, включенных в Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук, из которых 11 по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Личный вклад автора. Автору принадлежит основная роль в выборе научного направления работы, постановке цели и задач исследования, обосновании выбора оптимальных путей их решения, планировании и непосредственном выполнении экспериментальных исследований, анализе полученных результатов, формулировке общих выводов, разработке ОФС и ФС, внедрении результатов исследований, подготовке докладов и оформлении научных публикаций, а также рукописи диссертации и автореферата.

Личный вклад автора является определяющим и состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения и оформления диссертационной работы.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 301 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, списка литературы, включающего 260 источников, в том числе 160 на иностранных языках, и приложений. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 52 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования проводили с использованием ЛП ИГЧ отечественного и зарубежного производства в лекарственных формах раствор для инфузий, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, раствор для внутривенного введения, раствор для внутримышечного введения; ЛП АЧ отечественного и зарубежного производства в лекарственной форме раствор для инфузий. С целью разработки СО использовали растворы ИГЧ, полученные из плазмы крови доноров различной резус- и групповой принадлежности, производства ФГУП «НПО «Микроген», ЛП АЧ отечественного производства, реагент Human Coagulation Factor XIIIa Beta, Cell Sciences. В работе использовали СО международные и ЕФ.

Антикомплементарную активность определяли в реакции связывания комплемента (РСК) с использованием гемолитических сывороток, комплемента морских свинок, крови бараньей дефибринированной, дефибринированной с цитратом, консервированной для РСК. Содержание анти-А и анти-В ГА, анти-Д антител определяли в реакциях прямой (ПГА) и непрямой (НГА) гемагглютинации с использованием планшетов серологических, иммунологических необработанных V-образных, пробирок агглютинационных, гелевых карт, реагентов эритроцитов, папаина, антиглобулиновой сыворотки. Антирезусную активность определяли методом проточной цитофлюориметрии с использованием вторичных антител, меченых флюоресцеином, фикоэритрином, а также методом ПГА. Содержание АПК определяли хромогенным методом по измерению скорости изменения интенсивности окраски в минуту в интервале со 2 по 10 минуты при длине волны 405 нм (кинетический тест) или количества выделившегося хромофора по интенсивности окраски после внесения 50 % раствора уксусной кислоты (тест по конечной точке) с использованием реагентов прекалликреина человека (ПК) отечественного и зарубежного производства, хромогенного субстрата S-2302.

Активность ФСК II, V, VII, IX, X, XI определяли клоттинговыми методами в соответствии с программой автоматизированной системы анализа гемостаза BCS®XP с использованием реагентов Pathromtin SL, Actin FS, Thromborel S, Dade Innovin, стандартной ПКЧ, реагентов плазмы, дефицитной по соответствующему ФСК. Активность антитромбина III (АТIII) и ФСК II, X, IXa, XIa хромогенными методами

определяли с использованием набора реагентов «Berichrom для определения активности АТШ», хромогенных субстратов S-2222, S-2238, наборов реагентов CoaChrom[®] Prothrombin, Rox Factor XIa, Rox FIXa по оригинальным методикам Rossix Chromogenic с использованием спектрофотометра Multiskan GO, а также по методикам, адаптированным для системы BCS[®]XP. Оценку эндогенного тромбинового потенциала (ЭТП) проводили на основании латентного периода генерации тромбина и периода образования максимального количества тромбина с использованием стандартной ПКЧ и набора реагентов INNOVANCE[®]ETP.

Для изучения тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ проводили моделирование венозного стаза адаптированной методикой S. Wessler на кроликах породы «Советская шиншилла» (вес 2,0-2,5 кг), миорелаксацию осуществляли препаратом Ксила (0,15-0,2 мл/кг, внутримышечно), общую анестезию - препаратом Золетил 100 (0,2 мл/кг с добавлением 0,8 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, внутримышечно); объем вводимого ЛП ИГЧ соответствовал разовой дозе для человека в пересчете на кг массы тела.

Разработанные методики валидировали в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» и рекомендациями Юргеля Н.В. с соавт. (2007). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ MicrosoftExcel 7.0., «ПАРАЛАЙН» (авторское свидетельство 2006612065).

Результаты исследования

1. Обоснование методологии стандартизации и контроля качества иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности

Анализ научной литературы, информации системы фармаконадзора позволил структурировать закономерности развития НР и выделить группу, обусловленную наличием в готовой лекарственной форме ЛП ИГЧ и/или АЧ белков ПКЧ, которые являются естественными компонентами плазмы: антиэритроцитарные антитела, АПК, агрегированные формы молекул ИГ, ФСК, протеолитические ферменты, но для указанных ЛП являются нежелательными примесями, способными оказывать негативное влияние при парентеральном введении. С целью разработки методологии стандартизации и контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ нами обосновано понятие специфической безопасности ЛП из ПКЧ, как фактора, характеризующего риски причинения вреда здоровью при их применении, обусловленные влиянием на системы гемостаза и комплемента, калликреин-кининовую систему и эритроцитарное звено системы гомеостаза. Выявлены приоритетные направления

теоретических и экспериментальных исследований, позволяющих обеспечить специфическую безопасность ЛП ИГЧ и АЧ отечественного производства:

- обоснование методологии стандартизации и контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ по показателям специфической безопасности;
- экспериментальная разработка методик и СО для обеспечения стандартизации и контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности.

Методология стандартизации ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности как совокупность принципов и методов обеспечения их качества, сформирована на основании взаимосвязанных этапов разработки, доклинического и клинического исследования, экспертизы в рамках государственной регистрации и производства ЛП (Рисунок 1).

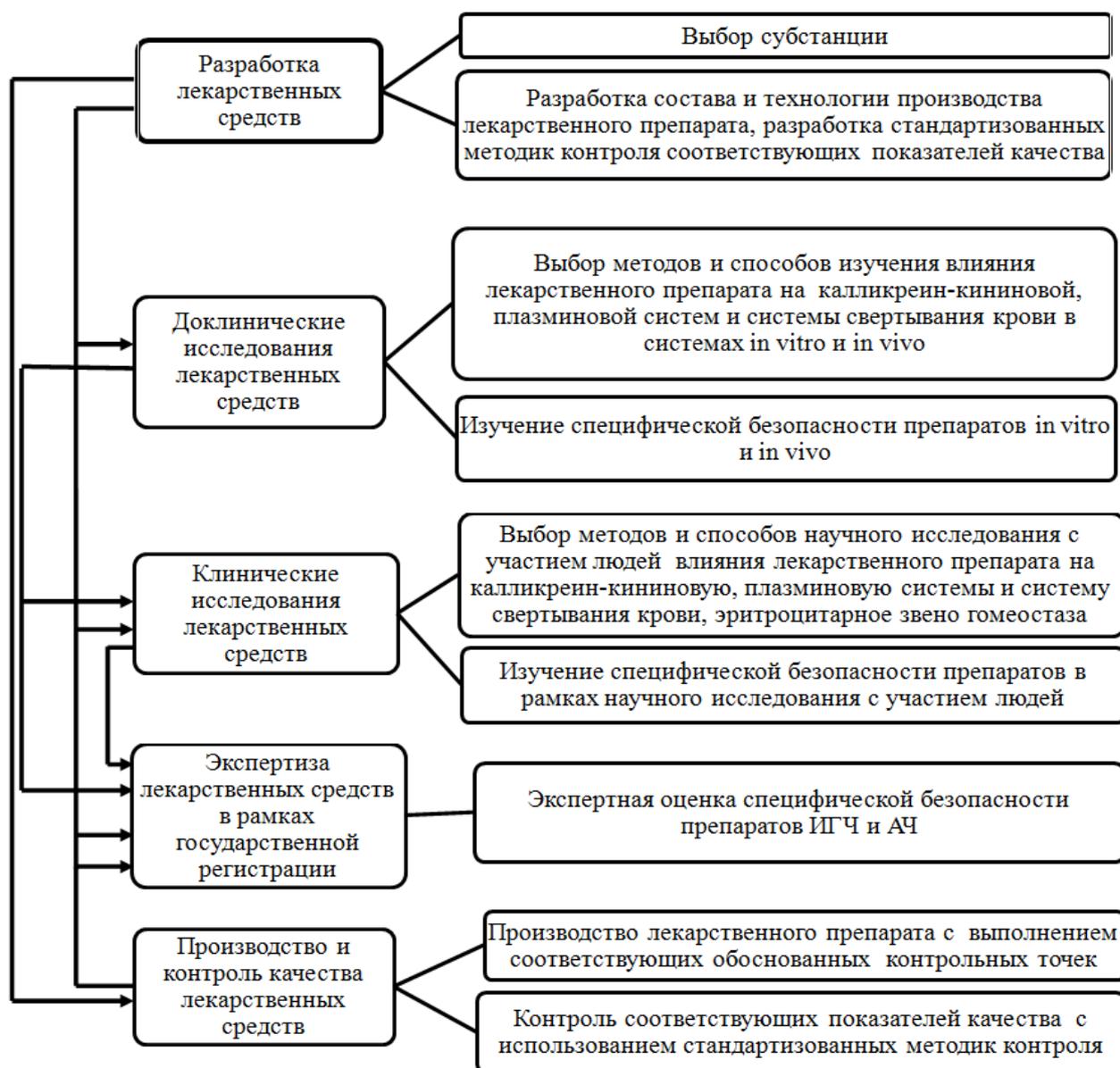


Рисунок 1 - Методология стандартизации ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности

Принципы обеспечения качества ЛП из ПКЧ, в том числе и ИГЧ и АЧ, в аспекте специфической безопасности можно разделить на следующие группы:

- технологические (технология производства, фармацевтическая разработка с учетом стабилизации, совместимости и биологической активности/эффективности);
- исследовательские (доклинические, клинические, постмаркетинговые исследования);
- экспертные (документальная и лабораторная фармацевтическая экспертиза при регистрации ЛС, внесении изменений в регистрационное досье, в том числе в нормативную документацию на ЛС);
- методические (стандартизованные унифицированные методики доклинического изучения свойств (в системах *in vitro* и *in vivo*) и контроля качества ЛП как при выпуске ЛП, так и при подтверждении соответствия требованиям НД в испытательных лабораториях);
- нормативно-правовые (стандартизация ЛП в соответствии с ФС, методов их контроля в соответствии с ОФС);
- информационные (взаимное информирование врач-пациент, функционирование системы фармаконадзора).

Указанные принципы применимы для всех субъектов обращения лекарственных средств. Они неотделимы от принципов обеспечения качества ЛП из ПКЧ с позиций иных аспектов безопасности (вирусной, иммунологической и др.) и эффективности.

В дальнейших исследованиях были разработаны методологические подходы к стандартизации и оценке качества ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности (Рисунок 2). Прогностический подход позволил установить необходимость выявления источников риска негативного влияния на организм пациента на этапе разработки ЛП, обоснования технологических возможностей предотвращения контаминации остаточным содержанием «нецелевых» белков ПКЧ или их эффективной элиминации; выбор соответствующих показателей качества с критериями оценки применительно к группировочному наименованию и лекарственной форме препаратов. Оценка свойств инфузионных ЛП ИГЧ должна включать соответствующие методы изучения тромбогенного потенциала как на животных, так и лабораторными методами *in vitro*. В целях гармонизации национальных стандартов качества в сфере обеспечения эффективности, безопасности и качества ЛС из ПКЧ по специфической безопасности



Рисунок 2 – Методологические подходы к обеспечению специфической безопасности лекарственных препаратов ИГЧ и АЧ

нами были выделены соответствующие структурные элементы спецификации ЛП ИГЧ, которые отражены в ФС.3.3.2.0007.15 «Имуноглобулин человека нормальный», ФС.3.3.2.0008.15 «Имуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения»:

- Специфическая безопасность: «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела» (препараты для внутривенного введения);
- Специфическая безопасность: «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела» (препараты для подкожного введения).

3. Разработка методических основ стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека по тромбогенному потенциалу

На основании прогностического и аналитического методологических подходов с учетом данных о зарегистрированных случаях тромбозомболических осложнений у пациентов, получивших инфузии ЛП ИГЧ в высоких дозах, в том числе с соблюдением

режима введения, нами выявлена необходимость оценки тромбогенного потенциала этих ЛП отечественного производства.

Анализ методических подходов, используемых зарубежными исследователями для оценки качества серий ЛП Октагам, раствор для инфузий, вызвавших тромбоэмболические НР, позволил установить перечень наиболее значимых параметров и их количественные характеристики в зависимости от результатов клинического применения указанного ЛС:

- тромбогенный потенциал в тесте генерации тромбина (максимальное количество образовавшегося тромбина не более 350 нМоль, латентный период (лаг-фаза) не менее 11 мин, период образования максимального количества тромбина не менее 19 мин);

- активность прокагулянтных ФСК (активность фактора XIa не более 10 мМЕ/мл, активность факторов II, VII, IX, IXa, X, XI менее 50 мМЕ/мл);

- неактивированное частичное тромбопластиновое время (НАЧТВ) (отсутствие сокращения времени свертывания стандартной ПКЧ при внесении образцов ЛП ИГЧ);

- отсутствие тромбообразования при введении модельным животным.

Установлена возможность определения активности ФСК в ЛП ИГЧ клоттинговыми методами с использованием различных реагентов активаторов свертывания и международных СО соответствующих ФСК для построения калибровочных графиков в диапазоне менее 0,1 МЕ/мл (таблица 1). Линейная зависимость с коэффициентом корреляции более 0,98 в диапазоне активности ФСК X 0,028 - 0,112 МЕ/мл для реагентов Thromborel S и Pathromtin SL свидетельствуют о приемлемости методики для оценки содержания ФСК X в ЛП ИГЧ с соблюдением критерия оценки тромбогенного потенциала 0,05 МЕ/мл. Использование реагента Dade Innovin в этом же диапазоне не позволяет адекватно оценить содержание указанного ФСК. Для оценки содержания ФСК IX в диапазоне 0,010 – 0,154 МЕ/мл возможно использование обоих изученных реагентов активатора свертывания крови, для оценки ФСК II, V, VII, IX применим реагент Thromborel S в соответствующих диапазонах.

