

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) и федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук

Научные консультанты:

доктор фармацевтических наук,  
профессор Бунятян Н.Д.

доктор медицинских наук,  
старший научный сотрудник Олефир Ю.В.

Москва – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. Научный анализ проблемы безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека.....	18
1.1.1. Анализ спектра нежелательных явлений, возникающих при применении лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека.....	18
1.1.2. Оценка характеристик лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека с позиций их влияния на системы гемостаза, комплемента, калликреин-кининовую, эритроцитарное звено гомеостаза.....	27
1.1.3. Анализ технологических аспектов обеспечения безопасности применения лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека.....	36
1.2. Научно-методическое обеспечение контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека и альбумина человека с позиций их влияния на системы гемостаза, комплемента, калликреин-кининовую и эритроцитарное звено гомеостаза.....	48
1.3. Современные подходы к стандартизации методов контроля лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека и альбумина человека.....	66
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.....	79
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	81
ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИИ СТАНДАРТИЗАЦИИ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ.....	94
3.1. Обоснование структурных элементов методологии стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности.....	94

3.2. Разработка методологических подходов к стандартизации и контролю качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности.....	98
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.....	101
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ОСНОВ СТАНДАРТИЗАЦИИ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА ПО ТРОМБОГЕННОМУ ПОТЕНЦИАЛУ .....	102
4.1. Обоснование критериев оценки тромбогенного потенциала лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека.....	102
4.2. Унификация методик для оценки тромбогенного потенциала лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> ....	104
4.3. Изучение тромбогенного потенциала лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека.....	109
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.....	114
ГЛАВА 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ.....	115
5.1. Разработка унифицированной методики контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека по показателю «Антикомплементарная активность».....	115
5.2. Разработка унифицированных методик оценки содержания антиэритроцитарных антител.....	123
5.3. Разработка унифицированных методик оценки содержания активатора прекалликреина.....	131
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.....	137
ГЛАВА 6 ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА.....	138

6.1. Обоснование методологии валидации методик, основанных на иммунобиологических реакциях.....	138
6.2. Разработка алгоритма и проведение валидации методик оценки содержания антиэритроцитарных антител в лекарственных препаратах из плазмы крови человека, основанных на реакциях гемагглютинации.....	139
6.3. Разработка алгоритма и проведение валидации методики определения антикомплементарной активности иммуноглобулинов человека, основанной на реакции связывания комплемента.....	141
6.4. Разработка алгоритма и проведение валидации методик определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека, основанных на реакции амидолитического расщепления хромогенного субстрата.....	145
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.....	149
ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ....	150
7.1. Разработка стандартных образцов для контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по показателям специфической безопасности.....	151
7.1.1. Разработка стандартного образца «Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)».....	151
7.1.1.1. Обоснование состава, свойств и критериев выбора кандидатов в стандартный образец для определения уровня антикомплементарной активности иммуноглобулинов человека.....	151
7.1.1.2. Разработка программы аттестации стандартного образца для определения уровня антикомплементарной активности иммуноглобулинов человека.....	154
7.1.1.3. Получение, аттестация и изучение стабильности стандартного образца «Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)»..	156

7.1.2. Разработка стандартного образца «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов».....	165
7.1.2.1. Обоснование состава и свойств стандартного образца для определения содержания гемагглютининов.....	165
7.1.2.2. Разработка критериев выбора кандидатов в компоненты стандартного образца для определения содержания гемагглютининов.....	166
7.1.2.3. Разработка программы и методик аттестации стандартного образца для определения содержания гемагглютининов.....	168
7.1.2.4. Получение, аттестация и изучение стабильности стандартного образца «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов».....	171
7.1.3. Разработка стандартного образца «Набор для определения содержания анти-Д антител».....	175
7.1.3.1. Обоснование состава и свойств стандартного образца для определения содержания анти-Д антител.....	175
7.1.3.2. Разработка критериев выбора кандидатов в компоненты стандартного образца для определения содержания анти-Д антител.....	176
7.1.3.3. Разработка программы и методик аттестации стандартного образца для определения содержания анти-Д антител.....	177
7.1.3.4. Получение, аттестация и изучение стабильности стандартного образца «Набор для определения содержания анти-Д антител».....	182
7.1.4. Разработка стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина».....	189
7.1.4.1. Обоснование состава, свойств и алгоритма разработки стандартного образца для определения содержания активатора прекалликреина.....	189
7.1.4.2. Разработка программы аттестации стандартного образца для определения содержания активатора прекалликреина.....	190
7.1.4.3. Получение, аттестация и изучение стабильности стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина»..	195

7.2. Исследования по унификации порядка обеспечения воспроизводимости результатов, получаемых при контроле качества отечественных препаратов крови человека по показателям специфической безопасности.....	212
7.2.1. Обоснование принципов обеспечения воспроизводимости результатов испытаний лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по показателям специфической безопасности.....	212
7.2.2. Экспериментальные исследования по подтверждению стабильности аналитической работы.....	214
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7.....	217
ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА...	218
8.1. Разработка принципов экспертной оценки специфической безопасности лекарственных препаратов из плазмы крови человека.....	218
8.2. Обоснование критериев экспертной оценки специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека.....	221
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 8.....	225
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	226
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	228
Список сокращений и условных обозначений.....	231
Список литературы.....	233
ПРИЛОЖЕНИЕ А Патенты на изобретения .....	265
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Паспорта на стандартные образцы.....	271
ПРИЛОЖЕНИЕ В Акты о внедрении.....	287
ПРИЛОЖЕНИЕ Г Методические рекомендации по экспертной оценке специфической безопасности препаратов крови (Титульный лист).....	298
ПРИЛОЖЕНИЕ Д Руководство по экспертизе лекарственных препаратов	

крови (Титульный лист).....	299
Благодарности.....	301

## ВВЕДЕНИЕ

**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 «Иммуноглобулин 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 S.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 (FDA) 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 «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) 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Научный анализ проблемы безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека

#### 1.1.1. Анализ спектра нежелательных явлений, возникающих при применении лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека

Лекарственные препараты из плазмы крови человека представляют собой особую группу лекарственных средств, уникальность свойств которых обусловлена гомологичностью белкового состава исходного сырья – плазмы для фракционирования. Востребованность ЛП из ПКЧ различна, однако общей тенденцией на мировом рынке является увеличение спроса на ЛП ИГЧ и АЧ (Рисунок 1) [205].

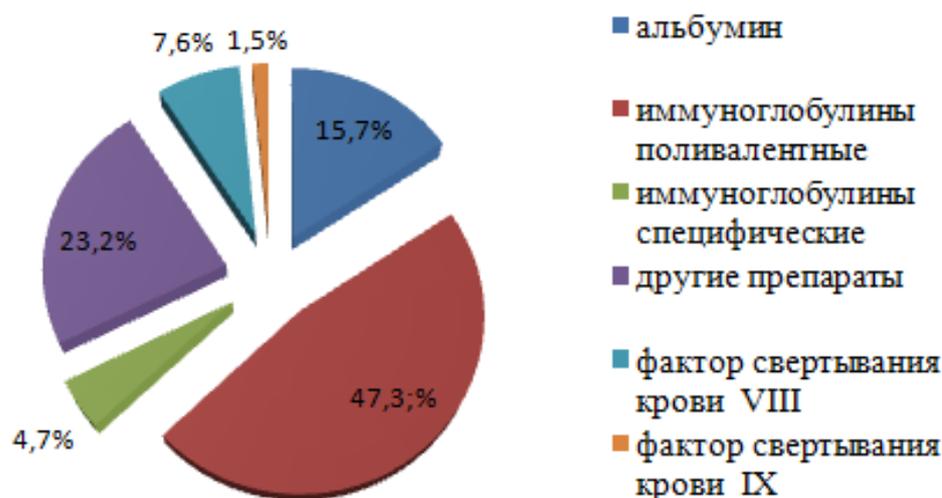


Рисунок 1 – Объем мирового рынка препаратов из плазмы крови человека

ЛП ИГЧ составляют более 50 % мирового рынка белков ПКЧ. Мировая фармацевтическая промышленность характеризуется высокой себестоимостью исходного сырья – плазмы для фракционирования, которая составляет около

половины стоимости готового ЛП. Об объемах производства ЛП из ПКЧ также свидетельствует увеличение плазменных центров в США: с менее 500 в 2015 году до более, чем 650 в 2017 году [205]. Крупнейшие предприятия CSL Plasma, Grifols и BioLife (Shire) фракционируют не только ПКЧ, собранную на территории США, но также и в Китае, Германии, Австрии, Чехии и Венгрии. Эти предприятия обеспечивают и национальные потребности в ЛП из ПКЧ, и значительную часть импорта в другие страны, в том числе в РФ [2].

Производство и применение ЛП из ПКЧ в РФ имеет свои национальные особенности, обусловленные как производственными возможностями, так и государственными стандартами. Интерес в нашей стране к ЛП ИГЧ и АЧ в последние годы значительно возрос как со стороны практических врачей по причине расширения списка показаний к применению, так и со стороны отечественных производителей в силу возросшей потребности в импортозамещении и обеспечении национальной безопасности [72, 82, 86, 87]. Отечественные препараты ИГЧ и АЧ являются приоритетными в предложениях по увеличению объемов производства по полному технологическому циклу во исполнение поручений Президента о дополнительных мерах по развитию фармацевтической промышленности в Российской Федерации от 07.02.2016 № Пр-226 (резолюция от 12 февраля 2016 года № АД-П12-718).

Иммуноглобулины человека как лекарственные препараты подразделяют на: нормальные, специфические и специального назначения [27]. Среди всего спектра ИГЧ наибольшую практическую значимость имеют ЛП группировочных наименований «Иммуноглобулин человека нормальный» и «Иммуноглобулин человека нормальный [IgG+IgM+IgA]» с различными способами введения: внутримышечным, внутривенным, подкожным и энтеральным. Так, на территории РФ из 28 наименований зарегистрированных ЛП ИГЧ указанных группировочных наименований 18 предназначены для внутривенного введения [20] (Рисунок 2). При этом, из них только треть производится на территории РФ (Рисунок 3). Подкожное применение предусмотрено для двух наименований ЛП ИГЧ зарубежного производства.

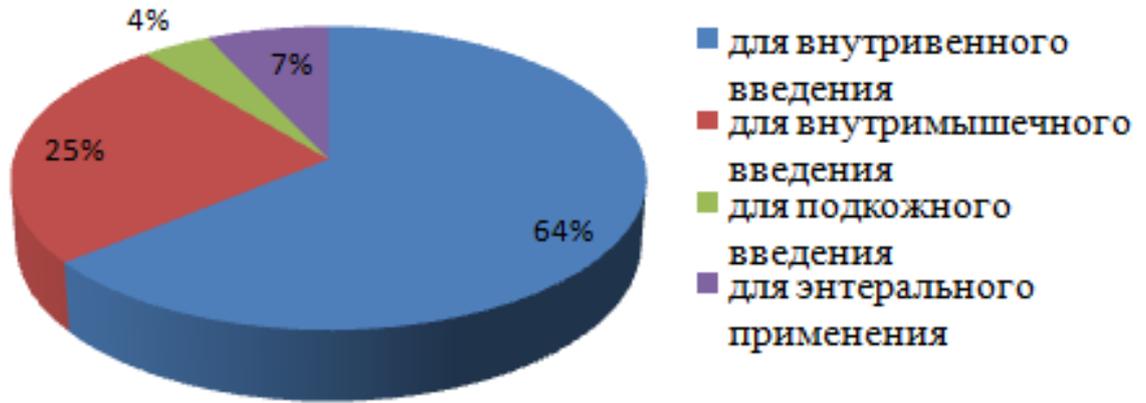


Рисунок 2 – Лекарственные препараты иммуноглобулинов человека нормального различных способов применения



Рисунок 3 – Лекарственные препараты иммуноглобулинов человека нормального отечественного и зарубежного производства

Следует отметить, что потребность в ЛП ИГЧ для внутримышечного введения на 100 % обеспечивается отечественными производителями, однако эти ЛП не имеют практического применения для заместительной терапии при иммунодефицитных состояниях и не применяются для лечения аутоиммунных заболеваний [3, 24].

Обеспеченность ЛП АЧ российского производства по количеству зарегистрированных торговых наименований превосходит таковую для ИГЧ [20] (Рисунок 4).

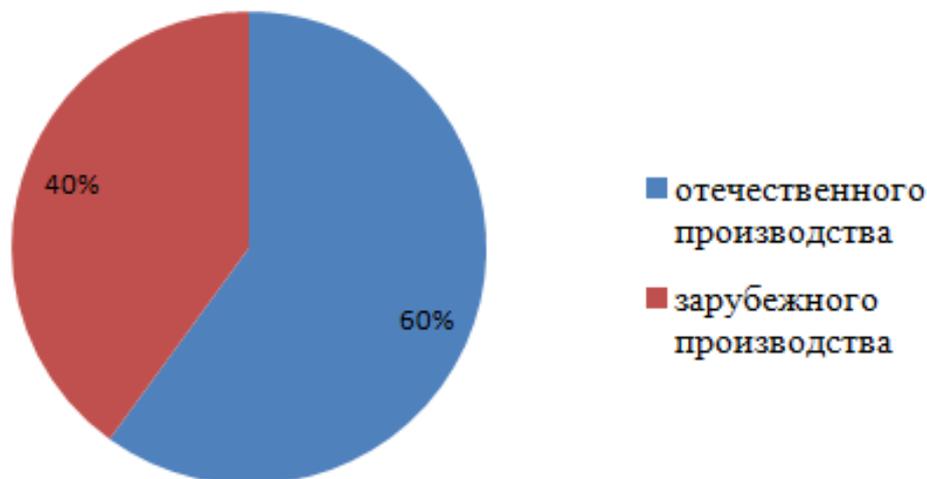


Рисунок 4 – Лекарственные препараты альбумина человека отечественного и зарубежного производства

Значительный вклад при этом вносят станции переливания крови (СПК); подавляющее большинство производимых ими ЛП АЧ различных дозировок получило государственную регистрацию в период с 2008 по 2010 годы.