В настоящих исследованиях разработан алгоритм оценки частичного тромбопластинового времени для системы BCS® XP (Рисунок 3), который позволил оценить влияние образцов ЛП ИГЧ на изменение скорости образования сгустка.

Приемлемость методики INNOVANCE® ETP для оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ подтвердили в исследовании образцов ИГЧ с добавлением

Таблица 1 – Характеристики методик клоттингового определения активности ФСК

ФСК	Реагент активатора	Характеристики методики			
		Специфичность	Линейность	Диапазон, мМЕ/мл	Правильность
II	Thromborel S	да	$y=-160,1x+47,53$ $R^2=0,99$	0,010 – 0,154	107 %
V	Thromborel S	да	$y=-175,1x+58,53$ $R^2=0,9845$	0,030 - 0,121	105 %
VII	Thromborel S	да	$y=-23,74x+28,15$ $R^2=0,9904$	0,028 - 0,112	104 %
IX	Pathromtin SL	да	$y=-134,6x+21,38$ $R^2=0,9869$	0,010 – 0,154	102 %
	Actin FS	да	$y=-203,6x+41,08$ $R^2=0,9869$	0,010 – 0,154	105 %
X	Thromborel S	да	$y=-438,29x+121,75$ $R^2=0,9866$	0,028 - 0,112	110 %
	Dade Innovin	да	$y=-476,57x+109,25$ $R^2=0,9266$	0,028 - 0,112	130 %
	Pathromtin SL	да	$y=-348,29x+110,89$ $R^2=0,9880$	0,028 - 0,112	110 %
XI	Thromborel S	да	$y=-98,45x+83,86$ $R^2=0,9800$	0,029 - 0,110	106 %

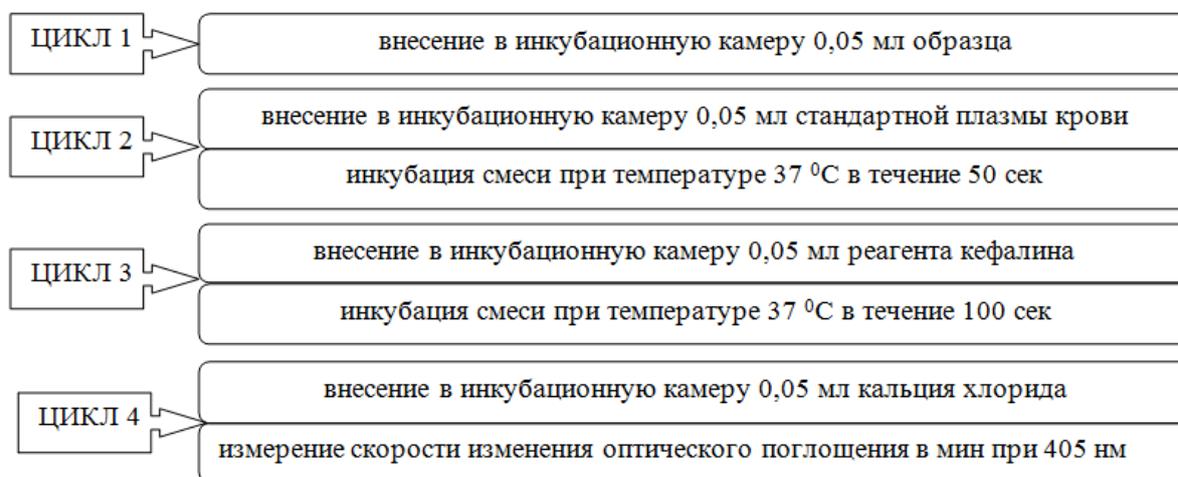


Рисунок 3 - Алгоритм оценки частичного тромбопластинового времени для системы BCS® XP ФСК XIa до расчетного содержания 50 мМЕ/мл: латентный период генерации тромбина уменьшался до 9 - 10 мин, период образования максимального количества тромбина до 15 - 18 мин. Установлено, что используемые унифицированные методики позволяют определять тромбогенный потенциал инфузионных препаратов ИГЧ отечественного и зарубежного производства по содержанию ФСК протромбинового комплекса, АТШ, тромбопластинового времени и ЭТП (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты изучения тромбогенного потенциала образцов инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека

Наименование/ производитель	Активность фактора свертывания ..., мМЕ/мл ($\bar{x} \pm S_x$)									АЧТВ, сек (\bar{x})	НАЧТВ, сек (\bar{x})	Показатели ЭТП	
	II	V	VII	IX	IXa	X	XI	XIa	АТ III, МЕ/мл ($\bar{x} \pm S_x$)			ЛПГТ, мин (\bar{x})	ПОМКТ, мин (\bar{x})
Габриглобин®–Ig G / ЗАО «Иммуно-Гем» (n=5)	Не выявляется	30, менее	10, менее	10, менее	3,26±0,05	Не выявляется	30, менее	0,04, менее	1,17±0,15	254	257	11	30
Иммуновенин® / ФГУП «НПО «Микроген» (n=10)			15,00±1,80	10, менее	0,07±0,01				1,25±0,20	264	268	12	20
Иммуноглобулин человека нормальный / ФГУП «НПО «Микроген» (n=5)			21,00±3,15	42,00±0,50	0,45±0,03				1,11±0,35	255	260	Не определяли	
Имбиоглобулин® / ФГУП «НПО «Микроген» (n=5)			12,00±2,45	70,50±20,1	0,36±0,01				Не определяли	269	260	15	25
Иммуноглобулин человека нормальный / ОСПК им. Климовой (n=5)			16,00±2,03	30,87±0,32	0,11±0,01				1,12±0,71	270	272	27	29
Гамунокс / Талекрис Биотерапьютикс Инк. (n=5)			11,00±1,03	20,06±0,28	0,09±0,02				Не выявляется	289	290	18	31
Иммуноглобулин Сигардис/ Сычуаньская Юанда Шуян Фармацевтическая компания (n=7)			10, менее	30,76±0,32	0,03±0,01				Не выявляется	280	275	Не определяли	
Примечания. 1 - АТ III – антитромбин III. 2 – АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время. 3 – НАЧТВ – неактивированное частичное тромбопластиновое время. 4 - ЭТП – эндогенный тромбиновый потенциал. 5 – ЛПГТ – латентный период генерации тромбина. 6 - ПОМКТ – период образования максимального количества тромбина. 7 - Значение частичного тромбопластинового времени стандартной плазмы крови человека - не менее 250 сек.													

Все изученные образцы соответствовали критериям оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ, за исключением одного наименования отечественного ЛП ИГЧ по содержанию фактора IX. Активность ФСК II и X в изученных ЛП ИГЧ не выявлялась, содержание ФСК V и XI установлено как «менее 30 мМЕ/мл», так как коагуляция наблюдалась в разведениях образцов менее нижнего предела калибровочных кривых 30 мМЕ/мл. Выявлено наличие АТIII в образцах ЛП ИГЧ отечественного производства в количестве от 0,41 до 1,83 МЕ/мл. Латентный период генерации тромбина не менее 11 мин и период образования максимального количества тромбина не менее 20 мин для всех изученных образцов свидетельствовал об их низком ЭТП. Установлено отсутствие сокращения времени свертывания стандартной ПКЧ при внесении образцов ЛП ИГЧ.

В дальнейших исследованиях изучена способность ЛП ИГЧ обуславливать образование тромба *in vivo* на модели венозного стаза (модифицированный метод S. Wessler). В ходе экспериментальных исследований нами разработаны схема проведения премедикации и внутривенной анестезии, схема введения исследуемого препарата, методики извлечения тромба из сосуда и определения его размеров. В качестве положительного контроля была использована стандартная ПКЧ (Siemens) (образование тромба в 100 % случаях введения в объеме 2,5 мл [S. Wessler]), отрицательного – 0,9 % раствор натрия хлорида. Полученные результаты позволили установить, что изучение содержания ФСК в ЛП ИГЧ методами *in vitro* не является исчерпывающим критерием оценки их тромбогенного потенциала, так как образцы четырех наименований из исследованных ЛП российского и зарубежного производства при введении кроликам в минимальной разовой дозе вызывали образование тромба(ов) при соответствии критериям оценки тромбогенного потенциала *in vitro*. Это обстоятельство предопределяет необходимость проведения исследований ЛП ИГЧ в рамках доклинического изучения не только *in vitro*, но и *in vivo*.

4. Разработка методик контроля качества препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности

4.1. Разработка унифицированной методики контроля качества ЛП ИГЧ по показателю «Антикомплементарная активность»

Существующие отечественные методики определения АКА не позволяют установить качество ЛП ИГЧ в соответствии с международными требованиями [Методические рекомендации, 1988 г., Методические указания, 2001 г.]. С целью гармонизации отечественной методики с фармакопейной (ЕФ) установлена

необходимость использования СО, позволяющего оценить приемлемость результатов испытаний; экспериментально обоснована необходимость применения комплемента, изготовленного из пула сыворотки крови морских свинок и хранящегося в замороженном до минус 70 °С состоянии, так как только при его использовании возможно получение значений АКА и положительного, и отрицательного контролей СО ВРР, соответствующих аттестованным (таблица 3).

Таблица 3 - Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека ВРР при использовании комплемента морских свинок различных производителей

Наименование реагента/ производитель	Серия реагента (количество исследований)	Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека ВРР, процент, $\bar{x} \pm S_x$, p=0,95	
		Отрицательный контроль	Положительный контроль
Комплемент сухой/ ФГУП «НПО «Микроген», Россия	785 (n=6)	8,5±2,2	14,6±3,7
	806 (n=5)	13,4±1,7	Определить невозможно
	811 (n=9)	11,6±2,5	36,4±5,9
	814 (n=8)	11,5±3,1	32,2±5,3
COMPLEMENT/ Siemens, Германия	42178 (n=7)	14,2±2,8	36,3±5,2
	42794 (n=10)	13,6±2,6	40,1±4,6
Пулированный комплемент/ <i>in house</i>	24.10.13 (n=8)	18,8±3,4	79,5±2,4
	21.01.14 (n=12)	18,5±2,9	84,0±4,1
	15.06.15 (n=7)	20,9±2,4	76,6±2,5
Примечание - аттестованные значения АКА СО иммуноглобулина человека ВРР: положительный контроль 60-100 %, отрицательный контроль 10-40 %			

Изучена возможность и обоснованы критерии пригодности различных доступных реагентов крови барана для получения 5 % суспензии эритроцитов (Рисунок 4, таблица 4).

Критерии пригодности реагентов крови бараньей

Внешний вид реагента: отсутствие гемолиза надосадоочной жидкости при отстаивании, алый цвет суспензии при встряхивании	Отсутствие выраженного гемолиза при первом «отмывании»	Получение прозрачной надосадоочной жидкости при третьем «отмывании»
--	--	---

Рисунок 4 – Критерии пригодности реагентов крови бараньей

Проведена унификация методики по составу желатин-содержащего буферного раствора, позволяющая использовать не только реактивы, работа с которыми требует соответствующего лицензирования (барбитал и его натриевая соль), но и общедоступные (натрия хлорид, кальция хлорид безводный и магния хлорида б-водный) для приготовления альтернативного солевого раствора.

Таблица 4 - Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека BRP при использовании различных реагентов крови бараньей

Реагент кровь баранья	Наименование контроля СО	Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека BRP с использованием крови бараньей на ... сутки взятия, процент, $\bar{x} \pm S_x$			
		7	14	21	28
Для питательных сред, стерильная (с цитратом натрия)	Отрицательный	17,3±7,9	20,2±6,4	19,4±4,99	18,5±3,4
	Положительный	76,2±2,7	75,3±3,9	79,2±4,2	75,4±2,6
Консервированная для реакции связывания комплемента	Отрицательный	20,3±5,4	18,5±3,4	20,5±2,7	20,4±3,9
	Положительный	75,3±3,2	79,5±2,4	80,3±4,4	84,2±3,0
Дефибринированная (<i>in house</i>).	Отрицательный	21,6±3,3	20,8±2,9	17,9±2,7	Определить невозможно
	Положительный	78,2±4,6	84,0±4,1	81,5±4,2	

Примечания.
 1 - Аттестованные значения АКА СО иммуноглобулина человека BRP: положительный контроль 60-100 %, отрицательный контроль 10-40 %.
 2 – Количество исследований составило 4 для каждого реагента на 7, 14, 21 и 28 сутки (p=0,95)

Критерием приемлемости реагента служило соответствие значений АКА положительного и отрицательного контролей СО BRP аттестованным значениям. Так, при использовании желатин-солевого раствора (ЖСР) значения АКА для отрицательного контроля соответствовали диапазону от 12,5 до 22,3 %, в аналогичных условиях при использовании желатин-барбиталового буферного раствора (ЖББР) – от 13,4 до 23,3 %. Для положительного контроля значения АКА соответствовали диапазону от 78,5 до 82,5 % при использовании ЖСР и от 75,6 до 81,8 % при использовании ЖББР.

Разработанная методика позволяет контролировать ЛП ИГЧ по показателю «Антикомплементарная активность» в соответствии с международными требованиями – уровень АКА не превышает 1 CH₅₀/мг белка (не более 50 %) (таблица 5).

Таблица 5 – Антикомплементарная активность препаратов иммуноглобулинов человека отечественного производства

Препарат иммуноглобулина человека в лекарственной форме	Антикомплементарная активность (p=0,95)	
	CH ₅₀ /мг белка, $\bar{X} \pm S_x$	процент, $\bar{X} \pm S_x$
Лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения (n=35)	0,49±0,09	26,6±4,4
Раствор для внутривенного введения (n=17)	0,37±0,06	18,4±3,1
Раствор для инфузий (n=20)	0,57±0,14	28,6±6,9

Результаты исследований были использованы при разработке ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека».

4.2. Разработка унифицированных методик оценки содержания антиэритроцитарных антител

В основе методов оценки качества ЛП ИГЧ по содержанию ГА и анти-D антител лежит реакция агглютинации тестовых эритроцитов. Использование биологических объектов предопределяет необходимость стандартизации методик, которая может быть достигнута их унификацией с проведением соответствующих валидационных процедур и использованием СО.

С целью разработки фармакопейных методик оценки содержания анти-A и анти-B ГА, нами были оптимизированы и адаптированы методы ЕФ с учетом доступности реагентов на территории РФ. Применительно к методу НГА, преимущественно используемому отечественными производителями, оптимизированы критические параметры: подготовка суспензии эритроцитов, соотношение вносимых реагентов, кратность и режимы центрифугирования в процессе отмывания сенсibilизированных эритроцитов, временной интервал, допустимый для оценки результатов. Отсутствие различий при определении содержания ГА в ЛП ИГЧ («на плоскости» и с использованием гелевой технологии) позволило обосновать возможность использования как свежеприготовленных (СПК), так и стабилизированных (ID-DiaCell 0-A-B 5 %) эритроцитов (Рисунок 5).

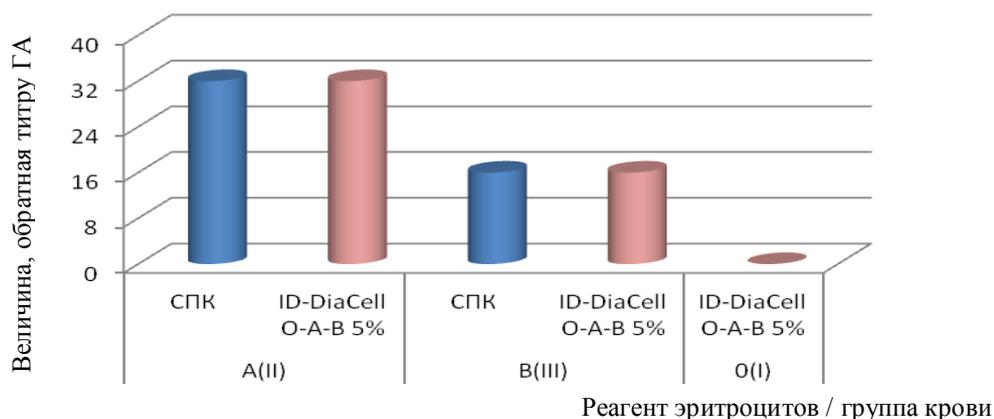


Рисунок 5 – Результаты определения содержания ГА в ЛП ИГЧ с использованием различных реагентов эритроцитов

Нами обоснована методика оценки содержания ГА в ЛП ИГЧ с использованием гелевой технологии, а также разработана методика приготовления контрольных клеток Кумбса – сенсibilизированных Rh(+) эритроцитов группы 0(I) (Рисунок 6).

Метод ПГА, регламентированный ЕФ, также предусматривает использование эритроцитов группы крови A(II) наиболее иммуногенной подгруппы A₁ и группы крови B(III) для выявления анти-A ГА и анти-B ГА соответственно.

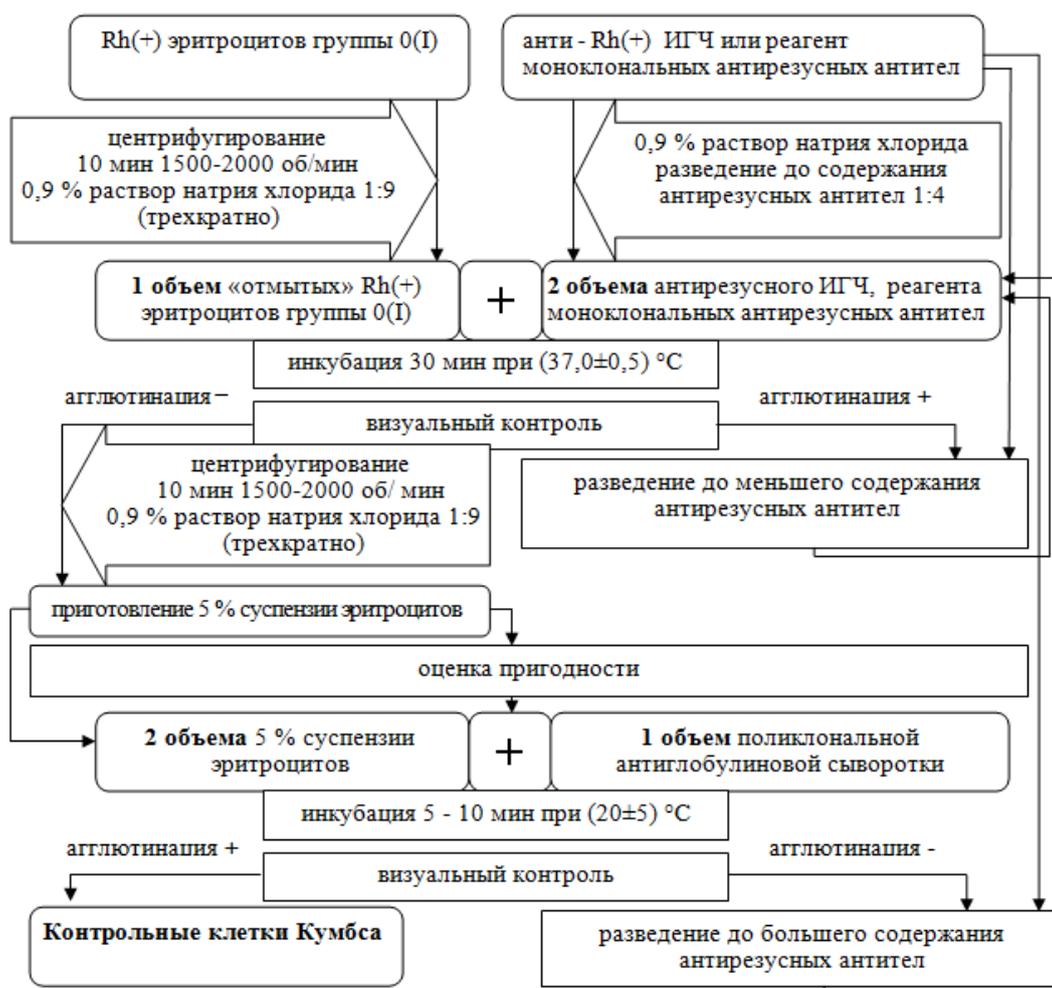


Рисунок 6 – Алгоритм приготовления контрольных клеток Кумбса

Однако для повышения чувствительности реакции необходима предварительная обработка эритроцитов папаином. Нами обоснована методика папаинизации эритроцитов с учетом доступных на территории РФ реагентов папаина (Рисунок 7).

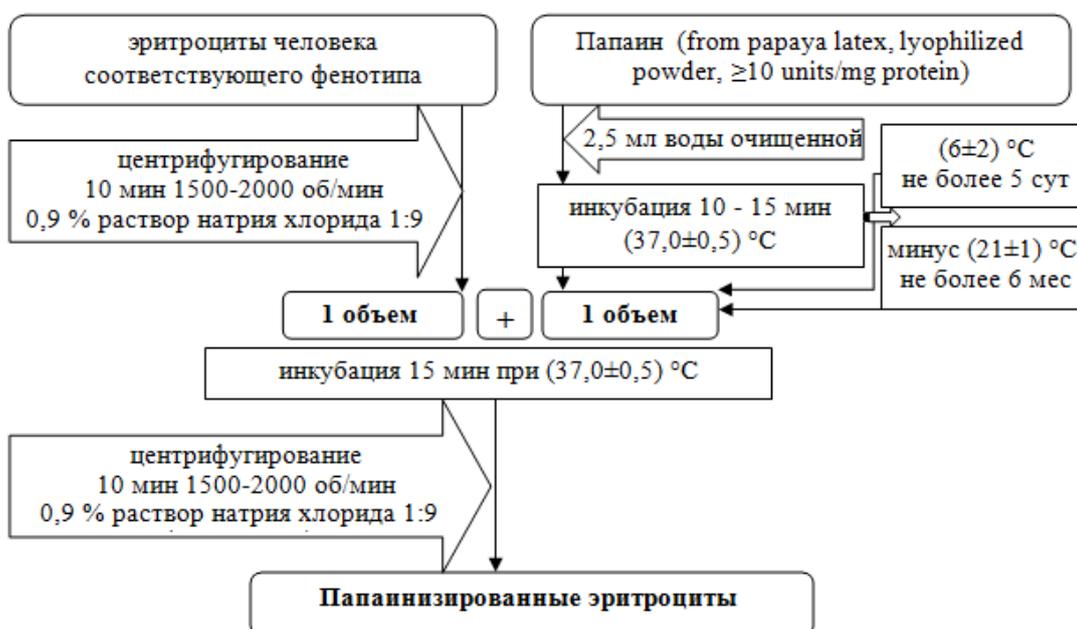


Рисунок 7 – Алгоритм обработки папаином эритроцитов человека

В методики включено обязательное использование соответствующих СО. С целью исключения вариабельности получаемых результатов время учета ограничено от 4-5 до 10 минут минут (Рисунок 8).

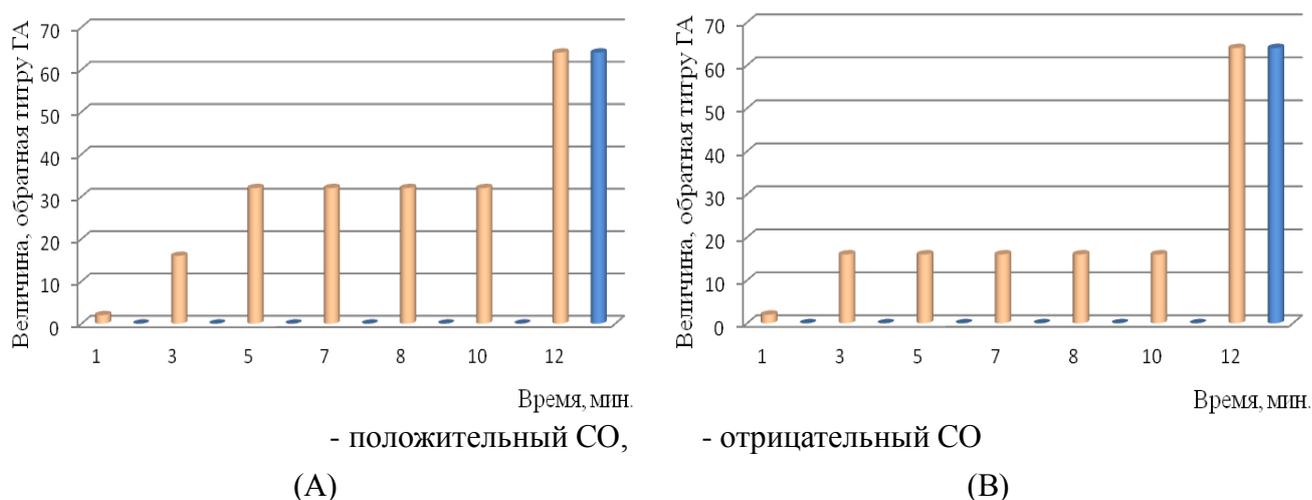


Рисунок 8 - Результаты определения содержания (А) – анти-А, (В) – анти-В гемагглютининов в стандартном образце при различном времени оценки агглютинации

В основе разработанных фармакопейных методик оценки содержания анти-D антител лежит метод ПГА ЕФ с применением Rh(+) и Rh(-) эритроцитов, обработанных папаином в соответствии с разработанным алгоритмом. Нами обоснована методика с использованием гелевой технологии, применимость которой подтверждена получением результатов определения содержания анти-D антител в международном СО в соответствии с аттестованными: 1:8 для положительного контроля; 1:2 или менее в отрицательном. Титр 1:2 выявлялся в случаях использования тестовых эритроцитов, содержащих антиген С^w, что допускается инструкцией по применению СО. С целью исключения вариабельности получаемых результатов ограничено время учета агглютинации от 4-5 до 10 минут.

С целью оценки сопоставимости методик, применяемых зарубежными производителями, и разработанных нами провели изучение содержания антиэритроцитарных антител в ЛП ИГЧ зарубежного производства (таблица 6). Применение указанных методик позволило установить содержание антиэритроцитарных антител в титре, не отличающемся более чем на один шаг разведения.

Нами проведено изучение ЛП ИГЧ отечественного производства разработанными методиками, которое позволило установить в них содержание анти-А и анти-В ГА в титре не более 1:32, анти-D антител не более титра положительного СО (в разведении 1:8), что соответствует международным требованиям (таблица 7).