Заместительная терапия большими объемами ЛП АЧ в экстренных случаях или пожизненная инфузионная терапия ЛП ИГЧ редко сопровождается аллергическими реакциями [66]. В то же время, перечень других НР разнообразен и затрагивает влияние на различные системы и органы пациента в зависимости от способа введения.

Первый опыт применения ЛП ИГЧ при аутоиммунных заблеваниях был получен клиницистами еще в начале 80-х годов 20 века. Успешное лечение идиопатической тромбоцитопенической пурпуры положило начало инфузионной иммуноглобулинотерапии [154]. Современные ЛП ИГЧ имеют широкий спектр показаний к применению, при этом отечественные ЛП применяют без возрастных ограничений в составе комплексной терапии тяжелых токсических форм вирусных и бактериальных инфекций, септических послеоперационных

осложнений, а также при первичном (врожденная агаммаглобулинемия и гипогаммаглобулинемия, общая переменная иммунная недостаточность, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, синдром Вискотта-Олдрича) и вторичном (при миеломной болезни, хроническом лимфолейкозе с рецидивирующими инфекциями, врожденной ВИЧ-инфекции с рецидивирующими инфекциями у детей, гипогаммаглобулинемии после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток) иммунодефицитах [20, 68, 69]. Показания к применению ЛП ИГЧ зарубежного производства, зарегистрированных на территории РФ, идентичны перечисленным выше регламентированным для отечественных ЛП. Кроме того, они рекомендованы к применению при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре; синдроме Гийена-Барре и болезни Кавасаки; хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии; а также при аллогенной трансплантации костного мозга [20, 68, 91, 147, 148, 158].

Частота нежелательных реакций при внутривенном введении ЛП ИГЧ различна и варьирует от 1 до 43 % [1, 100]. Перечень НР, в соответствии с утвержденными инструкциями по применению ЛП ИГЧ, разнообразен. Наиболее значимыми среди них являются: реакции анафилактического типа, гипотензия, гипертензия, тахикардия, цианоз, одышка, озноб, головная боль, тромбоэмболические осложнения, а также изменения лабораторных тестов – ложноположительные реакции при определении групповой и резус-принадлежности крови [20]. В соответствии с нормативными документами Европейского медицинского агентства [148] внутривенное введение ИГЧ может сопровождаться НР, связанными с неадекватной скоростью введения ЛП (головная боль, покраснение, озноб, миалгия, свистящее дыхание, тахикардия, тошнота). Как наиболее значимые НР указаны гемолиз, тромбоэмболические осложнения (инфаркт, инсульт, тромбоз глубоких вен и др.), острая почечная недостаточность, синдром асептического менингита, острый отек легких, сопровождающийся выраженной гипоксией, одышкой, тахипноэ, цианозом, лихорадкой и гипотензией. Не исключается вероятность передачи

трансмиссивных агентов. Нежелательные реакции, связанные с нарушением режима дозирования или скорости введения, могут быть устранены снижением скорости введения, дополнительным разведением ЛП соответствующими солевыми растворами или уменьшением вводимой дозы [171, 192].

При подкожном введении ЛП ИГЧ также возможно развитие таких НР, как гемолиз, гипотензия, анафилактоидные реакции, артериальные и венозные тромбозы, синдром асептического менингита [149]. При подкожном и внутривенном введении ЛП ИГЧ возможна пассивная передача антиэритроцитарных антител, что приводит к неверным результатам серологических тестов [148, 149].

Различные проспективные исследования свидетельствуют, что частота возникновения НР и их вид зависит от показаний к применению ЛП ИГЧ и наличия сопутствующих заболеваний у пациента. Так, исследования, проведенные Debes A. и соавт. (2007), показали, что среди 6357 пациентов всех возрастов, получивших 92958 инфузий, НР возникали в 8,3 % случаев терапии первичного иммунодефицита, в 5,0 % - при вторичном иммунодефиците. Но наиболее часто введение ИГЧ сопровождалось ознобом, причем в основном у пациентов с вторичным иммунодефицитом; на головную боль чаще жаловались пациенты с первичным иммунодефицитом и аутоиммунными заболеваниями [128].

За последнее десятилетие значительно расширился список показаний к применению ЛП ИГЧ, увеличился диапазон терапевтических доз [39]. Введение высоких доз ЛП ИГЧ в среднем 2,0 г на кг массы тела и более, вводимые в течение 2 – 5 дней, в настоящее время широко практикуют при лечении синдромов Гийена-Барре, Миллера-Фишера [188], болезни Кавасаки [110], вульгарной пузырчатки [158], при пересадке почки у HLA-сенситизированных пациентов [163], хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии, многофокальной моторной невропатии [227], болезни Альцгеймера [143] и др. На фоне массивных инфузий препаратов ИГЧ стали чаще выявляться осложнения, связанные с влиянием на системы комплемента,

калликреин-кининовую, систему гемостаза, которые проявляются гемолизом, гипотензией, анафилактоидными реакциями, тромбоэмболическими осложнениями [189].

Одним из наиболее часто регистрируемых побочных эффектов внутривенного и подкожного применения ИГЧ является гемолиз. Степень гемолиза различна и может варьировать от слабо выраженной, регистрируемой только при целенаправленном лабораторном исследовании (снижение гемоглобина на 0,1 г/л), до значительного снижения гемоглобина, гематокрита и другими осложнениями, требующими медикаментозного лечения [208]. Гемолитическая анемия регистрируется до 1 случая на 1000 инфузий ЛП ИГЧ.

Внутрисосудистое разрушение эритроцитов вследствие активации системы комплемента возникает редко в первые часы после инфузии ЛП ИГЧ, однако характеризуется стремительным течением, когда гемолизируется до 200 мл эритроцитов за час, а гемоглобин снижается на 0,5 г/л [137]. Внесосудистый гемолиз, обусловленный ГА - иммуноглобулинами класса G, которые относятся к подклассу G2, происходит вследствие взаимодействия ГА с соответствующими антигенами эритроцитов, последующей активации мононуклеарных фагоцитов при взаимодействии с FcγR3A рецептором и развития Fc-зависимого фагоцитоза эритроцитов [225, 226, 260].

Предрасполагающим фактором к этой активации является воспалительный процесс, что обуславливает большую частоту гемолитических осложнений у пациентов с воспалительными и аутоиммунными заболеваниями, такими как иммуноопосредованная тромбоцитопения (42 %), синдром Гийена-Барре (40 %), миастения Гравис, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, болезнь Кавасаки, которые к тому же получают и большие дозы ЛП ИГЧ [111, 127, 196, 203, 219, 255]. По данным других исследований в 51 % зарегистрированных случаев гемолитические осложнения возникали в процессе терапии аутоиммунных и воспалительных заболеваний, при которой разовые дозы составляли от 1 до 2 г/кг [108].

Гемолитические осложнения с максимальным снижением общего гемоглобина на 10 сутки возникали при введении ИГЧ в дозе 0,4 г/кг массы тела в сутки при лечении синдрома Гийена-Барре [203]. Ретроспективный анализ случаев гемолитических осложнений при применении ИГЧ показал, что в 88 % случаев пациентами получена доза, превышающая 2 г/кг массы тела в течение двух последовательных дней или более 0,4 г/кг в каждый из 4 - 7 последовательных дней [196]. Чаще возникает у пациентов А(II) и АВ(IV) групп крови, около 70 % и 20 % случаев соответственно, однако, частота встречаемости у пациентов АВ(IV) группы значительно выше [187].

Среди лиц, обладателей II(A) и III(B) групп крови, выявляются так называемые секреторные подгруппы, имеющие в плазме крови растворимые антигены А и В [163]. Эти антигены могут вызывать нейтрализацию анти-А или анти-В ГА, вводимых с ЛП ИГЧ, следовательно, лица, не имеющие таких секреторных растворимых антигенов, имеют более высокий риск гемолиза вследствие пассивной передачи ГА.

Так как при некоторых заболеваниях (например, болезни Кавасаки), внутривенное введение ИГЧ производится в больших объемах из расчета до 4 г/кг массы тела, наличие в препарате гемагглютининов обуславливает их длительную циркуляцию в кровеносном русле, которая сопровождается сенсбилизацией эритроцитов *in vivo*. При соответствующей групповой принадлежности пациента А(II), В(III) или АВ(IV) это может привести к неверной трактовке иммуносерологических тестов по определению группы крови, так как проявляется выраженный ложноположительный результат в реакции прямой гемагглютинации [116, 181, 207].

Ретроспективный анализ случаев гемолитических осложнений позволил Turner С.Е с соавт. (1999) установить, что внесосудистый гемолиз, сопровождающийся значительным снижением гемоглобина, ретикулоцитозом, гипербилирубинемией, гемоглобинурией и др. симптомами, вплоть до почечной и полиорганной недостаточности, часто возникал у реус-положительных пациентов с иммунодефицитными заболеваниями после инфузий ЛП ИГЧ [242].

Оценка качества серий ЛП ИГЧ, вызвавших эти НР показала, что эти серии содержали значительное количество анти-D антител [204].

ЛП АЧ широко применяют для лечения гипопроотеинемии при тяжелых ожоговых поражениях, в травматологии и хирургии [147]. Гипотензия как НР была впервые выявлена в начале 70-х годов в период активного применения ЛП АЧ в хирургической практике [103]. Снижение систолического и диастолического артериального давления было характерно для инфузий ЛП АЧ в послеоперационный период при шунтировании сосудов сердца, а также у пациентов находящихся на плазмаферезе [121]. Гипотензивный эффект был обусловлен присутствием в ЛП активатора прекалликреина в количестве, превышающем 35 МЕ/мл. Наиболее частыми НР, связанными с нарушением скорости введения и дозирования ЛП АЧ, регуляторными органами ЕМА указаны гиперволемиа и нарушение электролитного состава крови [147].

Перечисленные выше НР и причины их возникновения были выявлены в период активного внедрения инфузионной терапии ЛП ИГЧ и АЧ в клиническую практику. Одновременно была установлена роль повышения вязкости крови при введении ЛП ИГЧ в возникновении артериальных и венозных тромбозов и, как следствие, тромбоэмболических осложнений: инфаркта миокарда, инсульта, тромбоэмболии легочной артерии. Вероятность возникновения этих НР составляет менее 0,01 % случаев в соответствии с указаниями в инструкциях по применению ЛП ИГЧ зарубежного производства и одного – отечественного [20, 148]. В тоже время, ряд исследователей на основании анализа отчетов системы фармаконадзора за 40-летний период применения ЛП ИГЧ отмечают, что частота тромбоэмболических осложнений значительно выше, особенно у пациентов с аутоиммунными заболеваниями [175]. Ретроспективный анализ тромбоэмболических осложнений, зарегистрированных в период с 2008 по 2010 гг, проведенный Germishuizen W.A. с соавт. (2014), показал, что такие НР возникали в 1 % случаев применения ЛП ИГЧ [144]. При этом венозных тромбозов было зарегистрировано больше, чем артериальных.

Инцидент значительного увеличения количества тромбозмболических осложнений (7 случаев, что соответствовало 1 случаю на 28 600 стандартных доз), произошедший в августе 2010 года при применении серии препарата Октагам, раствор для инфузий 50 мг/мл, обусловил необходимость тщательного выяснения причин [244]. Проведенные исследования позволили выявить, что переносимость ЛП ИГЧ для внутривенного введения, в числе прочего зависит и от того, содержатся ли в препаратах остаточные количества факторов свертывания крови и оказывают ли они влияние на кинетику образования тромбина. В связи с этим, Комиссия Европейской Фармакопеи пересмотрела требования к производству и качеству препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения и утвердила новую редакцию монографии 01/2012 HUMAN NORMAL IMMUNOGLOBULIN FOR INTRAVENOUS ADMINISTRATION, в соответствии с которой ужесточаются требования к производству препаратов в части доказательства элиминации тромбинообразующих агентов и отсутствия тромбогенного потенциала готовой формы препарата [134].

### **1.1.2. Оценка характеристик лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека с позиций их влияния на системы гемостаза, комплемента, калликреин-кининовую, эритроцитарное звено гомеостаза**

Научные исследования различных аспектов безопасности применения ЛП ИГЧ и АЧ направлены на выяснение причин, связанных с качеством ЛП, а также обусловленных клинико-морфологическими особенностями основного и сопутствующих заболеваний пациента. Так, установлено, что нарушения функции почек, вплоть до развития острой почечной недостаточности более вероятны при применении ЛП ИГЧ, в составе которых в качестве стабилизатора использована сахароза [148]. При этом наиболее часто эти осложнения возникают у пациентов с ожирением или с уже существующими факторами риска (преклонный возраст,

артериальная гипертензия, сахарный диабет, наличие в анамнезе сосудистых заболеваний).

Ряд отечественных и зарубежных исследователей отмечают значимость в развитии НР при внутривенном применении ЛП ИГЧ и АЧ конформационно измененных или агрегированных в процессе производства или хранения молекул ИГЧ или АЧ (соответственно), а также различных ФСК, антиэритроцитарных антител [3, 142, 174, 223].