Таблица 6 – Содержание антиэритроцитарных антител в препаратах иммуноглобулинов человека зарубежного производства

Наименование образца/ производитель/количество определений	Наименование метода	Гемагглютинины		Анти-D антитела
		анти-A	анти-B	
Гамунекс / Талекрис Биотерапьютикс Инк, США / 5	НГА ²	1:8 (1:4 – 1:16)	1:4 (1:2 – 1:4)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
	НГА ³	1:8 (1:4 – 1:16)	1:4 (1:2 – 1:4)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
И.Г.Вена / Кедрион С.п.А., Италия / 5	ПГА ²	1:4 (1:4 – 1:16)	1:4 (1:2 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
	ПГА ³	1:4 (1:4 – 1:16)	1:4 (1:4 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
Иммуноглобулин Сигардис / Сычуаньская Юанда Шуянь Фармацевтическая компания, Китай) (n=10)	НГА ²	1:8 (1:2 – 1:8)	1:8 (1:2 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
	НГА ³	1:8 (1:4 – 1:8)	1:8 (1:2 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
Октагам (Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х., Австрия) (n=5)	НГА ²	1:8 (1:4 – 1:32)	1:4 (1:4 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
	НГА ³	1:8 (1:4 – 1:32)	1:4 (1:4 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)

Примечания.
1 - Указаны Мо титра антиэритроцитарных антител и диапазон значений при p=0,95.
2 – Методика производителя.
3 – Разработанная методика.

Таблица 7 – Содержание антиэритроцитарных антител в препаратах иммуноглобулинов человека отечественного производства

Препарат иммуноглобулина человека в лекарственной форме	Гемагглютинины		Анти-D антитела
	анти-A	анти-B	
Лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения (n=35)	1:8 (1:4 – 1:32)	1:8 (1:4 – 1:16)	1:2 (менее 1:2–1:4)
Раствор для внутривенного введения (n=17)	1:8 (1:4 – 1:32)	1:8 (1:2 – 1:16)	1:2 (менее 1:2–1:4)
Раствор для инфузий (n=20)	1:8 (1:2 – 1:32)	1:8 (1:2 – 1:16)	1:2 (менее 1:2–1:4)

Примечание - указаны Мо титра антиэритроцитарных антител и диапазон значений при p=0,95

Результаты исследований были использованы при разработке ОФС.1.8.2.0005.15 «Определение анти-A и анти-B гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека»; ОФС.1.8.2.0004.15 «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека» и проекта ОФС «Определение анти-A и анти-B гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека».

4.3. Разработка унифицированных методик оценки содержания активатора прекалликреина

С целью методического обеспечения определения содержания АПК в ЛП ИГЧ и АЧ нами на основе хромогенного метода, описанного в ЕФ, разработаны методики (кинетический тест и тест по конечной точке с использованием стоп-реагента), которые унифицированы по биологическому реагенту ПК разных производителей.

В основе метода определения содержания АПК находится взаимодействие АПК и ПК, количественное соотношение которых должно обеспечивать образование

калликреина в объеме, эквивалентном содержанию АПК в образце. Девятикратное увеличение количества прекалликреина по отношению к образцу, содержащему не более 35 МЕ/мл АПК, соответствует этому требованию. С целью унификации разрабатываемых методик, нами обоснован критерий приемлемости применения реагента ПК при оптимальной продолжительности инкубирования реакционной смеси образца и ПК: прекалликреиновая активность, соответствующая $\Delta A/10$ мин от 0,2 до 0,6 оптических единиц при использовании АПК с активностью 32 МЕ/мл. ПК производства Sekisui Diagnostics GmbH; Enzyme Research Laboratories и Calbiochem, EDM Millipore Corporation восстанавливали в воде очищенной до содержания 1,0 мг/мл (на основании данных сертификата анализа о содержании белка ПК), далее готовили разведения в 10, 100, 200 и 500 раз. Оптимальная прекалликреиновая активность указанных реагентов, равная $\Delta A/10$ мин 0,34; 0,37 и 0,54 оптических единиц (соответственно), при инкубировании реакционной смеси в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °С была выявлена при использовании ПК в разведении с расчетным содержанием 0,01 мг/мл белка. Реагенты ПК производства Coachrom Diagnostica, Nurphen и ООО фирма «Технология-Стандарт» после восстановления в соответствии с указаниями производителя при тех же условиях инкубирования проявляли $\Delta A/10$ мин - 0,20; 0,21 и 0,40 оптических единиц, соответственно.

Адекватность использования хромогенного субстрата в концентрации 2 мМ в количестве, равном объему реакционной смеси, подтвердили величиной $\Delta A/10$ мин, равной от 0,2 до 0,6 оптических единиц в условиях инкубирования в течение 30 мин при температуре 37 ± 1 °С. С целью исключения ошибок, связанных с изменением ионной силы и значением рН инкубационной смеси, использовали соотношение испытуемого образца и ПК 1:9. Для оптимизации времени инкубирования смеси испытуемого образца с ПК проведена серия экспериментов, позволившая установить, что выдерживание при температуре 37 ± 1 °С в течение 30 мин позволяет получать $\Delta A/10$ мин в диапазоне значений от 0,2 до 0,6 оптических единиц вне зависимости от производителя реагента ПК. Установлено оптимальное время расщепления хромогенного субстрата до внесения стоп-реагента, составляющее 15 мин.

Сопоставимость методик, применяемых зарубежными производителями, и разработанных нами подтвердили отсутствием статистически значимых различий при изучении содержания АПК в ЛП ИГЧ и АЧ зарубежного производства (таблица 8). Подготовка ПК соответствовали методикам, диапазон калибровочной кривой – указаниям в нормативной документации.

Таблица 8 – Содержание активатора прекалликреина в препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека зарубежного производства

Группировочное наименование/страна производства	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл, $\bar{x} \pm S_x$		t-критерий Стьюдента ⁵
	методика фирмы	разработанная методика	
АЧ/США	2,4±0,6 ²	2,6±0,3 ²	0,30
АЧ/Швейцария	4,2±0,2 ¹	3,4±0,6 ¹	1,26
АЧ/Италия	6,4±0,4 ¹	5,7±0,2 ¹	1,57
ИГЧ/Германия	2,0±0,3 ¹	2,3±0,6 ¹	0,45
ИГЧ/Италия ³	Менее 5 ²	Менее 5 ²	Отсутствует
ИГЧ/США	5,4±0,6 ²	5,2±0,4 ²	0,28
ИГЧ/Китай ⁴	Менее 10 ²	Менее 10 ²	Отсутствует
ИГЧ/Китай ⁴	Менее 10 ²	Менее 10 ²	Отсутствует

Примечания.
 1 - Хромогенный кинетический тест.
 2 - Хромогенный тест по конечной точке.
 3 - Диапазон калибровочного графика от 5 до 20 МЕ/мл.
 4 - Диапазон калибровочного графика от 1 до 5 МЕ/мл, используется разведение образца 1:10.
 5 - Теоретическое значение t-критерия Стьюдента составило 2,776 при p=0,95 (n=3).

Разработанными методиками нами было изучено содержание АПК в ЛП ИГЧ и АЧ отечественного производства (таблица 9). Полученные результаты свидетельствовали о применимости методик для оценки качества изучаемых препаратов в допустимом диапазоне – не более 35 МЕ/мл.

Таблица 9 – Содержание активатора прекалликреина в препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека отечественного производства

Наименование препарата (производитель)	Содержание активатора прекалликреина ¹ , МЕ/мл, \bar{x}	
Альбумин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Уфа)	5,3 ²	5,8 ³
Альбумин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Пермь)	1,1 ²	1,9 ³
Альбумин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Томск)	4,7 ²	4,7 ³
Альбумин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Н.Новгород)	Менее 1 ²	Менее 1 ³
Альбумин (ГБУЗ «СПК Калининградской области»)	Менее 1 ²	Менее 1 ³
Альбумин (ГУЗ СО «СПК № 2 «САНГВИС»)	9,1 ²	15,4 ³
Иммуновенин (ФГУП «НПО «Микроген»)	Менее 1 ²	Менее 1 ³
Имбиоглобулин (ФГУП «НПО «Микроген»)	Менее 1 ²	Менее 1 ³

Примечания.
 1 - Диапазон калибровочного графика от 1 до 35 МЕ/мл.
 2 - Хромогенный кинетический тест.
 3 - Хромогенный тест по конечной точке.
 4 – Представлено среднее значение 5 определений при p=0,95

Результаты исследований были использованы при разработке ОФС.1.8.2.0013.18 «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека».

5. Валидация методик оценки специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека

Рассматриваемые методики контроля качества ЛП по показателям специфической безопасности основаны на биологических эффектах, при этом альтернативные количественные методы оценки содержания примесей отсутствуют или неприменимы в рутинных испытаниях при контроле качества. Методики на основе методов гемагглютинации являются полуколичественными, в связи с чем предел их обнаружения зависит от кратности разведения испытуемого образца, а показатели прецизионности не могут быть установлены общепринятыми методами. На примере методов определения содержания антиэритроцитарных антител нами был обоснован алгоритм разработки программы валидации методик НГА и ПГА (Рисунок 9).

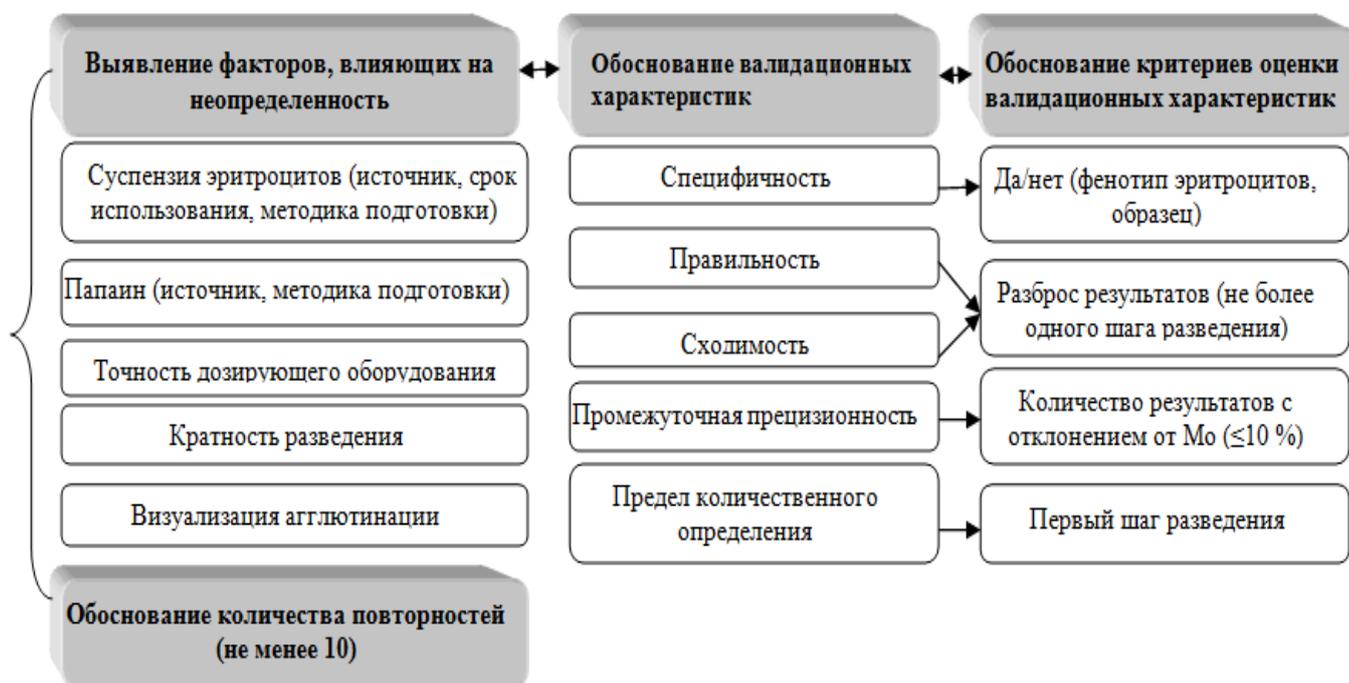


Рисунок 9 - Алгоритм разработки программы валидации методик, основанных на методах гемагглютинации

Определение валидационных характеристик предполагает использование образцов с известным содержанием определяемого вещества. Использование международных или фармакопейных (ЕФ) СО содержания ГА для валидации разработанной нами методики НГА невозможно, так как они рекомендованы для метода ПГА, поэтому нами использованы образцы, представляющие собой растворы ИГЧ с предельно допустимым количеством ГА в титре 1:64 и не содержащий ГА. Для валидации методик определения содержания анти-D антител использованы международные СО. Результаты валидации методик определения антиэритроцитарных антител, представленные в таблице 10, подтверждают приемлемость алгоритма для

разработки программы валидации и пригодность разработанных методик для контроля качества ЛП ИГЧ по соответствующим показателям специфической безопасности.

Таблица 10 – Валидационные характеристики разработанных методик оценки содержания антиэритроцитарных антител

Показатель качества	Наименование метода	Валидационные характеристики			
		Специфичность	Правильность	Прецизионность	Сходимость
Анти-А и анти-В гемагглютинины	ПГА «на плоскости»	+	105 %	5 %	1 шаг разведения
	НГА «на плоскости»	+	110 %	5 %	1 шаг разведения
	НГА гелевая технология	+	100 %	3 %	1 шаг разведения
Анти-D антитела	ПГА «на плоскости»	+	105 %	5 %	1 шаг разведения
	ПГА гелевая технология	+	100 %	0	Разброс результатов отсутствует

Нами установлено, что алгоритм разработки программы валидации методик определения АКА и содержания АПК должен учитывать факторы, влияющие на неопределенность, а также группировочное наименование ЛП, для анализа которого методика используется. Алгоритм разработки программы валидации метода контроля качества ЛП ИГЧ по АКА должен включать структурные элементы, представленные на рисунке 10.

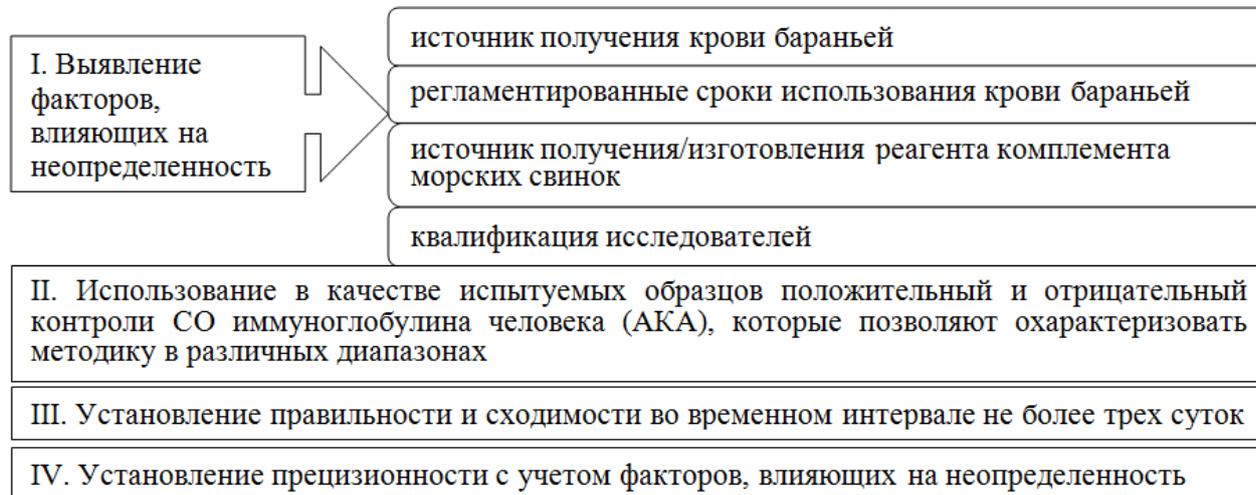


Рисунок 10 - Алгоритм разработки программы валидации метода контроля качества препаратов иммуноглобулинов человека по антикомплементарной активности

Предел количественного определения, специфичность и линейность обусловлены методическими особенностями проведения РСК и не требуют подтверждения общепринятыми методами. Установлено, что внутрилабораторная прецизионность с применением различных реагентов эритроцитов барана на 7, 14 и 21 сутки их использования соответствует 10 % для отрицательного контроля, 3 % для положительного контроля, по фактору операторы прецизионность составляет менее

14 % для обоих контролей, сходимость соответствует коэффициенту вариации, не превышающему 2 % и 4 % для положительного и отрицательного контролей соответственно. Правильность методики подтверждена получением значений АКА контролей в пределах аттестованных значений от 17,1 до 23,5 % для отрицательного контроля и от 79,1 до 88,5 % для положительного контроля.

Алгоритм разработки программы валидации метода контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ по содержанию АПК должен включать структурные элементы, представленные на рисунке 11.

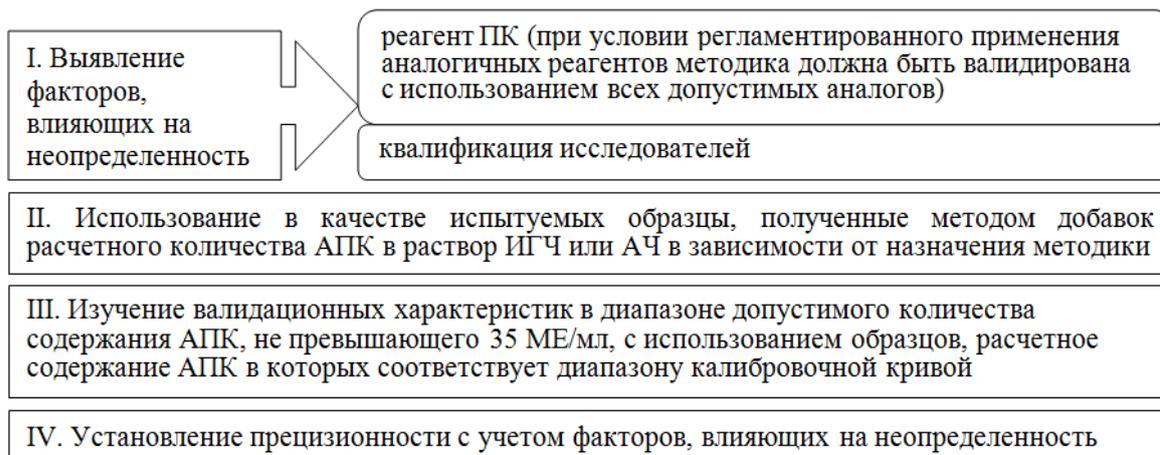


Рисунок 11 - Алгоритм разработки программы валидации метода контроля качества препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по содержанию активатора прекаликреина

Валидационные характеристики разработанных нами методик определения АПК с использованием всех доступных реагентов ПК подтвердили их соответствие критериям приемлемости. Линейность с коэффициентом корреляции, равным более 0,99 показана в диапазоне от 0 до 35 МЕ/мл (Рисунок 12).

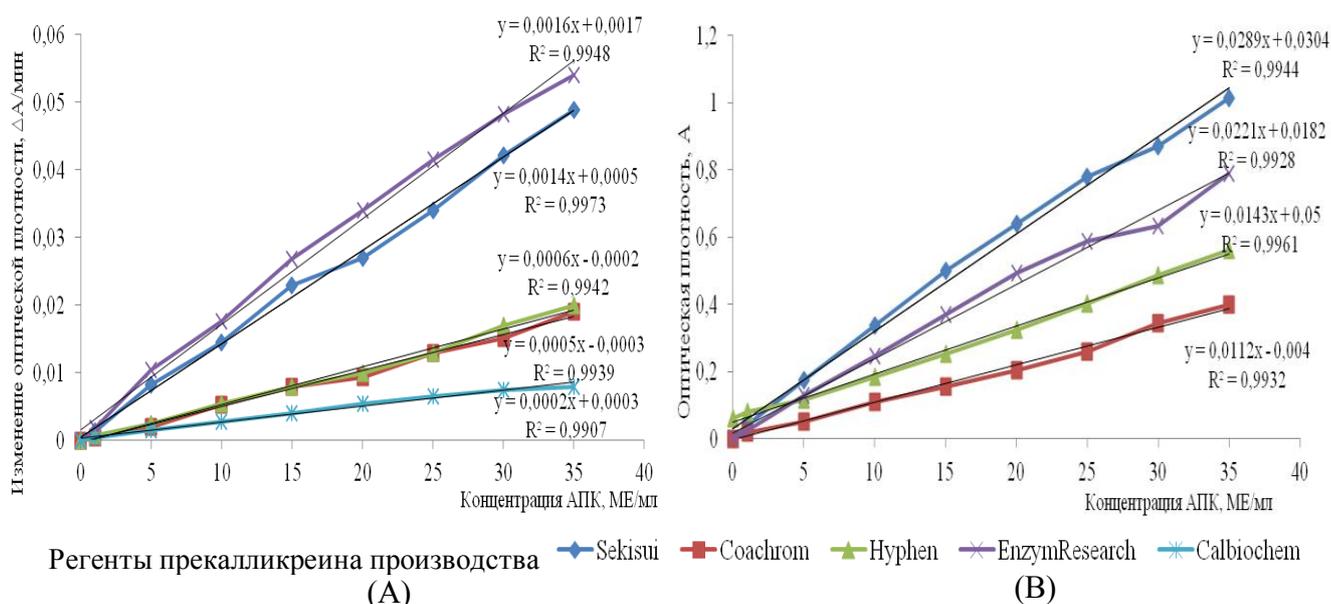


Рисунок 12 – Зависимость изменения оптической плотности/оптической плотности от концентрации активатора прекаликреина (А) - в кинетическом тесте, (В) – в тесте по конечной точке

Степень извлечения в диапазоне от 94,4 до 111,8 % при использовании методик с кинетическим измерением и по конечной точке подтверждает их правильность. Внутрिलाбораторная прецизионность по фактору реагента ПК составила для образцов альбумина человека с расчетным содержанием 10 МЕ/мл – 8,6 %, с содержанием 20 МЕ/мл – 5,6 %, с содержанием 30 МЕ/мл – 4,6 % (без учета содержания белка), для образцов иммуноглобулина человека с расчетным содержанием 10 МЕ/мл – 5,3 %, с содержанием 20 МЕ/мл – 2,6 %, с содержанием 30 МЕ/мл – 2,8 %, что соответствует критерию приемлемости для методик анализа биологических препаратов – не более 15 %. Внутрिलाбораторная прецизионность для образцов АЧ и ИГЧ с расчетным содержанием 1 МЕ/мл составила 13,7 %. При использовании реагента ПК одного производителя внутрिलाбораторная прецизионность не превышает 2 %, сходимость при этом соответствует коэффициенту вариации, не превышающему 5 %.

Таким образом, обоснованная методология валидации методик оценки показателей специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ позволила разработать программы и провести в соответствии с ними валидационные исследования разработанных методик.

6. Исследования по стандартизации препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности

6.1. Разработка стандартного образца Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)

При разработке СО Иммуноглобулина человека (АКА) использовали принцип максимального приближения к содержанию в его составе примесей, характеризующих уровень АКА ЛП ИГЧ. Нами экспериментально обоснованы:

- ✓ комплектность СО (набор, включающий положительный и отрицательные контроли, готовые к применению в методике определения АКА без дополнительной пробоподготовки, используемые в одинаковом количестве при формировании контрольных проб (по 0,1 мл);
- ✓ критерии выбора кандидата в СО (исходная АКА ЛП ИГЧ, не превышающая 50 %);
- ✓ способ получения положительного контроля (термическая обработка раствора ИГЧ в первичной упаковке при температуре (56 ± 1) °С в течение времени, необходимого для достижения уровня АКА в диапазоне 60 - 90 %).

Программа аттестации серии СО Иммуноглобулина человека (АКА) предусматривала получение результатов АКА в условиях промежуточной

прецизионности в одной лаборатории двумя исследователям с использованием различных серий реагентов крови бараньей в течение 14 дней при одновременном использовании СО Иммуноглобулина человека ВРР. Дополнительно СО охарактеризован по содержанию белка. Были изготовлены и аттестованы 4 серии СО Иммуноглобулина человека (АКА) (ОСО 42-28-430) (таблица 11).

Таблица 11 - Антикомплементарная активность и содержание белка в компонентах стандартного образца Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)

№ серии	Антикомплементарная активность, $\bar{X} \pm 2S_x$, % (p= 0,95)		Содержание белка, $\bar{X} \pm 2S_x$, мг/мл (p= 0,95)
	Отрицательный контроль	Положительный контроль	
1	41,5±3,6	78,2±4,6	102,0±1,8
2	40,5±7,2	76,6±6,2	103,1±3,6
	41,6±7,2*	75,7±6,8*	
3	38,7±9,0	69,9±9,6	98,4±3,3
4	30,3±12,2	72,6±7,6	96,0±1,3
Примечание - * - результаты аттестации при продлении срока годности			

Установленная неопределенность СО составила не более 10 %, что свидетельствует о высокой стабильности аттестованной характеристики.

Стабильность СО установлена методом естественного старения при температуре 5±3°C; срок годности СО, составил 24 месяца. Результаты исследований позволили получить патент на изобретение RU 2577703, приоритет от 09.02.2015.

6.2. Разработка стандартного образца «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов»

Используемая нами методология разработки СО содержания ГА основана на принципах соответствия его состава качественным и количественным характеристикам примесей ГА в ЛП ИГЧ, унификации по методам контроля, а также достижения целей применения – установление соответствия критериям приемлемости результатов контроля качества ЛП и оценка количественного содержания ГА в ЛП ИГЧ (Рисунок 13). Стратегия разработки фармакопейного и международного СО неприменима, так как входящие в их состав мышинные моноклональные антитела к групповым антигенам эритроцитов А и В не могут быть выявлены в реакции НГА. На первом этапе исследований была получена серия ОСО 42–28–431–2014 «Стандартный образец иммуноглобулина человека содержания анти-А и анти-В антител», представляющая собой раствор ИГЧ с содержанием анти-А ГА в титре 1:512 – 1:256; анти-В ГА – в титре 1:256.



Рисунок 13 Алгоритм разработки стандартного образца для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов

С целью мониторинга стабильности указанный СО хранили при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, что позволило установить его срок хранения – 5 лет (срок наблюдения). В дальнейших исследованиях был разработан ОСО 42-28-439 СО «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов» состав которого оптимизирован в соответствии с назначением:

- положительные компоненты А и В с целевым значением содержания анти-А и анти-В ГА в титре 1:16–1:32 используют для оценки стабильности аналитической работы;
- отрицательный компонент, не содержащий ГА, позволяет подтвердить специфичность реакции агглютинации;
- компоненты с лимитом содержания анти-А и анти-В ГА в титре 1:64 соответствуют пределу допустимого содержания этих примесей в ЛП ИГЧ.

Программа аттестации СО предусматривала использование методик ПГА и НГА «на плоскости», гелевую технологию с соблюдением кратности разведений образцов 1:2, а также для более точного установления количественного содержания ГА в компонентах с лимитом содержания – кратность разведения 1:1,2 (таблица 12). Дополнительно каждый компонент был охарактеризован по содержанию белка. Положительные и отрицательный компоненты СО обязательны к применению при каждом испытании.