Система комплемента является неотъемлемой частью систем поддержания гомеостаза организма. Её активация иммунными комплексами является одним из механизмов удаления антигенов и проявления терапевтической эффективности ЛП ИГЧ [3]. Однако активация системы комплемента может осуществляться и по альтернативному пути. Механизм такой активации вероятно обусловлен взаимодействием конформационно измененными/агрегированными в процессе производства или хранения молекул ИГЧ с компонентом С3b системы комплемента. В результате, при наличии в ЛП ИГЧ значительного количества таких измененных молекул, его инфузии могут сопровождаться НР анафилактоидного типа, проявляющимися приливами, головной болью, лихорадкой, ознобом, одышкой, тахикардией [12, 31, 71, 90, 126, 130, 208]. Наиболее часто в клинической практике такие НР наблюдались у пациентов с иммунодефицитными состояниями [3, 35, 126, 130, 208].

Конформационные изменения или агрегация молекул ИГЧ могут являться следствием внутримолекулярной перестройки и межмолекулярных взаимодействий, обусловленных нагреванием, обработкой органическими растворителями и химическими реагентами [95, 227]. Впервые причина спонтанной активации системы комплемента агрегированными формами молекул иммуноглобулинов была установлена в 1960-х годах, когда хроматографическое исследование молекулярно-массового распределения молекул иммуноглобулинов в ЛП с высоким уровнем АКА позволил Miekka S.I. с соавт. (1975) продемонстрировать также высокое содержание в них агрегатов [182].

В связи с этим, одной из характеристик ЛП ИГЧ является уровень неспецифической АКА, которая оценивается в отсутствие специфического антигена в реакции связывания комплемента [6, 30]. Установление предельно допустимого количества полимеров и агрегатов также является необходимым показателем качества ЛП ИГЧ в аспекте оценки их антикомплементарных свойств.

Максимально полное сохранение всего спектра иммуноглобулинов класса G, находящихся в плазме крови доноров, приводит к тому, что в ЛП ИГЧ содержатся антитела широкого спектра действия, в том числе антиэритроцитарные антитела различной специфичности [39]. Антиэритроцитарные антитела представлены изогемагглютинидами (анти-A и анти-B гемагглютинидами), антирезусными антителами (анти-D, анти-C, анти-E антитела), а также антителами к другим антигенам эритроцитов (Kell, Kidd, Duffy и др). Наибольшее количество изогемагглютининов в ПКЧ представлено иммуноглобулинами класса M, значительно меньше – классов G и A.

В соответствии с европейскими и российскими фармакопейными требованиями ЛП ИГЧ должны изготавливаться из объединенной плазмы крови не менее 1000 доноров [25, 26, 134]. Известно, что в плазме доноров I(0) группы крови содержатся анти-A и анти-B ГА, II(A) и III(B) групп – анти-B или анти-A ГА, соответственно; в плазме Rh(-) доноров выявляются анти-D, анти-C, анти-E антитела. Таким образом, в зависимости от превалирования в производственном пуле плазмы доноров с группой крови I(0), II(A) и/или III(B) различной резус принадлежности будет зависеть количество и специфичность антиэритроцитарных антител в ЛП ИГЧ [39]. Технологический процесс фракционирования ПКЧ направлен на максимально полное сохранение иммуноглобулинов класса G (IgG) и высокую очистку ЛП от молекул иммуноглобулинов классов M и A. Таким образом, наиболее значимыми являются гемолитические осложнения, вызванные антиэритроцитарными антителами - IgG. Механизмы развития гемолиза, вызванного иммуноглобулинами различных классов, отличается. Иммуноглобулины класса M

вызывают внутрисосудистый комплементзависимый гемолиз в первые часы инфузий ЛП ИГЧ, вызывая активацию С5 компонента системы комплемента [137]. Для IgG характерен внесосудистый иммуноопосредованный гемолиз, который происходит в ретикулоэндотелиальной системе и клинически/лабораторно выявляется в течение первых 10 суток после введения ЛП ИГЧ. Однако, молекулы IgG гемагглютининов, фиксируясь на близком расстоянии друг от друга на поверхности эритроцитов с соответствующими антигенами, также могут активировать систему комплемента и вызывать внутрисосудистый гемолиз [137].

Предрасполагающими к развитию гемолиза могут быть факторы, связанные с полиморфизмом Fc-фрагмента иммуноглобулинов, рецепторов на макрофагах, например, FcγRIIIa (CD16), который определяет скорость опсонизации эритроцитов, гомозиготность и большее количество антигенов на эритроцитах генотипа A1 [218], а также с гетерозиготностью генотипа A1B [115, 116, 163, 183].

Связывание IgG с фрагментами комплемента (C3a, C3b, C4b и C5a) блокирует отложение этих фрагментов на клетках-мишенях, таким образом, предотвращая последующее иммунное повреждение. Повышенное поглощение комплемента наблюдается при таких заболеваниях, как активный дерматомиозит, Болезнь Кавасаки, аутоиммунная гемолитическая анемия, синдром Гийена–Барре, и миастения Гравис [140]. Поэтому возникновение гемолитических НР при этих заболеваниях более вероятно. Димерные формы молекул анти-А и анти-В ГА, которые чаще выявляются в жидких лекарственных формах препаратов ИГ, усиливают фиксацию комплемента и, как следствие, также провоцируют развитие гемолиза эритроцитов [115, 160, 163, 166].

Среди антирезусных антител наибольшую значимость с точки зрения риска возникновения НР имеют анти-D антитела. Анализ более 200 серий ЛП ИГЧ различных производителей, проведенный Pisanì G с соавт. (1996), показал, что около 6 % из них оказавшихся причиной возникновения гемолитических НР, содержали анти-D антитела в количестве, соответствующем разведению препарата 1:16 – 1:32 [204]. В указанных исследованиях в качестве

положительного контроля был использован антирезусный иммуноглобулин для внутримышечного введения Partobulin (Immuno Ltd, Sevenoaks, Kent, UK), разведенный до содержания специфических антирезусных (анти-D) антител 0,05 МЕ/мл. Указанное обстоятельство позволило исследователям сделать вывод о предельно допустимом содержании анти-D антител, не превышающем 0,05 МЕ/мл, т.е. в разведении не более 1:8. Это требование применимо для инфузионных ЛП ИГЧ, непредназначенных для специфической терапии резус-конфликта. Анти-D антитела являются IgG, крайне редко вызывающими активацию компонентов системы комплемента с развитием внутрисосудистого гемолиза [116, 137]. Эти антитела могут вызывать иммуноопосредованный внесосудистый гемолиз у резус-отрицательных лиц.

Антиэритроцитарные антитела другой специфичности, например, анти-K антитела также могут вызывать гемолиз с аналогичным механизмом развития, однако количество таких антител и частота выявления обусловленных ими НР значительно ниже [185].

Внутрисосудистый гемолиз эритроцитов могут вызвать гемолизины, однако, их наличие в ЛП ИГЧ чрезвычайно редкое явление [187].

Одной из вероятных причин гипотензивных осложнений при внутривенном применении ЛП ИГЧ и АЧ, может быть активация калликреин-кининовой системы. Инициатором такой активации выступает активатор прекалликреина, который является биологически активным  $\beta$ -фрагментом ФСК XII (фактора Хагемана) и может присутствовать в ЛП ИГЧ и АЧ. АПК даже в небольшой концентрации способен активировать плазменный прекалликреин (ПК), переводя его в калликреин. В свою очередь калликреин, обладающий ферментативной активностью в отношении HMW-кининогенов, осуществляет синтез брадикинина [150, 164, 208]. Благодаря мощному вазодилатирующему действию брадикинина и проявляется гипотензивный эффект АПК, который более выражен у пациентов с сердечно-сосудистыми нарушениями [180].

АПК также обладает способностью активировать ФСК XI в фактор XIa, который, в свою, очередь участвует в сложной системе синтеза тромбина [150].

Однако в клинической практике применения ЛП ИГЧ и АЧ тромбоемболических НР, связанных с контаминацией препаратов АПК, отмечено не было.

Еще одной причиной возникновения гипотензии при применении ЛП ИГЧ может быть значительное количество димеров IgG, которые образуются на этапах производства [208].

Возможные причины развития тромбоемболических осложнений инфузионной иммуноглобулинотерапии могут быть связаны не только с повышением вязкости крови, высокими дозой и скоростью введения препарата. Wolberg A.S. с соавт. (2000 г), изучая прокагулянтную активность 29 серий ЛП ИГЧ восьми производителей, установили, что около 90 % из них обладали способностью сокращать время свертывания плазмы, дефицитной по ФСК XI при определении частичного тромбопластинового времени, а половина содержала ФСК XI с активностью более 0,001 МЕ/мл, а также следовые количества активированного фактора XIa [256]. Степень контаминации ЛП ИГЧ этим ФСК XI зависела от производителя, а в ряде случаев активность фактора XIa повышалась после хранения при 4 °С в течение 4 недель.

Увеличение количества тромбоемболических осложнений инфузионной иммуноглобулинотерапии, связанное с применением ЛП Октагам в 2010 г, обусловило проведение всеобъемлющих исследований его качества [133]. Было установлено, что тромбогенный потенциал серий указанного ЛП также был связан с контаминацией готовой формы активированным ФСК XIa [136].

Тромбообразование является сложным многокомпонентным процессом, ведущую роль в пусковом механизме играют ФСК VII, IX, X, XI и их активированные формы, тромбин [101]. Так как ФСК XI имеет изоэлектрические свойства и молекулярный вес, близкие к таковым для IgG, при спиртовом фракционировании они выделяются вместе. Другие факторы протромбинового комплекса (II, V, VII, IX, X) могут находиться во фракции II+III и сохраняться в течение производственного процесса, так как обладают высокой стабильностью. Таким образом, за тромбогенные осложнения при применении ЛП ИГЧ могут быть ответственны факторы протромбинового комплекса (II, V, VII, IX, X, XI), их

активированные формы [112, 144, 186, 211, 247] (Рисунок 5). Важно не столько их содержание, оцененное по количеству антигена, сколько проявляемая активность, а также влияние на эффекторное звено каскада свертывания крови – синтез тромбина.

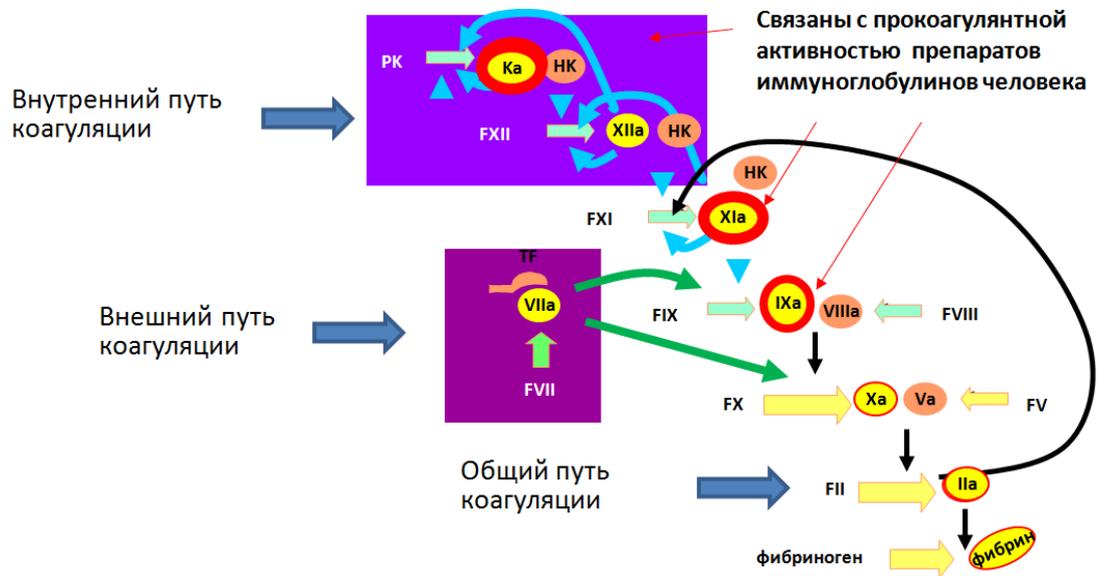


Рисунок 5 – Факторы свертывания крови, обуславливающие тромбогенные осложнения при внутривенном применении ЛП ИГЧ

Анализ случаев возникновения тромбоемболических осложнений (инфаркт, инсульт, тромбоз глубоких вен и др.) позволил установить, что с большей вероятностью они возникали у пациентов с уже существующими факторами риска (преклонный возраст, артериальная гипертензия, сахарный диабет и наличие в анамнезе сосудистых заболеваний) [132, 210].

Таким образом, спектр НР при применении ЛП ИГЧ и АЧ весьма разнообразен, но обращают на себя внимание побочные эффекты, которые обусловлены наличием в ЛП примесей – остаточных компонентов ПКЧ или измененных при производстве/хранении молекул действующего вещества (таблица 1).

Таблица 1 - Побочные эффекты, возникающие при внутривенном введении ЛП ИГЧ и АЧ.