Таблица 12 – Содержание гемагглютининов и белка в компонентах СО «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов»

Наименование компонента СО	Содержание ГА..., определенное методом..., Мо/диапазон значений (при наличии)				Содержание белка, мг/мл, $\bar{x} \pm 2S_x$
	анти-А		анти-В		
	НГА	ПГА	НГА	ПГА	
Положительный А	1:32	1:16/ 1:16 – 1:32	Определение не требуется		51,0±3,0 50,1±1,6 ¹
Положительный В	Определение не требуется		1:16/ 1:16 – 1:32	1:16	52,0±3,0 52,0±0,8 ¹
Отрицательный	Менее 1:2	Менее 1:2	Менее 1:2	Менее 1:2	56,0±1,0 50,4±0,2 ¹
Лимит содержания анти-А ГА	1:64/ 1:62 – 1:64	1:64	Определение не требуется		52,0±3,0 50,2±1,2 ¹
Лимит содержания анти-В ГА	Определение не требуется		1:64/ 1:64 – 1:68	1:64	51,0±4,0 50,1±0,6 ¹
Примечания. 1 – При продлении срока годности. 2 – Доверительная вероятность 0,95					

В случае выявления содержания ГА в образце ЛП ИГЧ в титре 1:32 и более, проводят еще одно испытание с использованием дополнительно компонентов с лимитом содержания ГА. Титр ГА в испытуемом образце не должен превышать таковой в компонентах СО лимита содержания анти-А и анти-В ГА.

В целях оптимизации применения СО сформированы наборы в различной комплектации:

- ОСО 42-28-439, содержащий пять ампул:
 - 1 ампула 3,0 мл – отрицательный компонент;
 - 1 ампула 3,0 мл – положительный компонент А;
 - 1 ампула 3,0 мл – положительный компонент В;
 - 1 ампула 3,0 мл – компонент лимит содержания анти-А гемагглютининов;
 - 1 ампула 3,0 мл – компонент лимит содержания анти-В гемагглютининов.
- ОСО 42-28-439А, содержащий 3 ампулы:
 - 1 ампула 3,0 мл – отрицательный компонент;
 - 1 ампула 3,0 мл – положительный компонент А;
 - 1 ампула 3,0 мл – положительный компонент В.

Стабильность СО определяли методом естественного старения в течение двух лет (срок наблюдения) при температуре 5±3 °С. Срок годности ОСО 42-28-439 установлен 24 месяца с возможностью продления еще на 18 месяцев на основании подтверждения стабильности аттестованной характеристики ОСО 42–28–431–2014 в течение 5 лет (срок наблюдения).

Результаты исследований позволили получить патент на изобретение RU 2671415 С1, приоритет от 05.06.2017.

6.3. Разработка стандартного образца «Набор для определения содержания анти-D антител»

СО «Набор для определения содержания анти-D антител» (СО 42-28-440) включает в себя два компонента: отрицательный, представляющий собой раствор ИГЧ, полученный из плазмы крови Rh(+) доноров IV(AB) группы, и положительный – раствор иммуноглобулина человека, полученный из плазмы крови Rh(-) доноров IV(AB) группы. Разработанная программа предусматривала проведение аттестации СО с использованием метода ПГА «на плоскости», гелевой технологии в соответствии с методиками, регламентированными для контроля качества ЛП ИГЧ, а также методом проточной цитофлюориметрии.

Расчетный диапазон антирезусной активности положительного компонента СО в соответствии с международными требованиями не должен превышать 0,0475 МЕ/мл, следовательно для аттестации СО возможно использование валидированных инструментальных методов, обеспечивающих получение адекватных результатов в диапазоне менее 0,1 МЕ/мл. С этой целью нами были разработаны методики оценки антирезусной активности в компонентах СО методом проточной цитофлюориметрии и методом ПГА с использованием международного СО антирезусного иммуноглобулина. Проведенные валидационные исследования позволили установить соответствие методик установленным критериям по параметрам линейности, специфичности, правильности, внутрिलाбораторной прецизионности (таблица 13).

Таблица 13 – Валидационные характеристики методик оценки антирезусной активности СО «Набор для определения содержания анти-D антител»

Наименование метода	Валидационные характеристики			
	Специфичность	Линейность, (уравнение прямой, R^2 , диапазон линейности)	Правильность	Прецизионность
ПГА «на плоскости»	да	Не применимо	85-115%	15 %
ПГА гелевая технология	да	Не применимо	90-115%	12 %
Проточная цито-флюориметрия	да	$y=8,8141x+0,0725$; $R^2=0,9977$; 0,006 – 0,095 МЕ/мл	90-110 %	14%

Аттестованные значения содержания анти-D антител, антирезусной активности и содержания белка позволяют использовать разработанный СО для оценки качества ЛП ИГЧ по показателю «Анти-D антитела» (таблица 14).

Таблица 14 – Значения аттестуемых характеристик в компонентах СО «Набор для определения содержания анти-D антител»

Наименование компонента СО	Содержание анти-D антител, определенное методом ПГА..., Мо/диапазон значений	Содержание белка, мг/мл, $\bar{x} \pm 2S_x$	Антирезусная активность, МЕ/мл, $\bar{x} \pm 2S_x$	
			Проточная цитофлуориметрия	ПГА
Положительный	1:8/1:4 – 1:8 ¹	50,0±1,0	0,230±0,040	0,062± 0,009 ^{1:3}
	1:8/1:8 – 1:8 ²	50,0±0,1 ³	0,027± 0,004 ³	0,055± 0,006 ^{2:3}
Отрицательный	Менее 1:2 ¹ Менее 1:2 ²	54,0±3,0 54,0±1,4 ³	Менее 0,006	Не выявляется
Примечания. 1 – методика «на плоскости» 2 – гелевая технология 3 – при продлении срока годности 4 - доверительная вероятность 0,95				

Критерием соответствия качества положительного компонента СО по антирезусной активности считали значение, не превышающее такое для положительного СО ЕФ. Стабильность СО определяли методом естественного старения в течение двух лет (срок наблюдения) при температуре 5±3 °С. Проведенные исследования по подтверждению аттестованной характеристики позволили установить срок годности ОСО 42-28-440 - 24 месяца с возможностью продления срока годности еще на 18 месяцев.

В результате исследований был получен патент на изобретение RU 2682714 C1, приоритет от 18.12.2017.

6.4. Разработка стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина»

В исследованиях по стандартизации методик определения содержания АПК нами был обоснован состав СО в виде набора, включающего компонент с содержанием АПК не менее 35 МЕ/мл, который предназначен для построения калибровочного графика в методике определения примеси АПК (компонент для оценки содержания АПК), и контроль, предназначенный для оценки стабильности аналитической работы. Экспериментально изученное содержание АПК в ЛП ИГЧ и АЧ отечественных производителей, не превышающее 10 МЕ/мл, обусловило необходимость обоснования алгоритма разработки СО (Рисунок 14).

Для разработки СО содержания АПК в качестве кандидата в компонент контроля был использован образец ЛП Альбумин человека (раствор для инфузий, 20 %, производства ГУЗ «Липецкая областная станция переливания крови») с установленным содержанием АПК 10 МЕ/мл. Этот же образец с добавлением 18,5 нг/мл реагента Human Coagulation Factor XIIa применяли в качестве кандидата в компонент для оценки содержания АПК.

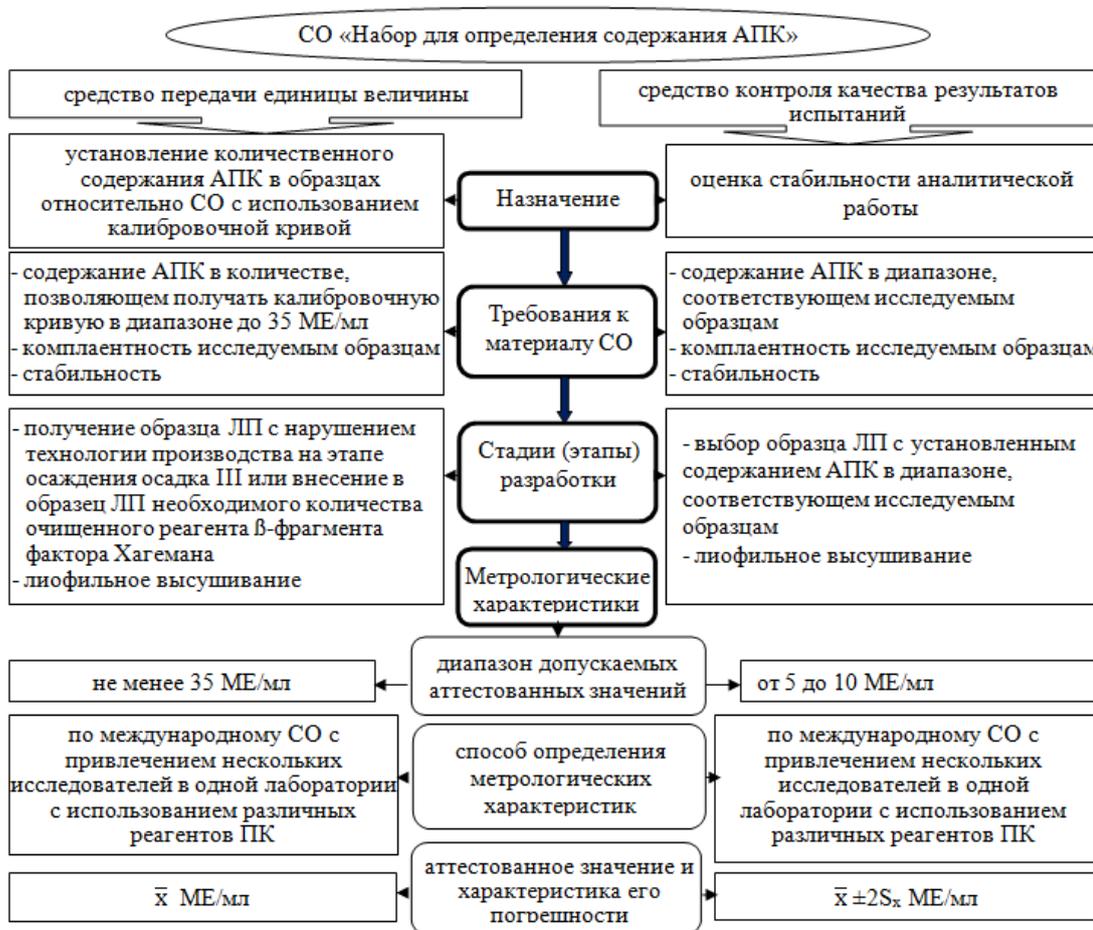


Рисунок 14 - Алгоритм разработки СО для определения содержания АПК

Образцы после розлива по 1,0 мл в ампулы подвергали замораживанию при температуре минус 70 °С и лиофильному высушиванию на установке Usifroid. Аттестацию СО осуществляли разработанными методиками определения содержания АПК с использованием всех доступных реагентов ПК и международного СО содержания АПК в альбумине. Учитывая отсутствие на российском рынке зарегистрированного отечественного реагента ПК, нами был разработан СО для определения содержания АПК в комплекте с ПК, изготовленным ООО фирма «Технология-Стандарт». Аттестацию СО в этой комплектации проводили с реагентом ПК, входящим в комплект.

Содержание АПК вычисляли с использованием методов построения калибровочной кривой (линейная зависимость скорости изменения оптической плотности в мин / оптической плотности от концентрации АПК) и параллельных шкал при доверительной вероятности 0,95 (таблица 15).

Результаты сравнительной оценки позволили сделать вывод об отсутствии статистически значимых различий линий регрессии для международного СО содержания АПК в альбумине и компонента для оценки содержания АПК разработанного нами СО (в обеих комплектациях).

Таблица 15- Содержание активатора прекалликреина в компонентах стандартных образцов для определения содержания активатора прекалликреина

Наименование компонента	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$, МЕ/мл			Коэффициент вариации, процент
	Кинетический тест	Тест по конечной точке	Среднее значение	
СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (ОСО 42-28-445)				
Для оценки содержания АПК	50,9 \pm 0,7	51,0 \pm 1,4	51,0 \pm 1,6	3,1
Контроль содержания АПК (при восстановлении в 1,0 мл)	10,1 \pm 0,9	10,1 \pm 0,8	10,1 \pm 0,9	8,5
Контроль содержания АПК (при восстановлении в 2,0 мл)	6,0 \pm 0,3	6,0 \pm 0,2	6,0 \pm 0,3	4,2
СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином) (ОСО 42-28-446)				
Для оценки содержания АПК	50,9 \pm 0,9	51,0 \pm 1,0	51,0 \pm 0,9	1,9
Контроль содержания АПК (при восстановлении в 1,0 мл)	10,2 \pm 0,4	10,1 \pm 0,6	10,1 \pm 0,5	5,0
Контроль содержания АПК (при восстановлении в 2,0 мл)	6,0 \pm 0,2	6,0 \pm 0,1	6,0 \pm 0,2	2,7

Стабильность СО определяли методом естественного старения при температуре не выше минус 20 °С. Полученные результаты позволили установить срок годности СО, составивший 12 месяцев (срок наблюдения).

7. Исследования по унификации порядка обеспечения воспроизводимости результатов испытаний ЛП ИГЧ и АЧ по показателям специфической безопасности

В соответствии с ГОСТ ISO/IEC 17025-2019, важнейшей концепцией обеспечения сопоставимости результатов измерений на национальном и международном уровнях, является метрологическая прослеживаемость. Сложность в обеспечении прослеживаемости результатов испытаний ЛП ИГЧ и АЧ по показателям специфической безопасности обусловлена: биологической природой используемых реагентов; невозможностью стандартизации этих реагентов по всем критическим параметрам; отсутствием количественной оценки в единицах СИ, имеющих эталоны; визуальным определением измеряемой величины (например, агглютинации). Особое значение при этом имеет наличие стандартизованных методик определения и аттестованных СО с указанной метрологической прослеживаемостью (Рисунок 15).