Группа ЛП	Побочный эффект	Патофизиологические механизмы развития побочного эффекта	Гомеостатическая система-мишень	Причина возникновения, обусловленная	
				составом/свойством ЛП	особенностями организма пациента
Иммуноглобулины человека Альбумин человека	Гипотензия	Активация прекалликреина в калликреин, который вызывает активацию кининового пути и синтез брадикинина, обладающего сосудорасширяющим действием	Калликреин-кининовая	Активатор прекалликреина  Димеры	-
Иммуноглобулины человека	Гемолиз/ гемолитическая анемия	Взаимодействие гемагглютининов с соответствующими антигенами эритроцитов, активация мононуклеарных фагоцитов и развитие Fc-зависимого фагоцитоза эритроцитов	Эритроцитарное звено гомеостаза	Анти-А, анти-В гемагглютинины.  Анти-D антитела	Группы крови А (II), В(III) или АВ(IV) (несекреторные), наличие воспалительных и/или аутоиммунных процессов, полиморфизм рецепторов макрофагов  Фенотип по резус-принадлежности
Иммуноглобулины человека	Изменение результатов серологических исследований: - неверное определение группы крови в реакции прямой гемагглютинации;	Связывание изоагглютининов (анти-А, анти-В гемагглютининов) с эритроцитами пациентов <i>in vivo</i> , их сенсibilизация, что приводит к положительному результату в реакции прямой гемагглютинации.	Эритроцитарное звено гомеостаза	Анти-А, анти-В гемагглютинины.	Группы крови А (II), В(III) или АВ(IV)

Продолжение таблицы 1

Группа ЛП	Побочный эффект	Патофизиологические механизмы развития побочного эффекта	Гомеостатическая система-мишень	Причина возникновения, обусловленная		
				составом/свойством ЛП	особенностями организма пациента	
Иммуноглобулины человека	- неверное определение совместимости донор-реципиент в результате пассивного переноса антител к антигенам эритроцитов по системам Rh, Kell	Связывание анти-D, анти-C, анти-E, анти-K антител с эритроцитами пациентов <i>in vivo</i> , их sensibilization, что приводит к положительному результату в реакции прямой гемагглютинации	Эритроцитарное звено гомеостаза	Анти-D, анти-E, антител	анти-C, анти-K	Фенотип по резус-принадлежности
Иммуноглобулины человека	Реакции анафилактоидного типа	Активация системы комплемента по альтернативному пути с участием Fc-участка агрегированных/конформационно измененных молекул иммуноглобулинов, активация макрофагов, образование анафилатоксинов	Комплемента	Агрегированные и/или конформационно измененные формы молекул иммуноглобулинов	-	
Иммуноглобулины человека	Тромбоэмболии (инсульт, инфаркт, тромбоз легочной артерии, тромбоз глубоких вен/артерий)	Инициация синтеза тромбина	Гемостаза	Активированный фактор XI, факторы протромбинового комплекса, калликреин		Тромбоз глубоких вен в анамнезе, тромбофлебит, преклонный возраст

Таким образом, компоненты плазмы крови человека антиэритроцитарные антитела, ФСК, в том числе АПК, агрегированные молекулы IgG, присутствуя в препаратах крови могут оказывать влияние на эритроцитарное звено гемостаза, вызывая гемолиз эритроцитов; на систему гемостаза, вызывая чрезмерный синтез тромбина с образованием тромбов; на калликреин-кининовую систему, вызывая расширение сосудов и гипотензию; или систему комплемента, вызывая ее неспецифическую активацию.

### **1.1.3. Анализ технологических аспектов обеспечения безопасности применения лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека**

Традиционно, препараты иммуноглобулинов и альбумина человека получают методом спиртового фракционирования на холоду по Кону и его модификациями: Кона–Онклея, Хинка, Кистлера–Ничмана (Рисунок 6, 7) [45, 123, 167]. Однако все возрастающие требования, предъявляемые к качеству препаратов, обусловили поиск новых технологий, позволяющих обеспечить безопасность их применения.

Технологии производства зарубежных ЛП ИГЧ в основном характеризуются непрерывным циклом последовательного выделения из плазмы для фракционирования факторов свертывания крови (VIII, IX или протромбинового комплекса), антитромбина III, альбумина и др. белков с целью получения лекарственных средств [186]. Для отечественных производителей ЛП из ПКЧ характерен производственный процесс, нацеленный на выделение только АЧ и ИГЧ [14]. Результаты анализа технологии производства отечественных ЛП ИГЧ для внутривенного введения подтверждают отсутствие этапов удаления тромбинообразующих агентов, что позволяет предположить возможность их наличия и, соответственно, необходимость оценки тромбогенного потенциала указанных ЛС.

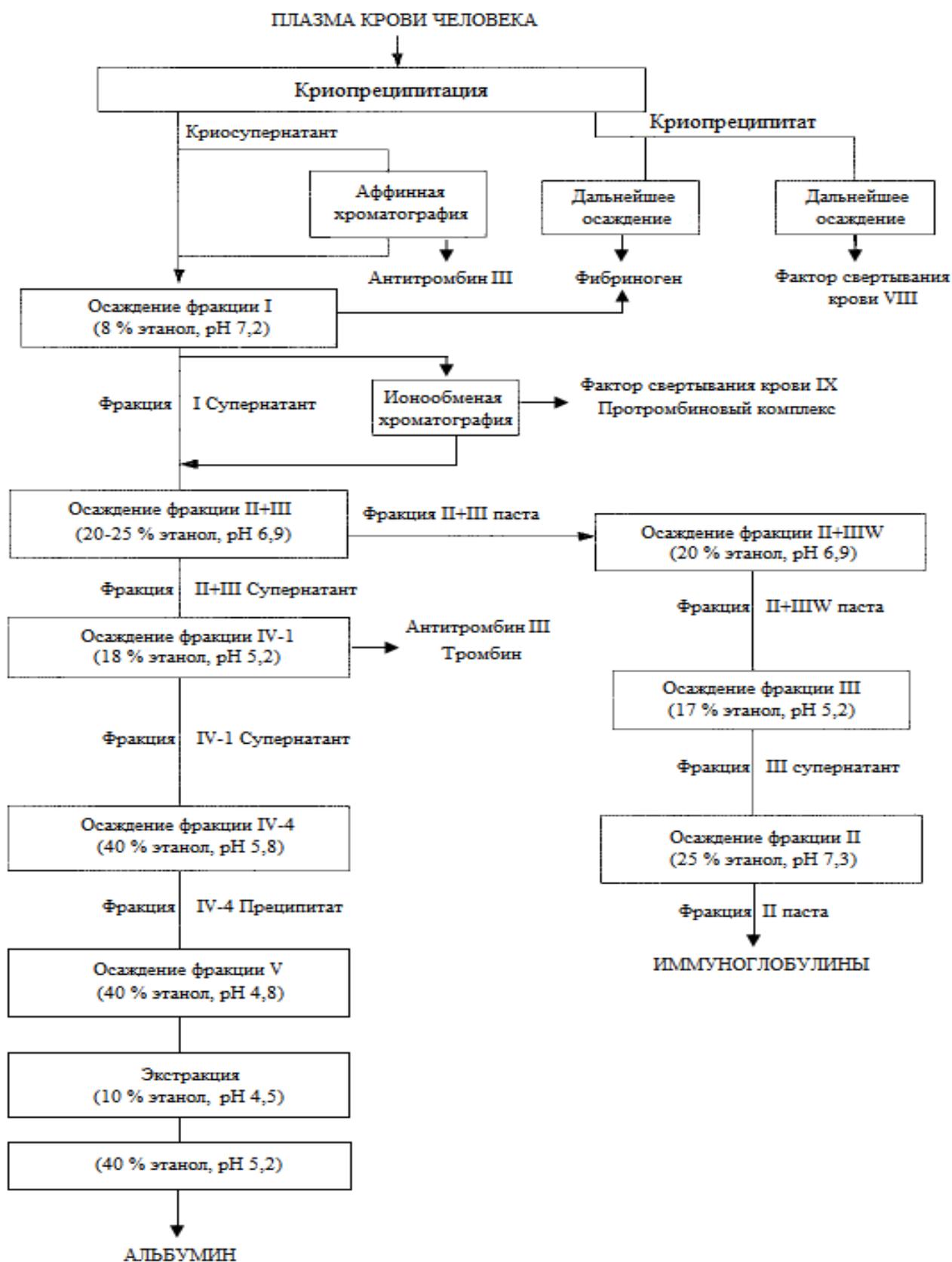


Рисунок 6. Процесс фракционирования Кона-Онклея

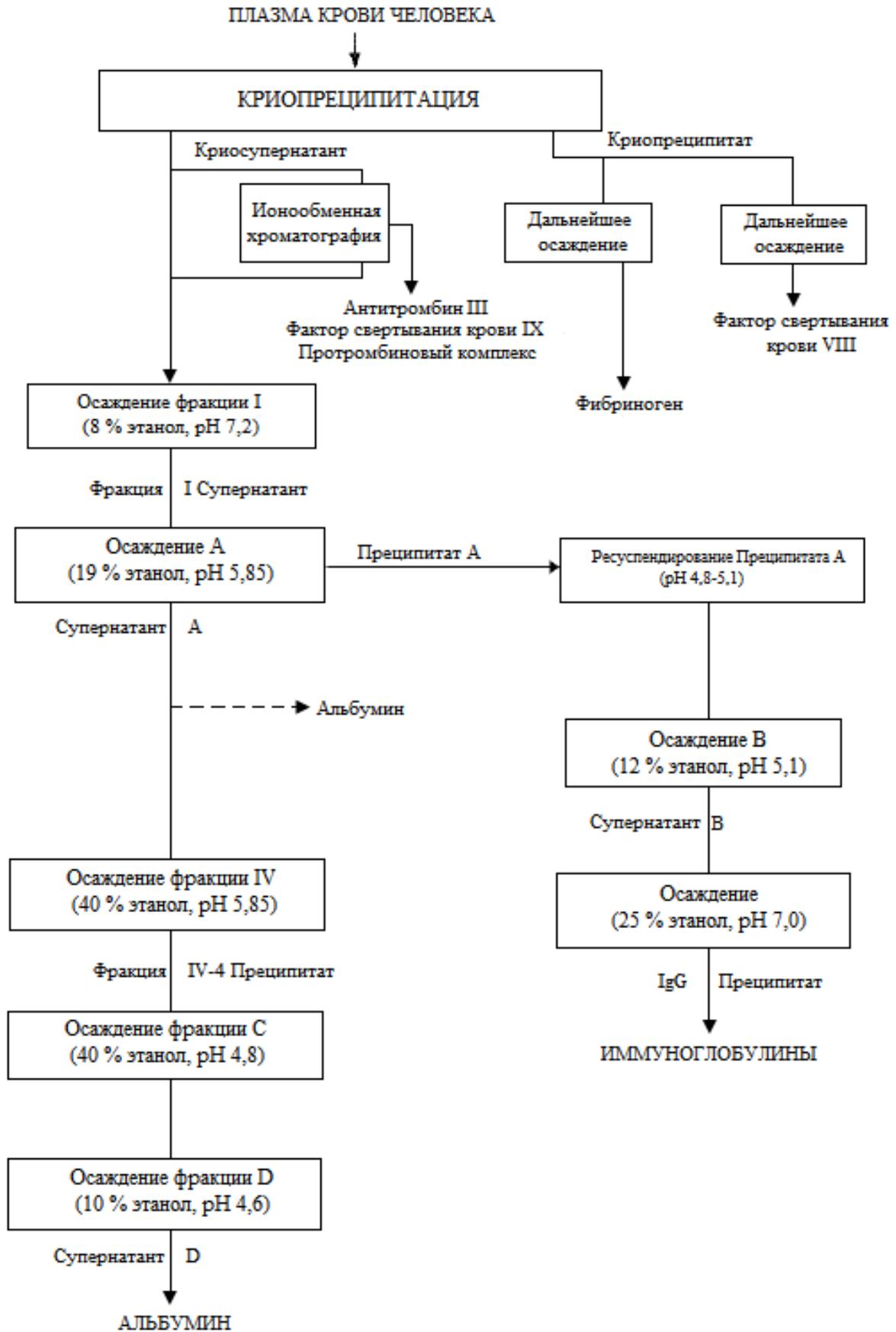


Рисунок 7 - Процесс фракционирования Кистлера–Ничмана

Технологический процесс изготовления ЛП методом фракционирования плазмы крови человека начинается с формирования котловой загрузки, при формировании которой самопроизвольно димеризуются до 40 % молекул иммуноглобулинов. Агрегации и конформационным изменениям подвергаются молекулы иммуноглобулинов и альбумина как при производстве, так и при хранении при неадекватной стабилизации молекул.

Критическими стадиями для агрегации молекул иммуноглобулинов при производстве ЛП ИГЧ могут быть [114]:

а) регулировка уровня рН (денатурацию молекул могут вызвать концентрированные растворы гидрохлорида натрия или соляной кислоты, неадекватные скорость и амплитуда перемешивания растворов);

б) ультрафильтрация (конформационные изменения могут вызвать высокая скорость потока, трансмембранное давление и др.);

в) хроматография (скорость потока раствора, давление);

г) приготовление готовой формы (регулировка осмоляльности, уровня рН, концентрации белка, лиофилизация).

Для снижения уровня АКА препаратов ИГЧ для внутривенного введения могут быть использованы различные подходы, в первую очередь направленные на предотвращение агрегации и конформационных изменений молекул IgG, а также на удаление уже агрегированных форм [1, 6, 105, 106, 124, 230, 233]:

а) обработка ферментами (пепсин, плазмин, трипсин) в сочетании с кислотным гидролизом при температуре 37 °С в течение 1 суток при рН 4,0;

б) обработка дитиотрентолом и последующее алкилирование йодацетамидом [153, 241, 246];

в) обработка сульфалитическими агентами;

г) риванольное выделение иммуноглобулинов;

д) сорбция (уголь, фосфат кальция);

е) использование ионообменной хроматографии [141, 233].

Полное исключение АКА молекул иммуноглобулинов в ЛП может привести к значительному снижению терапевтической эффективности в отношении

инфекционных агентов, а также к изменению фармакокинетики препарата. В тоже время, технология получения мономерных форм молекул IgG должна гарантировать их сохранение в процессе хранения. Дополнительное включение стадий в производство ЛП ИГЧ, например сольвент-детергентная обработка, также может повышать антикомплементарные свойства иммуноглобулинов [30].

По данным авторов [187] около 75 % доноров имеют 0(I) или A(II) группы крови, в плазме которых циркулируют анти-A и/или анти-B ГА. Являясь иммуноглобулинами класса G, эти белки подвергаются целенаправленному выделению при фракционировании в процессе производства ЛП ИГЧ. Большинство гемолитических НР, связанных с ЛП ИГЧ, были вызваны анти-A и анти-B ГА. Снижение титров таких антител при производстве ИГЧ может снизить частоту нежелательных явлений такого рода [137].

Несколько этапов, как правило, участвуют в производстве ЛП ИГЧ: спиртовое фракционирование, хроматографическое очищение, этапы вирусной инактивации, концентрирование и добавление вспомогательных веществ для придания стабильности. Существует много вариантов различных методов производства. Изменения рН, ионной силы, температуры или процентного содержания спирта, концентрация белка во время изготовления может изменить характеристики ЛП ИГЧ. Процесс производства отдельно взятого торгового наименования ЛП ИГЧ уникален, что обуславливает различия в составе не только вносимых компонентов, но и остаточных контаминантов из ПКЧ, соотношение подклассов молекул иммуноглобулинов, молекулярные параметры и др. Следовательно, из-за различий в методах производства ЛП ИГЧ могут варьировать и уровни антиэритроцитарных антител [187].

Способ спиртового фракционирования включает многократное осаждение, этапы очистки; конечный продукт фракция II содержит молекулы иммуноглобулинов и ФСК. При этом антиэритроцитарные антитела, проэнзимы и липопротеины осаждаются во фракции III при низком уровне рН (5,4–6,3) и слабой ионной силе, в то время как большинство других компонентов относительно растворимы при таких условиях.

Способ на основе хроматографии был разработан для того, чтобы добиться повышения чистоты и выхода ИГЧ и, следовательно, рациональное использование ограниченных ресурсов ПКЧ. Этот способ предусматривает однократное осаждение, с последующим фракционированием октановой кислотой и дальнейшее хроматографическое выделение. Такая технология позволит снизить содержание АПК в ЛП, онако не снижает содержание гемагглютининов.

Наличие в составе ЛП ИГЧ таких стабилизаторов, как глицин, L-пролин увеличивает риск развития гемолитических осложнений [125].

Исследование, проведенное Berg R. с соавт. (2015) показало, что все из 136 доступных для анализа серий ЛП ИГЧ, обусловивших развитие гемолитической анемии, имели титры анти-А и анти-В гемагглютининов менее 1:64 [111]. Снижения содержания ГА можно добиться применением иммуноадсорбирующей хроматографии [152]. Другой возможной стратегией предотвращения гемолитических эпизодов является донорский скрининг на содержание анти-А и анти-В ГА с исключением доноров с высокими титрами гемагглютининов из производственного плазменного пула, что может привести к их двукратному снижению. Недостатком такого подхода является то, что 5 – 7 % доноров будут исключены из донорства плазмы крови для производства ИГЧ [226].

АПК присутствует в ЛП ИГЧ и АЧ вследствие его неполного удаления в ходе технологического процесса [213]. Так, АПК часто обнаруживался в препаратах, изготовленных по технологии осаждения полиэтиленгликолем [213]. Известны случаи, когда применение на этапах производства фильтров с определенными свойствами приводило к активации ферментов и увеличению активности АПК в готовом препарате [221]. Содержание АПК может также меняться при хранении препаратов, например альбумина человека, в течение срока годности. Это связано как со свойствами молекул альбумина (их стабильностью), так и с влиянием упаковочного материала – стекла. Технологические аспекты обеспечения безопасности ЛП АЧ зависят от особенностей технологии производства, выбора стабилизаторов, поддерживающих стабильность мономерной формы молекулы альбумина.

Большинство мировых производителей ЛП АЧ для стабилизации молекулы альбумина используют несколько химических соединений [20] (таблица 2) [45].

Таблица 2 - Стабилизаторы, используемые при производстве препаратов альбумина человека зарубежного производства, зарегистрированных в РФ.

Торговое наименование лекарственного препарата	Наименование стабилизатора	Срок годности, условия хранения
Альбурекс®	Натрия каприлат Натрия ацетилтриптофан	3 года, не выше 30 °С
Альбумин человеческий	Натрия каприлат Натрия ацетилтриптофан	3 года, от 2 до 25 °С
Зенальб-4,5	Каприловая кислота	3 года, от 2 до 25 °С
Уман альбумин	Натрия каприлат N-ацетилтриптофан	3 года, от 15 до 25 °С
Альбумин человеческий	N-ацетилтриптофан Каприловая кислота	3 года, от 2 до 25 °С
Альбумин человека Биотест	Натрия каприлат Натрия ацетилтриптофан	3 года, не выше 25 °С
Зенальб-20	Каприловая кислота	3 года, от 2 до 25 °С
Альбумин человека сывороточный	Натрия каприлат Натрия ацетилтриптофан	3 года, не выше 25 °С
Плазбумин 20	Натрия каприлат N-ацетилтриптофан	3 года, не выше 30 °С

Отечественные производители ЛП АЧ используют в качестве стабилизатора натрия каприлат, срок годности ЛП при этом составляет 5 лет при условии хранения при температуре от 2 до 10 °С [20].

С целью уменьшения содержания АПК в препаратах альбумина человека используют этап адсорбции с помощью кремнеземсодержащих веществ, однако опасность контаминации готового препарата следовыми количествами тяжелых металлов не позволяет широко использовать этот технологический прием [197].

Добавление ингибитора С1-эстеразы и использование процесса пастеризации в течение 10 ч при 60 °С также эффективно снижает вероятность проявления ферментативной активности АПК в препаратах [198]. При добавлении АТШ более 0,03 мг на г белка в ЛП АЧ можно получить высокую степень безопасности в отношении содержания АПК [201]. Инактивации АПК можно достичь использованием химотрипсина. При фракционировании плазмы химотрипсин в растворе или иммобилизованный химотрипсин добавляют к фракции на любой стадии процесса. На дальнейших этапах производства химотрипсин удаляют из полуфабрикатов [199]. При использовании традиционной технологии фракционирования по Кону возможно снижение содержания активатора прекаликрина используя процедуру пастеризации – нагревания в диапазоне температур от 50 до 70 °С в течение не менее 5 часов восстановленной пасты V [177]. В исследованиях Marley P.V. и Gilbo C.M. представлены данные, показывающие, что АПК в большей степени инактивируется на максимуме температурного диапазона процесса пастеризации (60,5 °С), чем при низком уровне (59,5 °С) [176]. Это различие в температуре пастеризации может привести к двух- или трехкратной разнице в содержании АПК в готовом продукте. Пастеризация позволяет инактивировать не только АПК, но и другие белки ПКЧ, выделяемые во фракции II+III при фракционировании по Кону: плазмин, пламиноген, ФСК протромбинового комплекса [161]. Денатурированные белки после пастеризации с успехом удаляются при обработке полиэтиленгликолем. Особые преимущества имеет процедура, сочетающая анионообменную обработку до инактивации вирусов растворителем/детергентом с катионообменной обработкой после инактивации вирусов растворителем/детергентом [121]. Так, технология производства препарата Вигам (BioProducts Laboratory) предусматривает выделение IgG из фракции II с помощью DEAE Sephadex при условиях, когда только примеси, в том числе АПК, адсорбируются, получаемый раствор иммуноглобулина подвергают сольвент-детергентной обработке и последующей хроматографической очистке на катионообменнике CM Sepharose [102].

Регистрация в системе фармаконадзора увеличенного количества тромбозомболических осложнений в 2010 г при применении серий ЛП ИГЧ Октагам, раствор для инфузий 5 %, производства Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес М.б.Х. и всестороннее изучение причин позволило установить факт контаминации указанных ЛС ФСК, инициирующих синтез тромбина с последующим развитием тромбозомболических осложнений в виде инсультов, инфарктов, тромбозов легочной артерии и т.д. В связи с этим, Комиссия ЕФ пересмотрела требования к производству и качеству этих ЛС. Оценку тромбогенного потенциала большинство зарубежных производителей уже зарегистрированных ЛП ИГЧ в соответствии с требованиями регуляторных органов осуществляли на готовой форме ЛС. В зависимости от полученных результатов при необходимости в технологию были внесены соответствующие изменения, гарантирующие элиминацию тромбообразующих агентов. Фармацевтическая разработка новых ЛП ИГЧ предусматривает наличие в производстве стадии освобождения ЛС от тромбинообразующих факторов или целевого выделения действующего вещества с обязательным подтверждением отсутствия тромбогенного потенциала ЛП на этапе доклинического изучения. При условии стабильности производства посерийный контроль в отношении количественного содержания ФСК, протеолитических ферментов, способности к генерации тромбина в различных системах *in vitro* и *in vivo* не осуществляют.

Обработка октановой кислотой на этапах фракционирования позволяет не только снизить вирусную нагрузку, но и обеспечить удаление ФСК II, V, VII, XI и их активированных форм. Пастеризация также позволяет существенно снизить тромбогенный потенциал препаратов иммуноглобулинов человека [161]. Использование многостадийного процесса хроматографической очистки (сочетание катионно- и анионнообменной хроматографии, иммуноселективной хроматографии) после этапов фракционирования позволяет получить препараты иммуноглобулинов человека с высоким профилем безопасности [135]. Например, для исключения контаминации раствора иммуноглобулина АПК и прокоагулянтными ФСК используют этап катионообменной хроматографии при

pH в диапазоне от 3,8 до 5,3 с последующим инкубированием при низких значениях pH готовой формы препарата; а для исключения контаминации калликреином и фактором свертывания крови XI - анионнообменной хроматографии при pH в диапазоне от 7,0 до 8,2 [200].

Технологии получения ЛП из ПКЧ методами хроматографии позволяют выделять большинство терапевтически значимых протеинов с помощью тщательно подобранного набора стадий (Рисунок 8) [98]. При этом полуфабрикаты, содержащие целевые белки, не подвергаются контаминации нежелательными компонентами плазмы крови. Размороженную объединенную в пул фракцию плазмы, полученную после фильтрации через фильтр с диаметром 45 мкм, наносят на колонку SE-хроматографии, заполненную смолой, такой как Sephacryl, Cellufine или других подобных смол. Колонка работает в буфере, содержащем фосфат, цитрат или аналогичные буферные соли в диапазоне pH от 6,0 до 7,5. Молярность буфера - в диапазоне от 20 до 200 мМ, предпочтительно менее 150 мМ. Кроме того, буфер содержит добавку, такую как NaCl в диапазоне от 0,1 до 0,2 М. Из колонки фракции плазмы, не содержащие иммуноглобулин G, перенаправляются в схемах очистки конкретного продукта на этой стадии. Фракция, содержащая иммуноглобулин, подвергается дальнейшему фракционированию на второй анионообменной хроматографической колонке, чтобы отделить другие терапевтические протеины, которые могут присутствовать вместе с иммуноглобулинами в этой фракции плазмы. И в завершение процесса включение иммуноадсорбции позволяет удалить из иммуноглобулиновой фракции нежелательные ГА и анти-D антитела [202].

В настоящее время на российском рынке присутствуют инфузионные препараты иммуноглобулинов человека и альбумина человека, по профилю безопасности соответствующие современным как мировым, так и российским требованиям.

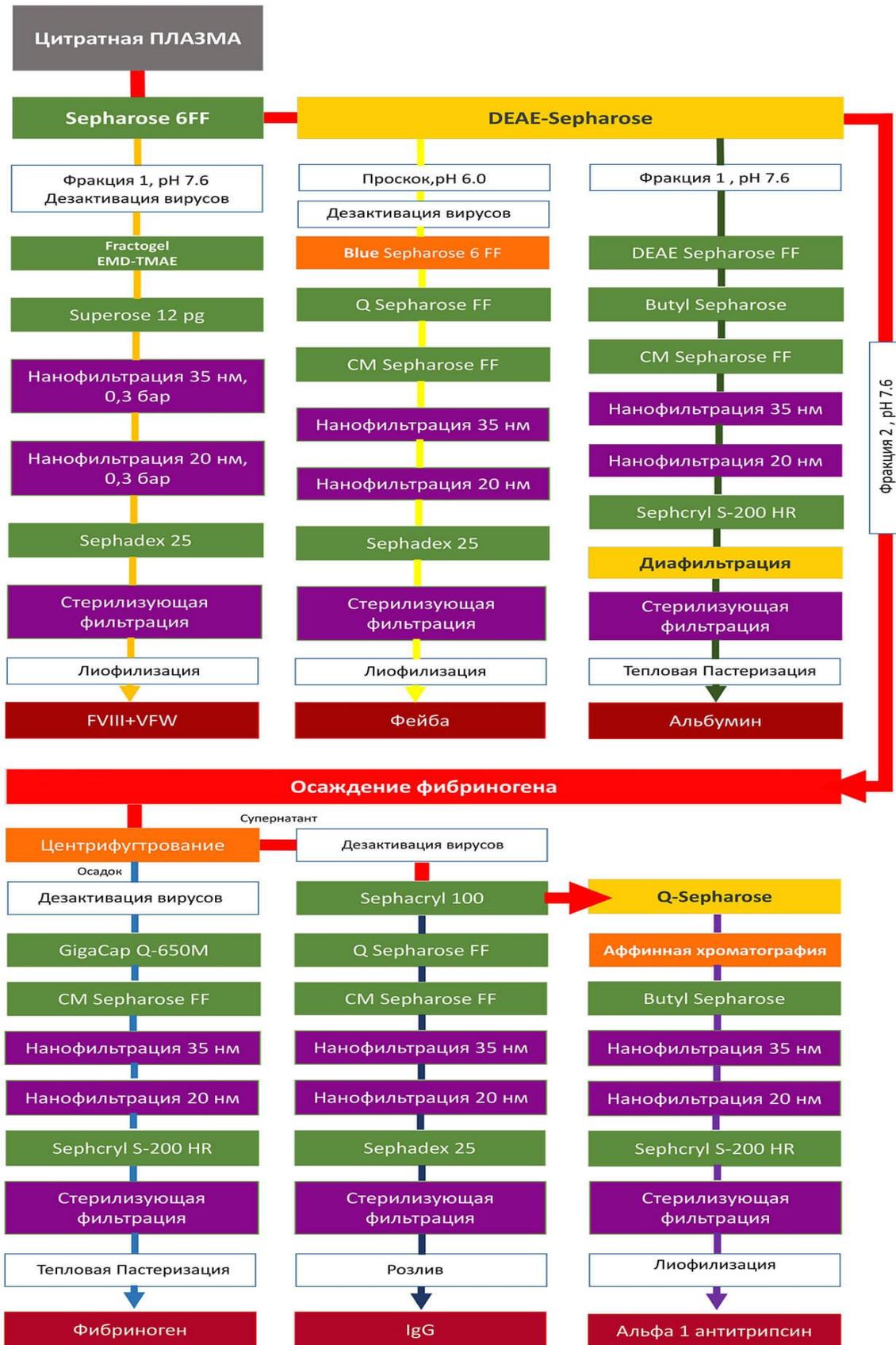


Рисунок 8 - Технологическая схема получения препаратов крови человека с использованием хроматографических методов.