Для методик, основанных на биологических эффектах, отсутствуют регламентированные указания о порядке проведения оценки стабильности аналитической работы, что связано со сложностью унификации требований к ним и выбора средства контроля. Нами доказана целесообразность использования разработанных СО в качестве средства контроля при оценке качества испытаний исследуемых препаратов по показателям специфической безопасности. Применение

этих СО, в совокупности с контрольными картами (например, картами Шухарта), позволяет оценивать воспроизводимость результатов, а также выявлять причины изменений и оперативно их устранять.

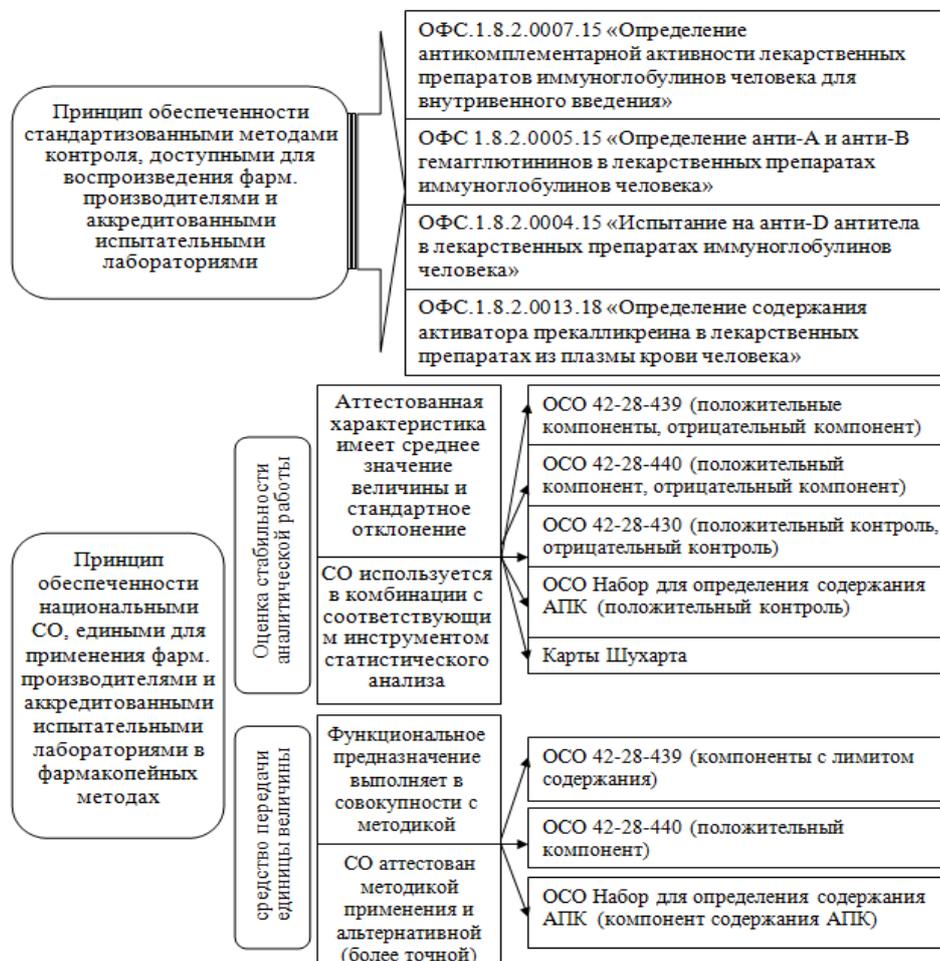


Рисунок 15 – Принципы обеспечения воспроизводимости результатов испытаний препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по показателям специфической безопасности

В специализированной лаборатории ИЦЭК МИБП нами внедрена система оперативного контроля за процессом испытаний с использованием СО «Иммуноглобулина человека (АКА)» (ОСО 42-28-430) и карт Шухарта (Рисунок 16). Так как указанный СО имеет аттестованные значения АКА, выраженные в виде среднего значения и стандартного отклонения с доверительной вероятностью 0,95, статистический анализ результатов испытаний позволяет оценивать их по отношению к верхней и нижней границам поля допуска ($\pm 2Sx$) для подтверждения управляемости процесса, а также к верхней и нижней контрольным границам ($\pm 3Sx$) выявления испытаний с несоответствующими критериям приемлемости результатам. Анализ графиков с учетом используемых наименований и серий биологических реагентов позволяет сделать вывод об отсутствии или наличии трендов, связанных с их влиянием на воспроизводимость результатов анализа.

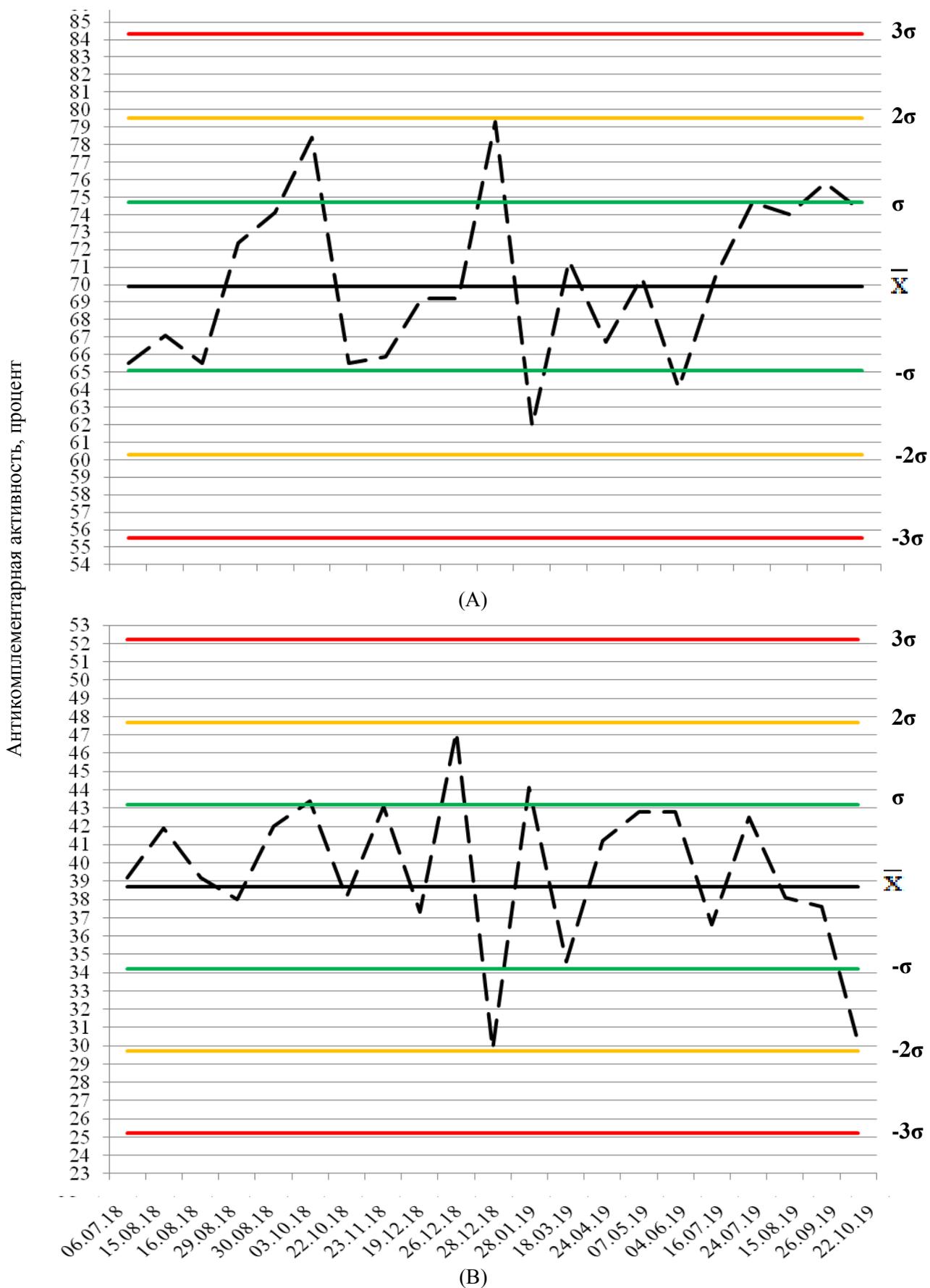


Рисунок 16 – Контрольная карта для оценки стабильности аналитической работы в испытаниях по показателю «Антикомплементарная активность» с использованием (А) - положительного компонента, (В) – отрицательного компонента СО 42-28-430-2018.

Для внутрилабораторного контроля качества результатов анализа по содержанию антиэритроцитарных антител могут быть использованы соответствующие положительные компоненты разработанных нами СО. Один двукратный шаг разведения, не превышающий аттестованного значения, является допустимым критерием воспроизводимости результатов испытаний. Оценка стабильности аналитической работы для испытаний по содержанию АПК может осуществляться с использованием компонента контроля разработанного нами СО, который имеет аттестованную характеристику в виде среднего значения и стандартного отклонения ($\pm 2Sx$) с доверительной вероятностью 0,95. Принципы оценки контрольных карт с получаемыми результатами аналогичны испытаниям по определению антикомплементарной активности.

8. Разработка методологии экспертной оценки специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека

Методология экспертизы специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ складывается из научно-обоснованных принципов и критериев экспертной оценки, распространяющихся на следующие составляющие экспертизы (в соответствии с Федеральным законом N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»):

- экспертиза документов и данных, касающихся фармацевтических аспектов разработки ЛП (обоснование выбора фармацевтической субстанции, вспомогательных веществ, лекарственной формы, технологии производства лекарственного препарата);
- экспертиза документов и данных, описывающих технологический процесс производства ЛП, включая контроль исходного сырья, критических стадий производства и промежуточных продуктов;
- экспертиза методов контроля качества ЛП и их воспроизводимость;
- экспертиза материалов по валидации аналитических методов контроля качества ЛП.

Нами обоснованы принципы экспертной оценки специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ:

- 1) принцип презумпции потенциальной специфической опасности (допущение того факта, что все препараты крови человека обуславливают развитие НР, связанных с влиянием на системы гемостаза, комплемента, калликреин-кининовую систему и эритроцитарное звено гомеостаза);
- 2) принцип обязательности и адекватности контроля специфической безопасности в соответствии с групповой принадлежностью препарата;

- 3) принцип комплексности экспертной оценки (оценка технологических аспектов разработки и контроля качества готовой лекарственной формы с точки зрения обеспечения специфической безопасности ЛП);
- 4) принцип научной обоснованности и объективности оценки специфической безопасности ЛП крови, включающий анализ значений показателей специфической безопасности с позиций обоснованности использования фармакопейных или собственных методик, наличия материалов по верификации фармакопейных методик или валидации собственных методик, использования СО;
- 5) принцип соблюдения баланса между уровнем специфической безопасности ЛП крови человека и их терапевтической активностью;
- 6) принцип законности заключения о специфической безопасности ЛП крови человека с учетом современных законодательных актов, государственных стандартов, научных разработок и международного опыта их производства, контроля качества и применения.

Критерии экспертной оценки специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ зависят от групповой принадлежности препарата, способа его применения и соответствуют значениям показателей качества по содержанию ГА, анти-D антител, АКА и АПК, а также уровню тромбогенного потенциала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования. В результате теоретических исследований обосновано понятие специфической безопасности ЛП крови человека как фактора, характеризующего риски причинения вреда здоровью при их применении, обусловленные влиянием на системы гемостаза и комплемента, калликреин-кининовую систему и эритроцитарное звено системы гомеостаза.

Выявлено, что проблема обеспечения специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ связана с особенностями состава исходного сырья (ПКЧ) и технологическими возможностями выделения целевых белков (иммуноглобулинов различной специфичности или альбумина) при сохранении остаточного количества других плазменных белков, нежелательное действие которых проявляется активацией калликреин-кининовой и плазминовой систем, систем свертывания крови и комплемента, а также нарушениями эритроцитарного звена системы гомеостаза.

Разработаны и валидированы унифицированные методики оценки АКА, содержания анти-А и анти-В ГА, анти-D антител, АПК в ЛП ИГЧ и АЧ. Разработаны и внедрены в практическую деятельность СО иммуноглобулина человека (АКА), содержания анти-А и анти-В ГА, анти-D антител, разработан СО содержания АПК.

Обоснована методология изучения тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ. Обоснован и экспериментально подтвержден порядок обеспечения воспроизводимости результатов контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ по показателям специфической безопасности.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. В результате проведенных исследований установлено, что разработанные стандартизованные методики контроля качества могут быть использованы как производителями ЛП ИГЧ и АЧ, так и испытательными лабораториями при подтверждении соответствия требованиям нормативной документации. Методические основы изучения тромбогенного потенциала ИГЧ могут быть использованы в программах доклинического исследования соответствующих ЛП. Разработанная нами методология валидации иммунобиологических методов может быть использована для разработки методических рекомендаций, применимых в работе испытательных лабораторий, предприятий по производству иммунобиологических лекарственных средств, экспертного учреждения. Разработанные методологические подходы к стандартизации и контролю качества ЛП ИГЧ и АЧ в целях обеспечения специфической безопасности может послужить основой для обоснования системного подхода к обеспечению различных аспектов качества ЛП из ПКЧ.

ВЫВОДЫ

1. Обосновано понятие специфической безопасности препаратов крови человека как фактора, характеризующего риски причинения вреда здоровью. Разработана методология обеспечения специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека, установлены приоритетные направления их стандартизации и контроля качества.

2. Гармонизированные с международными требованиями унифицированные методические основы стандартизации и контроля качества иммуноглобулинов человека по тромбогенному потенциалу и экспериментально полученные данные *in vitro* по содержанию прокоагулянтных факторов свертывания крови, не превышающему 50 мМЕ/мл, низкому эндогенному тромбиновому потенциалу и способности к генерации тромбообразования *in vivo*, позволяют охарактеризовать их по фактору риска развития тромбогенных нежелательных реакций.