Так, технология препарата Привиджен® (CSL Behring) предусматривает спиртовое фракционирование, обработку октановой кислотой, инкубацию при pH 4,0, глубинную фильтрацию, анионообменную хроматографию, иммуноафинную хроматографию (с целью удаления гемагглютининов) и нанофильтрацию (фильтры с размером пор 20 нм). Производство препарата Флебогамма (Grifols) основано на спиртовом фракционировании, осаждении полиэтиленгликолем с последующей ионообменной хроматографией, сольвент/детергентной обработке, инкубации при pH 4,0, пастеризации и двойной последовательной нанофильтрации (фильтры с размером пор 53 и 20 нм). В основу технологии препаратов Октагам (Octapharma) и Гамунекс® С (Grifols) положено спиртовое фракционирование Кона-Онклея с дальнейшей сольвент/детергентной обработкой, хроматографической очисткой, ультрафильтрацией. В процессе производства препарата Гамунекс® С используется также инкубация при низких значениях pH (4,0) [128, 129, 138, 155].

Следует отметить, что производство перечисленных препаратов является составной частью многогранного процесса фракционирования плазмы и выделения других терапевтически значимых белков. Для отечественного производства инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека характерно использование меньшего количества стадий, в том числе направленных на более избирательное выделение иммуноглобулинов класса G, например, хроматографии. Однако эти технологии также используют в различном сочетании инкубацию при низких значениях pH, сольвент/детергентную обработку, ультра- и нанофильтрацию. Для оценки степени безопасности этих препаратов следует также учитывать качество используемой плазмы. Отвечая требованиям к плазме для фракционирования, пригодной для производства препаратов иммуноглобулинов и альбумина, она не содержит активные факторы свертывания крови. При более интенсивном использовании аферезной плазмы, сохраняющей все биологически активные компоненты, отечественные технологические схемы фракционирования плазмы потребуют усовершенствования с целью повышения безопасности препаратов из ПКЧ.

## **1.2. Научно-методическое обеспечение контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека с позиций их влияния на системы гемостаза, комплемента, калликреин-кининовую и эритроцитарное звено гомеостаза**

Анализ международных требований к ЛП ИГЧ и АЧ позволил установить приоритетные направления развития мировой фармакопейной практики в части совершенствования подходов к обеспечению их качества и унификации методов контроля. Так, требования Европейской фармакопеи (ЕФ) к ЛП ИГЧ (01/2012:0918; 01/2013:0338) и АЧ (01/2013:0255) учитывают особенности производства по элиминации тромбообразующих агентов (ФСК, протеолитические ферменты и т.д.), содержание ГА, анти-D антител, АПК, АКА в соответствии с группировочным наименованием и способом применения при контроле качества ЛП [134]. При этом ЕФ установлены показатели качества ЛП ИГЧ, характеризующие их безопасность: «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-D антитела», «Активатор прекалликреина», «Молекулярные параметры» и «Антикомплементарная активность», ЛП АЧ – «Активатор прекалликреина», нормативные требования которых обусловлены клиническими наблюдениями, позволяющими прогнозировать переносимость указанных ЛП.

В клинической практике систему комплемента изучают с позиций определения наличия всех её компонентов (методом радиальной иммунодиффузии), количественного содержания каждого из них (в основном методом иммуноферментного анализа) и функциональное состояние системы. Для определения функционального состояния комплемента применяют методы по определению её гемолитической активности, выраженной в СН50, в отношении обработанных антителами эритроцитов в системе *in vitro*. При этом оценивается преимущественно классический путь активации комплемента и имеет значение в диагностике иммунодефицитных состояний. Для оценки АКА препаратов ИГЧ наиболее приемлемым считают гемолитический метод на основе классической

реакции связывания комплемента (РСК), предложенной Е.А. Kabat и М.М. Meyer [162]. Реакция основана на использовании сенсibilизированных эритроцитов, активирующих комплемент, который в свою очередь вызывает лизис эритроцитов. Активность комплемента напрямую зависит от количества лизированных клеток и вышедшего из них гемоглобина, её определяют спектрофотометрически, оценивая степень окрашенности реакционной смеси [21, 34, 228].

Среди различных видов млекопитающих и птиц наиболее чувствительными к гемолитическому действию комплемента являются эритроциты барана [21, 227]. Кроме того, благодаря высокой иммуногенности поверхностных антигенов эритроцитов барана, иммунизация ими кроликов позволяет получить гемолизин с высоким титром [107]. В качестве источника комплемента была выбрана сыворотка морских свинок, так как она обладала наибольшей литической активностью. Исключение учета степени гемолиза в «крестах» позволило значительно повысить точность результатов [223].

В настоящее время принято обозначение одной гемолитической единицы в СН50. Одна СН50 соответствует такому количеству комплемента, которое вызывает гемолиз 50 % сенсibilизированных эритроцитов, считая 100 %-ым гемолиз эритроцитов в контрольной пробе, и определяют её посредством графической интерпретации результатов. Следует отметить, что величина СН50 зависит от концентрации ионов Са и Mg в составе буферного раствора, используемого для РСК, значения рН и ионной силы, а также количества используемых эритроцитов [145, 178, 179].

Этот тест считается достаточно сложным для внедрения и стандартизации, так как он подвержен биологической изменчивости в зависимости от таких реагентов, как гемолитическая сыворотка, эритроциты барана, комплемент, а также от используемого оборудования.

Международные требования относительно уровня АКА для ЛП ИГЧ и метода его определения установлены в 1994 г. и до настоящего времени не подвергались изменениям: не более 50 %, что соответствует не более 1 СН50/мг

белка иммуноглобулина [134, 259]. До этого времени и качество препаратов по АКА, и методы её определения варьировали у разных производителей [243]. Монография V.2.1.13 Test for anticomplementary activity of immunoglobulin (ЕФ второго издания, 19 специальный выпуск), регламентировала методику определения АКА с помощью модифицированного метода на основе классической РСК [126]. С целью стандартизации методики был использован СО, положительный и отрицательный контроли которого обеспечивают оценку воспроизводимости результатов. Результатом межлабораторных исследований в 1995 г. стала разработка и аттестация СО иммуноглобулина человека ВРР серия 1. Методика определения АКА, принятая ЕФ, регламентирована к применению большинством зарубежных фармакопей [19, 118, 156].

Для контроля качества ЛП ИГЧ по уровню АКА отечественные производители используют методики, описанные в Методических рекомендациях 1988 г. [34], ФС 42-3159-95 «Иммуноглобулин нормальный человека для внутривенного введения» и Методических указаниях 2001 г. [78], которые не предусматривают использование СО. Кроме того, методики, изложенные в Методических рекомендациях и ФС 42-3159-95, предусматривают определение АКА как «сохранение активности 2 гемолитических единиц в присутствии 10 мг белка иммуноглобулина», что не позволяет оценить соответствие качество ЛП по этому показателю с международными требованиями. Для методики, изложенной в Методических указаниях, характерно использование большего объема реакционной смеси, чем это предусмотрено ЕФ, сухого (коммерческого) компонента морских свинок, вместо пулированного компонента, хранящегося в замороженном состоянии. Эти обстоятельства не позволяют сравнить качество отечественных ЛП ИГВ с зарубежными по показателю «Антикомплементарная активность». В условиях гармонизации российских фармакопейных требований с международными стандартами необходимо проведение унификации и стандартизации отечественной методики определения АКА в ЛП ИГЧ с учетом доступности и стандартности реагентов.

Количественная оценка содержания агрегатов в ЛП ИГЧ также позволяет контролировать допустимый уровень АКА. Исследования Buchaheer и соавт. (2010) и Ramasamy и соавт. (1997) продемонстрировали как механизм формирования агрегатов оказывает влияние на степень их комплементсвязывающей активности: агрегированные нагреванием в кислой среде (рН 4,2) молекулы иммуноглобулинов связывают комплемент морских свинок слабо; тот же процесс нагревания, осуществленный в нейтральной среде (рН 7,0), вызывает образование агрегатов, обладающих высокой антикомплемтарной активностью [119, 209]. В исследованиях Buchaheer и соавт. (2010) было показано, что нагревание вызывает образование крупных агрегатов, которые могут быть выявлены только с помощью детектора рассеивания света [119]. Эксклюзионная хроматография позволяет лишь установить количество агрегатов в общем пике с полимерами. Тем не менее, до тех пор, пока измерение с помощью детектора рассеивания света не может быть выполнено количественно, оба метода должны быть использованы для характеристики молекулярно-массового распределения молекул ЛП ИГЧ.

Для количественной оценки активированных препаратами ИГЧ компонентов системы комплемента, например, С4а некоторые исследователи применяют методы радиоиммунологического и иммуноферментного анализа, однако в настоящее время эти методики широкого применения не нашли.

В трансфузиологии основным методом определения эритроцитарных антигенов (систем АВО, резус) является реакция гемагглютинации [39]. Антитела к этим антигенам также могут быть выявлены методом гемагглютинации с использованием соответствующих тестовых эритроцитов. Скорость и выраженность агглютинации зависят от числа эритроцитов, концентрации антител, температуры и ионной силы раствора. Механизмы протекания реакции прямой гемагглютинации, вызванной иммуноглобулинами различных классов, отличаются: иммуноглобулины класса М, несущие 10 участков связывания, вызывают агглютинацию эритроцитов даже в физиологическом растворе, а иммуноглобулины класса G не могут вызвать агглютинацию при

непосредственном воздействии, пока отрицательный заряд эритроцитов не будет снижен с помощью какого-либо высокомолекулярного вещества, либо не будут удалены сиаловые кислоты для увеличения доступности антигена [23]. Для выявления Ig G, которые являются неполными антителами, также применяют метод непрямой гемагглютинации, в ходе которого на первом этапе сенсibiliзируют эритроциты гемагглютинидами, а уже агглютинация сенсibiliзированных происходит вследствие внесения античеловеческого поливалентного иммуноглобулина.

Еще в 70-80-х годах прошлого века, на этапах становления принципов терапии препаратами ИГЧ, была выявлена значительная вариабельность содержания в них ГА и анти-D антител в зависимости от производителя [190, 193, 229]. Так, содержание анти-A ГА могло достигать титра 1:128, анти-B – 1:64, а анти-D антител - 1:256. При таком содержании антиэритроцитарных антител даже невысокие дозы ЛП ИГЧ приводили к возникновению гемолиза у определенных групп пациентов. В связи с этим, международными экспертами была признана необходимость нормирования содержания в препаратах ИГЧ анти-A и анти-B ГА, а также анти-D антител.

Допустимый предел содержания ГА соответствует разведению ИГЧ 1:32, в котором выявляется агглютинация тестовых эритроцитов. Эту величину определяют как титр гемагглютининов. Впервые содержание анти-A и анти-B ГА в препаратах ИГЧ было регламентировано в 80-х годах прошлого столетия. Вплоть до 2012 г. в ЕФ был предусмотрен один метод определения – непрямой гемагглютинации. Однако несмотря на использование этого метода всеми мировыми производителями при сравнительном исследовании препаратов ИГЧ отмечалась значительная вариабельность результатов [109, 246, 237]. По мнению Thorpe S.J. метод непрямой гемагглютинации как метод контроля качества препаратов ИГЧ имеет значительные недостатки: высокие концентрации гемагглютининов могут нейтрализовать антиглобулиновую сыворотку, неправильно проведенная процедура «отмывания» сенсibiliзированных эритроцитов приводит к повреждению структуры их поверхностных антигенов [235, 238]. Эти

обстоятельства обуславливают получение заниженных результатов. В то же время, использование для контроля реакции клеток Кумбса (сенсibilизированные резус-положительные эритроциты группы 0(I), а также соблюдение режима центрифугирования при подготовке сенсibilизированных эритроцитов позволяют исключить занижение результатов. Тем не менее, специалисты NIBSC под руководством Thorpe S.J., учитывая опыт разработки модифицированного метода для оценки содержания анти-D антител, предложили аналогичный метод оценки содержания ГА в препаратах ИГЧ на основе реакции прямой гемагглютинации. Актуальная версия ЕФ регламентирует использование методов непрямой (монография 2.6.20, метод В) и прямой (монография 2.6.20, метод А) гемагглютинации, причем количественное определение рекомендовано в реакции прямой гемагглютинации [134]. Оба метода предусматривают использование эритроцитов группы крови А(II) наиболее иммуногенной подгруппы А<sub>1</sub> для выявления анти-А ГА и группы крови В(III) для выявления анти-В гемагглютининов. При выполнении метода НПГ предусмотрено предварительное разведение испытуемого образца препарата ИГЧ до содержания белка иммуноглобулина 30 мг/мл, которое в дальнейшем не учитывается при определении титра. Методика подготовки ЛП ИГЧ при определении содержания ГА методом ПГА предусматривает разведение образца до содержания белка 25 мг/мл, которое вне зависимости от исходного содержания белка в ЛП считают разведением 1:2. Для повышения чувствительности реакции ПГА также необходима предварительная обработка эритроцитов папаином, а реакционная среда должна содержать бычий сывороточный альбумин. На практике модифицированный метод ПГА также выявил существенные недостатки: способность эритроцитов связывать ГА зависит от методики обработки их папаином; момент времени, оптимальный для оценки агглютинации и определения титров ГА, варьирует в различных лабораториях [108].

Монография ЕФ предусматривает проведение гемагглютинации макрометодом, т.е. «на плоскости». Субъективность визуальной оценки результатов значительно снижает точность получаемых результатов. Более

объективным вариантом метода гемагглютинации является гелевая технология, которая уже широко применяется в трансфузиологии. Для оценки качества препаратов ИГЧ по содержанию ГА ряд исследователей считает применение гелевых карт наиболее оптимальным [226].

Допустимость использования двух методов (прямой и непрямой гемагглютинации) изучения содержания ГА в препаратах ИГЧ не позволяет в полной мере достоверно оценить уровень безопасности применения конкретного препарата, в том числе в сравнении с аналогами. Следует отметить, что усовершенствование метода контроля препаратов ИГЧ не привело к снижению количества гемолитических осложнений иммуноглобулинотерапии, связанных с содержанием гемагглютининов. В ряде случаев осложнения были связаны с применением препаратов ИГЧ соответствующих нормативным требованиям по содержанию гемагглютининов, но с более высоким содержанием белка (10 мг/мл) [159]. Инфузии таких препаратов на практике приводят к введению в организм пациента большего количества гемагглютининов, нежели это происходит при применении растворов иммуноглобулинов с содержанием белка 50 мг/мл. Одним из возможных путей решения этой проблемы может быть снижение допустимого предела содержания гемагглютининов в препаратах ИГЧ, а также оптимизация методики их определения с учетом исходного содержания белка иммуноглобулина в препарате.

В период массового изготовления ЛП ИГЧ и АЧ из плацентарной и абортной крови остро стоял вопрос о контроле качества указанных препаратов по содержанию групповых веществ крови секреторного (плацента) и эритроцитарного происхождения [70]. Метод их оценки был основан на реакции торможения гемагглютинации, позволяющей установить полуколичественное содержание групповых антигенов; содержание ГА этим методом установить невозможно.

Российские стандарты качества на ЛП ИГЧ: ФС 42-3159-95 «Иммуноглобулин нормальный человека для внутривенного введения», а также ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные

положения», Приложение N 2 перечень разделов фармакопейных статей и фармакопейных статей на лекарственные средства конкретных предприятий - производителей лекарственных средств на иммуноглобулины человека (п. XV) не предусматривают контроль готовой формы ЛП по содержанию ГА [94]. ГФ РФ также не содержит ОФС на методы контроля качества ЛП ИГЧ. Тем не менее, нормативная документация ЛП ИГЧ для внутривенного введения двух торговых наименований отечественных производителей регламентируют требования по содержанию ГА – «Титр – не более 1:64», метод контроля – непрямая гемагглютинация и «Титр – не более 1:32», метод контроля – реакция гемагглютинации. Используемые методики значительно отличаются друг от друга и не сопоставимы с методом, изложенным в ЕФ. Так, в одном случае (в соответствии с НД, утвержденной в 2008 г.) оценку содержания ГА методом гемагглютинации осуществляют следующим образом:

а) образец ЛП после разведения до содержания белка 30 мг/мл в 5 % растворе глюкозы прогревают в течение 10 мин при температуре 70 °С (исходное содержание белка 50 мг/мл);

б) реакцию агглютинации проводят в лунках 96-луночного планшета (без указания конфигурации дна и связывающей способности поверхности лунки);

в) дальнейшие двукратные разведения осуществляют с использованием веронал-мединалового буферного раствора;

г) используют 2 % суспензию эритроцитов в веронал-мединаловом буферном растворе;

д) инкубацию смеси эритроцитов и разведений образца ЛП ИГЧ осуществляют при температуре 37 °С в течение 1 ч;

д) оценивают степень агглютинации визуально по наличию или отсутствию осадка на дне лунки.

В соответствии с указаниями НД на другой ЛП ИГЧ, утвержденной в 2011 г., содержание ГА определяют в реакции НГА двумя методами (в пробирках или с использованием гелевых карт):

а) готовят двукратные разведения ЛП ИГЧ с использованием 0,9 % раствора натрия хлорида без предварительного разведения образца до содержания белка 30 мг/мл (исходное содержание белка 50 мг/мл);

б) в пробирочном методе используют 5 % суспензию эритроцитов в 0,9 % растворе натрия хлорида, гелевой технологии – коммерческие стандартные эритроциты;

в) в пробирочном методе инкубацию при 37 °С для сенсibilизации эритроцитов осуществляют в течение 30 мин, при использовании гелевой технологии – 15 мин при тех же условиях;

г) соотношение реагентов в пробирочном методе: 0,5 мл разведения испытуемого образца+0,5 мл суспензии эритроцитов; после отмывания эритроцитов и декантации к осадку добавляют 0,2 мл антиглобулиновой сыворотки; гелевой технологии – 0,050 мл суспензии эритроцитов+0,025 мл разведений образца;

д) в пробирочном методе после добавления антиглобулиновой сыворотки проводят инкубацию при 37 °С в течение 30 мин, затем проводят оценку агглютинации (без указания допустимого временного интервала); при осуществлении гелевой технологии после инкубации пробирки центрифугируют в запрограммированном режиме на специальной центрифуге и оценивают агглютинацию.

Анализ отечественной научной литературы позволил установить наличие различных методических подходов к оценке содержания ГА. Так, Анастасиев В.В. в монографии [3] предлагает метод НГА с использованием буферного раствора низкой ионной силы, инкубацией смеси разведений испытуемого образца и суспензии эритроцитов для их сенсibilизации в течение 2 ч при 37 °С, а после добавления антиглобулиновой сыворотки – в течение 10 мин при тех же условиях. Указанная методика содержит указания о проведении контроля качества буферного раствора низкой ионной силы (отсутствие гемолиза или агглютинации при добавлении суспензии эритроцитов в соотношении объемов 2:1) и контроля

специфичности реакции (агглютинация эритроцитов при добавлении антиглобулиновой сыворотки в соотношении объемов 1:2).

Таким образом, отечественные стандарты качества на ЛП ИГЧ не содержат требования по содержанию ГА, отсутствуют соответствующие унифицированные и стандартизованные фармакопейные методики контроля качества ЛП.

Для исключения гемолитических осложнений иммуноглобулинотерапии в международную практику производства препаратов ИГЧ с 2006 г. введено нормирование содержания анти-D антител. Регламентированное ЕФ содержание анти-D антител в препаратах ИГЧ не должно превышать титр положительного стандарта [134]. Положительный стандарт содержит анти-D антитела в количестве, соответствующем антирезусной активности 0,0475 МЕ/мл (агглютинация в разведении 1:8). Эта величина расчетная, так как стандарт получен разведением в 6000 раз международного стандарта антирезусного иммуноглобулина с активностью 285 МЕ/мл в растворе иммуноглобулина человека нормального с содержанием белка 50 мг/мл. Установлено предельное содержание анти-D антител в ЛП ИГЧ на основе данных исследований причин НР гемолитического характера, позволивших установить, что при титре 1:8, что соответствовало содержанию специфических антирезусных (анти-D) антител положительного контроля 0,05 МЕ/мл, вероятность развития гемолиза ничтожно мала [204].

Учитывая, что анти-D антитела являются неполными антителами, принадлежащими к классу Ig G, для выявления антиэритроцитарных антител использовали метод непрямой гемагглютинации. Однако дальнейшие исследования специалистов Национального института биологических стандартов и контроля под руководством Thorpe S.J. позволили разработать метод оценки содержания анти-D антител на основе реакции прямой гемагглютинации [238]. Согласно этой методике для получения адекватного результата необходимо соблюдение ряда условий. Во-первых, предпочтительно использование эритроцитов фенотипа 0R2R2 (ccDEE), но возможно также применение эритроцитов фенотипов 0R1R1 (CCDee) и 0R1R2 (CcDEe). Это обусловлено тем,

что минорные антигены с и Е системы резус более иммуногены по сравнению с антигенами С и е. Во-вторых, для контроля специфичности анализа следует применять D-отрицательные эритроциты фенотипа 0rr. Поскольку на поверхности эритроцитов с данным фенотипом отсутствует D антиген, агглютинации эритроцитов быть не должно, однако, при наличии у этих эритроцитов К-антигена возможна слабая агглютинация (не более чем в разведении 1:2) как при использовании положительного стандарта, так и ИГЧ. В-третьих, для повышения чувствительности реакции гемагглютинации предусмотрена предварительная обработка эритроцитов протеолитическим ферментом папаином. Вследствие отрицательного поверхностного заряда эритроциты отталкиваются друг от друга, а папаин способствует удалению большинства составляющих клеточной мембраны, обуславливающих ее отрицательный заряд (остатки сиаловых кислот на гликофоринах А, В, С, D) [22]. В мировой практике описаны случаи обработки эритроцитов другими протеолитическими ферментами (трипсин, бромелин, папаин), однако для определения неполных анти-D антител системы резус использование папаина, который является цестиновой протеазой, выделяемой из латекса папайи, более эффективно [151]. В-четвертых, при проведении испытаний в реакционную среду следует добавлять бычий сывороточный альбумин, который способствует снижению электрической активности поверхности клеток и соответственно возрастает вероятность агглютинации резус-положительных клеток антирезусным IgG. Подготовка испытуемого образца унифицирована для препаратов ИГЧ с различным содержанием белка иммуноглобулина таким образом, что разведение до содержания белка в образце 25 мг/мл считают разведением 1:2, даже если это не соответствует действительности. Например, при использовании препаратов ИГЧ с содержанием белка 100 мг/мл приготовление образца с содержанием белка 25 мг/мл также будет считаться разведением 1:2, как и в случае исходного содержания белка в ЛП ИГЧ 50 мг/мл.

Современные достижения в области изучения структуры и функции иммуноглобулинов позволяют определять содержание анти-D антител в препаратах ИГЧ более сложными и точными методами, например проточной

цитофлюориметрии [234, 195], иммуноферментного анализа [235]. Однако их использование неоправданно усложнит контроль препаратов и, соответственно, повысит их себестоимость.

Впервые требования, касающиеся содержания АПК были установлены Европейской фармакопеей еще в 1998 г. [221]. В настоящее время требования по содержанию АПК в инфузионных препаратах ИГЧ и АЧ установлены на уровне не более 35 МЕ/мл [134]. Нормативные требования содержания АПК в указанных препаратах зарубежного производства, зарегистрированных на территории РФ, находятся на уровне от «не более 10 МЕ/мл» до «не более 35 МЕ/мл», при этом методические подходы определения значительно отличаются. Следует отметить, что при определении содержания АПК в ЛП ИГЧ предусматривается приготовление предварительного разведения до содержания белка 30 мг/мл, в препаратах альбумина человека АПК определяют в неразведенном ЛП.

Хромогенный метод определения содержания АПК в фармакопеех разных стран представлен методами кинетического определения или с использованием стоп-реагента [118, 122, 134]. Анализ соответствующих монографий позволил выявить параметры, требующие уточнения и/или оптимизации: характеристики используемого прекалликреина и его пробоподготовка; соотношение испытуемого образца и прекалликреина в инкубационной смеси, время инкубации, количество хромогенного субстрата. Указанные параметры должны обеспечивать линейный характер зависимости регистрируемой скорости реакции от концентрации АПК в интервале значений калибровочной кривой до 35 МЕ/мл. С 80-х годов прошлого столетия сохранилась тенденция использования прекалликреина (ПК), выделенного в лабораторных условиях из плазмы крови человека [134]. Однако процедура изготовления ПК в ряде случаев недоступна производителям по причине отсутствия необходимого оборудования и не применима в испытательных лабораториях, осуществляющих контроль лекарственных препаратов крови с целью подтверждения соответствия требованиям нормативной документации. Кроме того, характеристики этого реагента, производимого в различных лабораториях, отличаются. В настоящее

время доступны для использования коммерческие импортные реагенты прекалликреина разных производителей, но информация об особенностях их пробоподготовки в сертификатах анализа отсутствует. Для адекватного использования хромогенного субстрата необходимо учитывать соответствующее соотношение его количеству калликреина, образованного в ходе взаимодействия АПК и прекалликреина, в тоже время инструкция по применению хромогенного субстрата S-2302 не содержит информации о критериях выбора концентрации субстрата. Анализ литературных данных свидетельствует об использовании субстрата в широком диапазоне концентраций (от 0,6 до 2 мМ) [131, 220, 221].