3. Разработаны унифицированные методики оценки качества препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по показателям специфической безопасности «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела», «Активатор прекалликреина». Показано, что разработанные методики

позволяют оценивать качество исследуемых препаратов в соответствии с установленными требованиями специфической безопасности по уровню антикомплементарной активности – не более 1 CH_{50} /мг белка, по содержанию анти-А и анти-В гемагглютининов, не превышающему титр 1:64; анти-Д антител – не выше титра положительного стандартного образца; активатора прекалликреина – не более 35 МЕ/мл.

4. Разработан алгоритм валидации методик оценки основных показателей специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека, основанных на методах гемагглютинации, амидолитического расщепления и реакции связывания комплемента. Проведена валидация разработанных методик оценки уровня антикомплементарной активности, количественного содержания примесей антиэритроцитарных антител, активатора прекалликреина, установлены их специфичность, правильность, внутрилабораторная прецизионность и сходимость.

5. Экспериментально подобраны кандидаты в стандартные образцы содержания анти-А и анти-В гемагглютининов, анти-Д антител и активатора прекалликреина, уровня антикомплементарной активности, обеспечивающие максимальное приближение к истинному содержанию в их составе примесей, количественная характеристика которых является аттестуемым значением.

6. Разработаны и аттестованы стандартные образцы для оценки специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека: ОСО 42-28-430 «Имуноглобулина человека (антикомплементарная активность)», ОСО 42-28-439 «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов», ОСО 42-28-440 «Набор для определения содержания анти-Д антител», ОСО 42-28-445 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина», ОСО 42-28-446 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином).

7. Обоснованы и экспериментально подтверждены принципы обеспечения воспроизводимости результатов контроля качества отечественных препаратов крови по показателям специфической безопасности. Доказана эффективность применения разработанных стандартных образцов для оценки стабильности итогов лабораторных испытаний.

8. Разработаны и включены в ГФ РФ XIII и XIV изданий: ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения»; ОФС 1.8.2.0005.15

«Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека»; ОФС.1.8.2.0004.15 «Испытание на анти-Д антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека»; ОФС.1.8.2.0013.18 «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека». Разработан проект ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека» для включения в приложение ГФ РФ XIV издания.

9. Разработаны и утверждены в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России «Методические рекомендации по экспертной оценке специфической безопасности препаратов крови», обеспечивающие проведение экспертизы материалов регистрационного досье препаратов крови человека по специфической безопасности в соответствии с национальными стандартами и международными требованиями.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Корнилова, О.Г.** Стандартизация методов контроля специфической безопасности препаратов иммуноглобулина человека для внутривенного введения / **О.Г. Корнилова, Э.Ю. Кудашева** // **Российский иммунологический журнал**. – 2013. – Т.7(16), № 2-3. – С. 153.

2. Кривых, М.А. Разработка стандартного образца для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян** [и др.] // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2015. – Т. 49, № 6. – С. 40-42.

3. Кривых, М.А. Разработка положительного контроля стандартного образца для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян** // **Медицинская иммунология**. – 2015. – Т. 17, № 3S – С. 270.

4. Кривых, М.А. Стандартизация методики определения антикомплементарной активности – гарант специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян** // в сб. Российской научно-практической конференции «Актуальные вопросы повышения качества последипломной подготовки фармацевтических кадров». – 2015. – С. 59-61.

5. **Корнилова, О.Г.** Гармонизация требований к специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека с мировыми стандартами качества / **О.Г. Корнилова, М.А. Кривых, Э.Ю. Кудашева** [и др.] // **Фармация**. – 2015. – Т. 64, № 2. – С. 43-46.

6. Кривых, М.А. Оптимизация условий определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян, Э.Ю. Кудашева** // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2015 – Т. 49, № 7. – С. 39-42.

7. Кривых, М.А. Достоверность значений антикомплементарной активности – гарантия специфической безопасности иммуноглобулинотерапии / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян** // в сб. Материалы Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Достижения современной фармакологической науки». – 2015. – С.166-169.

8. Кривых, М.А. Разработка фармакопейной методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян, Э.Ю. Кудашева** // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2016. – Т. 50, № 5. – С. 47-49.

9. Кривых, М.А. Методология оценки содержания активатора прекалликреина в препаратах крови человека / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова** // **Российский иммунологический журнал.** – 2016. – Т.10 (19), № 2(1). – С. 447-449.
10. **Корнилова, О.Г.** Специфическая безопасность препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения: методы и критерии оценки / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, Э.Ю. Кудашева, И.В. Борисевич // **Российский иммунологический журнал.** – 2016. – Т.10 (19), № 2(1). – С. 450-451.
11. **Корнилова, О.Г.** Современные аспекты изучения специфической безопасности иммуноглобулинов человека / **О.Г. Корнилова** / **Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.** – 2016. - № 8 (часть 4). – С. 526–530.
12. Кривых, М.А. Валидация методики определения антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова**, Н.Д. Бунятян [и др.] // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2016. – Т. 50, № 9. – С. 56-60.
13. Бунятян, Н.Д. Разработка национальных стандартов качества для определения антикомплементарной активности инфузионных препаратов иммуноглобулина человека в рамках гармонизации с международными требованиями / Н.Д. Бунятян, М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова** [и др.] // **Иммунология.** – 2016. – Т. 37, № 6. – С.337-342.
14. Кривых, М.А. Аттестация стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова**, Н.Д. Бунятян [и др.] // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2016. – Т. 50, № 12. – С. 61-64.
15. Патент № 2577703, Российская Федерация, МПК:G01N33/48 Способ получения положительного контроля стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности иммуноглобулинов человека, и стандартный образец иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова**, Э.Ю. Кудашева; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. № 2015104120/15; заявл. 09.02.2015, опубл. 20.03.2016, Бюл. № 8. 12 с.
16. **Корнилова, О.Г.** Методические подходы к экспертной оценке специфической безопасности препаратов крови человека / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, И.В. Борисевич // в сб. материалов XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов / Главный редактор Чучалин А.Г. – М.: Видокс. – 2017. – С.148.
17. **Корнилова, О.Г.** Разработка национального стандарта качества для определения активатора прекалликреина в препаратах крови человека / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, И.В. Борисевич // в сб. материалов XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов / Главный редактор Чучалин А.Г. – М.: Видокс. – 2017. – С.148-149.
18. **Корнилова, О.Г.** Количественное содержание активатора прекалликреина в отечественных лекарственных препаратах альбумина человека / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, И.В. Борисевич // **Медицинская иммунология.** – 2017. – Т.19 (специальный выпуск). – С. 271-272.
19. **Корнилова, О.Г.** Изучение тромбогенного потенциала инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека как обязательный элемент оценки безопасности иммуноглобулинотерапии / **О.Г. Корнилова**, И.В. Борисевич, Ю.В. Олефир // **Медицинская иммунология.** – 2017. – Т.19 (специальный выпуск). – С. 270-271.
20. **Корнилова, О.Г.** Изучение возможности увеличения срока годности стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, Е.А. Хуснатдинова [и др.] // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.** – 2017. – 17(2). – С.110-115.
21. **Корнилова, О.Г.** Методы гемагглютинации в оценке специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения / **О.Г. Корнилова**, Е.В. Парамонова, А.В. Нечаев [и др.] // **Медицинская иммунология.** – 2017. – Т.19, №5. – С. 513-520.

22. **Корнилова, О.Г.** Стандартизация метода определения содержания гемагглютининов в препаратах иммуноглобулинов человека в России / **О.Г. Корнилова**, А.В. Нечаев, И.В. Борисевич, Э.Ю. Кудашева // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2017. – Т. 51, № 11. – С. 57-60.
23. Кривых, М.А. Актуальные проблемы обеспечения специфической безопасности иммуноглобулинотерапии / М.А. Кривых, **О.Г. Корнилова**, Е.С. Коновалова // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2018. – Т. 81 (Приложение) – С.126.
24. **Корнилова, О.Г.** Технологические особенности обеспечения специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека / **О.Г. Корнилова**, Э.Ю. Кудашева, М.А. Кривых, И.В. Борисевич // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2018. – Т. 52, № 5. – С. 56-59.
25. **Корнилова, О.Г.** Стандартные образцы в оценке специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека: особенности разработки, аттестации и применения / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, Р.А. Волкова, И.В. Борисевич // в сб. трудов III Международная научная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Часть «Ru». Екатеринбург, Россия: ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии. – 2018. – С.87-90.
26. **Корнилова, О.Г.** Методология оценки специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека на этапах фармацевтической разработки / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, Ю.В. Олефир // в сб. тезисов Международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке», Москва, РУДН. – 2018. – С. 103-105.
27. **Патент № 2671415**, Российская Федерация, МПК G01N 33/53 (2006.01). Стандартный образец содержания анти-А и анти-В гемагглютининов в препаратах крови человека / **О.Г. Корнилова**, Э.Ю. Кудашева, А.В. Нечаев, И.В. Борисевич; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. № 2017119536; заявл. 05.06.2017; опубл. 31.10.2018, Бюл. № 31. 32 с.
28. **Корнилова, О.Г.** Разработка методики определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, Е.С. Коновалова, И.В. Борисевич // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2019. – Т. 53, № 3. – С. 53-57.
29. **Корнилова, О.Г.** Стандартные образцы в оценке специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека: особенности разработки, аттестации и применения / **О.Г. Корнилова**, М.А. Кривых, Р.А. Волкова, И.В. Борисевич // **Стандартные образцы.** – 2018. – 14(3-4).- С.33-41.
30. **Патент № 2682714**, Российская Федерация, МПК А61К 39/395 (2006.01) Стандартный образец содержания анти-Д антител в препаратах иммуноглобулинов человека / **О.Г. Корнилова**, Э.Ю. Кудашева, А.В. Нечаев, И.Н. Стручкова, И.В. Борисевич; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. № 2017144239; заявл. 18.12.2017; опубл. 21.03.2019, Бюл. № 9. 18 с.
31. **Корнилова, О.Г.** Оценка стабильности аналитической работы методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека / **О.Г. Корнилова**, Е.А. Хуснатдинова, Е.С. Коновалова, Р.А. Волкова // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.** – 2019. – 19(2). – С.118-124.
32. **Kornilova, O.G.** Reference Materials Used for Specific Safety Evaluation of Human Immunoglobulin and Human Albumin Products: Features of Development, Certification and Application / **O.G. Kornilova**, M.A. Krivykh, R.A. Volkova, I.V. Borisevich // In: Medvedevskikh S., Kremleva O., Vasil'eva I., Sobina E. (eds) Reference Materials in Measurement and Technology. Springer, Cham. – 2020. – P. 47-55.
33. **Корнилова, О.Г.** Современные требования к экспертной оценке специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека / **О.Г. Корнилова**,

Е.А. Хуснатдинова, М.А. Кривых, Ю.В. Олефир // **Российский иммунологический журнал.** – 2019. – Т.13(22), № 2. – С. 326-328.

34. **Корнилова, О.Г.** Особенности разработки и аттестации стандартного образца содержания анти-D антител в препаратах иммуноглобулинов человека / **О.Г. Корнилова, А.В. Нечаев, Е.А. Хуснатдинова** [и др.] // **Химико-фармацевтический журнал.** - 2020. – Т. 54, № 3. - С. 61-64.

35. Кривых, М.А. Методические подходы к разработке и аттестации стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности / **М.А. Кривых, О.Г. Корнилова, Е.А. Хуснатдинова** [и др.] // **Фармация.** - 2020. – Т. 69, № 3. - С.36-44.

Список сокращений и условных обозначений

АКА	-	антикомплементарная активность
АПК	-	активатор прекалликреина
АТШ	-	антитромбин Ш
АЧ	-	альбумин человека
АЧТВ	-	активированное частичное тромбопластиновое время
ГА	-	гемагглютинины
ГФ	-	Государственная фармакопея
ЕФ	-	Европейская фармакопея
ЖББР	-	желатин-барбиталовый буферный раствор
ЖСР	-	желатин-солевой раствор
ИГЧ	-	иммуноглобулины человека
ИЦЭК МИБП	-	Испытательный центр экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов
ЛП	-	лекарственные препараты
ЛС	-	лекарственные средства
МЕ	-	Международные единицы
мМЕ	-	миллиМЕ
НАЧТВ	-	неактивированное частичное тромбопластиновое время
НД	-	нормативная документация
НГА	-	непрямая гемагглютинация
нМоль	-	наномоль
НПО	-	научно-производственное объединение
НР	-	нежелательные реакции
ОСО	-	отраслевой стандартный образец
ОФС	-	общая фармакопейная статья
ПГА	-	прямая гемагглютинация
ПК	-	прекалликреин человека
ПКЧ	-	плазма крови человека
РСК	-	реакция связывания комплемента
РФ	-	Российская Федерация
СО	-	стандартный образец
СПК	-	станция переливания крови
ФГБУ «НЦЭСМП»	-	федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
ФГУП	-	Федеральное государственное унитарное предприятие
ФС	-	фармакопейная статья
ФСК	-	факторы свертывания крови
ЭТП	-	эндогенный тромбиновый потенциал
BRP	-	биологический референс-препарат
NIBSC	-	Национальный институт биологических стандартов и контроля
Mo	-	мода
p	-	доверительная вероятность
Rh(+)	-	резус-положительный
Rh(-)	-	резус-отрицательный
S_x	-	стандартное отклонение от среднего значения
\bar{x}	-	среднее арифметическое значение
ΔА/мин	-	скорость изменения оптической плотности в мин