В соответствии с монографией ЕФ 2.6.15 Prekallikrein activator определение АПК проводят в несколько этапов: на первом этапе к определенному количеству исследуемого образца и соответствующего разведения СО добавляют определенное количество прекалликреина (рекомендуемое соотношение образец/прекалликреин составляет 1:9, необходимо для исключения ошибок, связанных с изменением ионной силы и значением рН инкубационной смеси) с последующей инкубацией при 37 °С в течение заданного времени [134, 240]. Буферный раствор с рН 8,0±0,05 и 0,15 М натрия хлорида создает надлежащую ионную силу. Проведенный анализ методических подходов к определению АПК позволил выявить различия в соотношении образец/прекалликреин инкубационной смеси (от 1:4 до 1:10) на первом этапе образования калликреина. Время инкубации также варьирует, несмотря на то, что инкубация при 37 °С в течение 10 мин является наиболее распространенной, отдельные производители увеличили инкубационный период до 45 мин. Возможно данное увеличение было оптимизировано для конкретного метода или характеристик прекалликреина, используемых производителями. Однако существует опасность того, что более длинные периоды инкубации могут исчерпывать прекалликреин и привести к неадекватной оценке содержания АПК

Использование прекалликреина собственного изготовления, согласно ЕФ, указано в методиках 77 % инфузионных препаратов ИГЧ и 67 % препаратов АЧ зарубежного производства, зарегистрированных на территории РФ [20]. Качество

ПК устанавливают путем измерения отсутствия калликреиновой активности [134]. ПК из коммерческих источников (Coachrom Diagnostica, American Diagnostica GmbH и др.) используется в методиках 23 % инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека и 33 % препаратов альбумина человека зарубежного производства, хотя неизвестно, насколько сравнимы используемые реагенты ПК.

На втором этапе смесь или ее часть инкубируют в присутствии, по меньшей мере, равного объема раствора подходящего хромогенного субстрата, обладающего известной специфичностью к калликреину. Во всех проанализированных методиках определения АПК используется хромогенный субстрат S-2302 производства Chromogenix.

Учет результатов проводят во временном интервале от 2 до 10 мин, регистрируя скорость изменения оптического поглощения в минуту (кинетический метод) при длине волны 405 нм или по конечной точке с использованием 50 % раствора уксусной кислоты.

Российские стандарты качества не регламентируют определение содержания АПК в ЛП из ПКЧ, отсутствуют унифицированные и стандартизованные методики. Возможным решением проблемы может быть использование набора реагентов PreKallikrein Assay Kit (Pathway Diagnostics Ltd, Великобритания) [97, 206]. Этот набор разработан на основе метода ЕФ, однако он является дорогостоящим реагентом импортного производства, зависимость от которого в ряде случаев может привести к невозможности проведения контроля качества препарата отечественными производителями [41]. Кроме того, в инструкции по применению этого набора регламентировано также одновременное использование соответствующих контролей, которые также выпускает зарубежный производитель Pathway Diagnostics Ltd.

Оценку тромбогенного потенциала большинство зарубежных производителей уже зарегистрированных ЛП ИГЧ в соответствии с требованиями регуляторных органов осуществляли на готовой форме ЛС. В зависимости от полученных результатов при необходимости в технологию были внесены соответствующие изменения, гарантирующие элиминацию тромбообразующих

агентов. Фармацевтическая разработка новых ЛП ИГЧ предусматривает наличие в производстве стадии освобождения ЛС от тромбинообразующих факторов или целевого выделения действующего вещества с обязательным подтверждением отсутствия тромбогенного потенциала ЛП на этапе доклинического изучения. При условии стабильности производства посерийный контроль в отношении количественного содержания ФСК, протеолитических ферментов, способности к генерации тромбина в различных системах *in vitro* и *in vivo* не осуществляют.

В клинической практике для целей изучения свертывающей системы крови человека и её функциональной активности применяют множество тестов. Для оценки тромбогенного потенциала препаратов иммуноглобулинов человека производителями Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес, Биотест Фарма, Института Грифолз, выбраны три основных параметра:

- изменение кинетики образования тромбина стандартной (нормальной) плазмы крови человека в тесте генерации тромбина;
- активность прокоагулянтных факторов свертывания крови;
- изменение неактивированного частичного тромбопластинового времени стандартной (нормальной) плазмы крови человека [161, 212, 247].

Генерация тромбина является ключевым процессом, который определяет степень гемостатических изменений и имеет решающее значение для формирования фибринового сгустка. Традиционно система свертывания обычно изучают классическими тестами крови *in vitro*: активированное частичное тромбопластиновое время и протромбиновое время. Недавняя разработка новых тестов на основе непрерывной регистрации генерации тромбина в условиях *in vitro*, имитирующих более точно то, что происходит в естественных условиях, позволяет исследовать баланс между прокоагулянтной и антикоагулянтной активностью у больных с различными нарушениями гемостаза [112].

Изучение кинетики образования тромбина возможно как с использованием оригинального теста генерации тромбина Technotrombin TGA (Technoclone) с флуоресцентной детекцией результатов, так и с использованием методики INNOVANCE® ETP (Siemens), которая является усовершенствованным

вариантом оригинальной методики и позволяет определять максимальное количество тромбина, латентный период генерации тромбина и период образования максимального количества тромбина (Рисунок 9) [80].

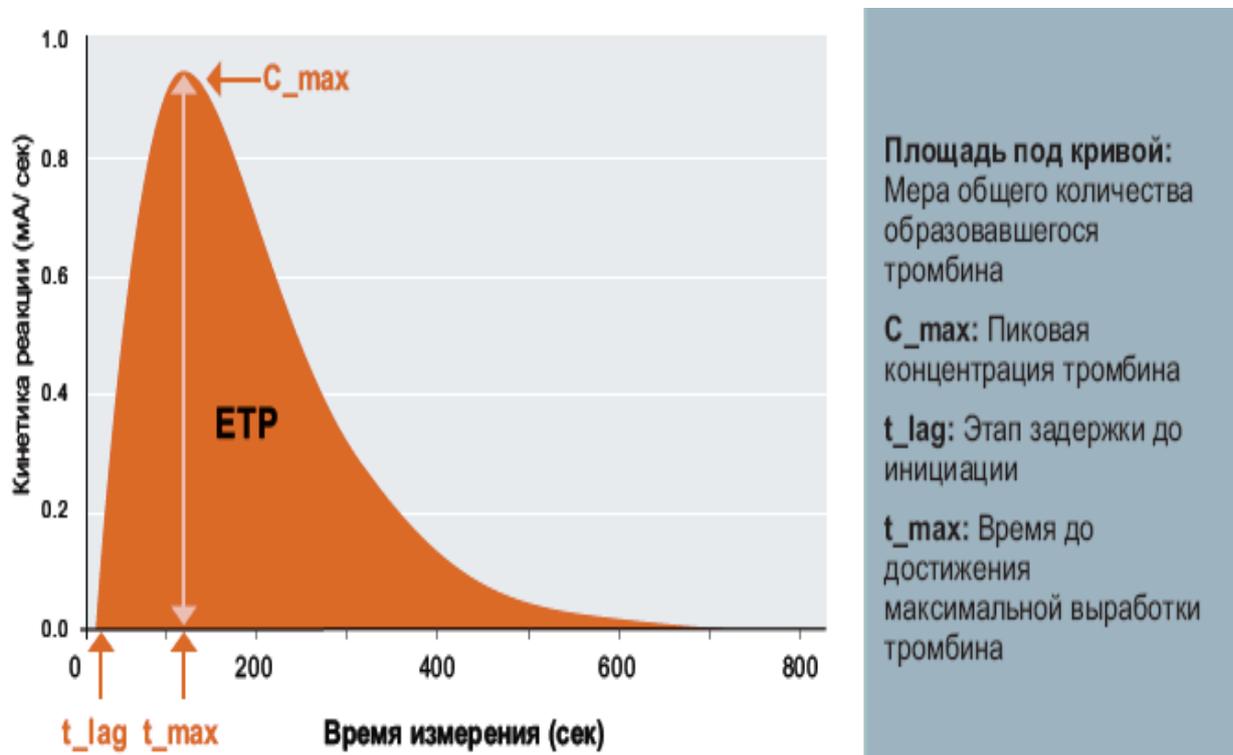


Рисунок 9 – Результат определения тромбинового потенциала по различным параметрам методикой INNOVANCE® ETP

Еще одним способом оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ может быть изучение способности к генерации тромбообразования на животных. Моделирование тромбозов осуществляется с целью оценки эффективности препаратов, обладающих антикоагулянтным действием. В основу методов положено воспроизведение триады Вирхова: повреждение эндотелия, повышенная свертываемость крови и замедление кровотока (таблица 3) [67, 92, 248 – 252].

Метод S.Wesslera нашел свое применение в различных модификациях при доклиническом изучении ряда ЛП.

Таблица 3 - Модели тромбоза вен

Автор метода	Модельные животные	Реагент, вызывающий гиперкоагуляцию	Модель замедления кровотока	Кровеносные сосуды,
S. Wessler	Кролики	Гетерологичная сыворотка или раствор тканевого тромбопластина	Стаз	Крупные вены
K.Ungersöbck	Крысы	Каолин-кефалиновая смесь	Стаз	Поперечный синус (мозговой)
J.Zhou	Крысы	Не используется	Стаз	Каудальная полая вена
J.A.Diaz	Крысы	Раствор хлорида железа	Стаз или стеноз	Каудальная полая вена
J. Herbert	Крысы	Раствор тканевого тромбопластина	Стаз	Каудальная полая вена

Так, для моделирования венозного тромбоза с целью изучения фармакологического действия ЛП антикоагулянтного действия Wienen W. с соавт. использовали кроликов пород New Zealand White Chbb, NZW или Chinchilla Chbb весом 2,8 - 3,2 кг после обезболивания введением 2,0 мл хлорида ксилазина (BayerVital, Leverkusen, Германия, Rompun 2%) и 1,0 мл кетамина гидрохлорида (Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Германия; Ketavet 100 мг мл<sup>-1</sup>). Эндотелиальное повреждение в сегменте бедренных вен вызвали заполнением его раствором 0,5% полидоканола, сужение просвета вен – путем наложения лигатур. Тромбы оценивали по весу после извлечения из вен и просушивания [254].

Наиболее приемлемой моделью для оценки тромбогенного потенциала препаратов иммуноглобулинов человека является модель S.Wesslera, которая позволяет оценивать препараты в дозе, адекватной разовой дозе для пациента в пересчете на кг веса [144, 251]. Анализ данных литературы свидетельствует о различиях в методиках по способу анестезии, методам выделения яремной вены,

количеству и скорости введения ЛП ИГЧ кролику, а различаются критерии оценки образовавшихся тромбов (по весу, по размеру).

Таким образом, анализ международных требований к ЛП ИГЧ и АЧ позволил установить приоритетные направления развития мировой фармакопейной практики в части совершенствования подходов к обеспечению их качества и унификации методов контроля. Так, требования Европейской фармакопеи к ЛП ИГЧ (01/2012:0918; 01/2013:0338) и АЧ (01/2013:0255) учитывают особенности производства по элиминации тромбообразующих агентов (ФСК, протеолитические ферменты и т.д.), содержание ГА, анти-D антител, АПК, АКА в соответствии с группировочным наименованием и способом применения при контроле качества ЛП. При этом ЕФ установлены показатели качества ЛП ИГЧ, характеризующие их безопасность в отношении остаточного содержания компонентов исходного сырья – плазмы крови человека: «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-D антитела», «Активатор прекалликреина», «Молекулярные параметры» и «Антикомплементарная активность», ЛП АЧ – «Активатор прекалликреина», нормативные требования которых обусловлены клиническими наблюдениями, позволяющими прогнозировать переносимость указанных ЛП.

Отечественные стандарты качества на ЛП ИГЧ и АЧ характеризуются противоречивостью и существенно отличаются от международных. Так, в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» в качестве показателей специфической безопасности ЛП ИГЧ для внутривенного введения указаны испытания на отсутствие вирусной контаминации, антикомплементарность и оценка гипотензивного действия для комбинированных с гистамином ЛП ИГЧ.

В тоже время, ФС 42-3159-95 «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения» относительно показателей специфической безопасности устанавливает нормативные требования только по АКА, которые не соответствуют международным стандартам качества, как и методика контроля по этому показателю. ФС 42-122-04 «Альбумин человека» не содержит требований

по контролю содержания АПК. ФС 42-3198-95 «Иммуноглобулин человека нормальный» регламентирует качество только ЛП для внутримышечного введения, в тоже время подкожное применение ИГЧ сопровождается более серьезными побочными реакциями, и требует проведения дополнительных испытаний по содержанию антиэритроцитарных антител.

Спецификация отечественных ЛП ИГЧ для внутривенного введения не содержит весь спектр показателей качества, характеризующих количественное содержание компонентов плазмы крови человека: ГА, анти-D антител, АПК; оценка качества ЛП АЧ российского производства по АПК также не предусмотрена; методическое обеспечение контроля содержания ГА, анти-D антител, АПК в ЛП ИГЧ и АЧ в РФ также отсутствует

### **1.3. Современные подходы к стандартизации методов контроля лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека**

Применение СО позволяет выполнять задачи метрологического обеспечения методик оценки качества ЛП и оценивать сопоставимость полученных результатов, обеспечивая необходимую точность и прослеживаемость измерений [5, 10, 11, 96].

Международная практика изготовления и применения СО для контроля качества препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека, свидетельствует о значительной вариабельности методических подходов [44]. Для оценки предельного или превышающего предельное содержание ГА, АПК, анти-D антител, также как и для определения уровня АКА в диапазоне более 50 %, необходимы СО, несоответствующие по этим показателям качества требованиям НД на препараты. СО ЕФ (BRP) и международные (NIBSC) представляют собой серию лекарственного средства иммуноглобулина или альбумина человека, выпущенную без нарушений технологического процесса. Для достижения соответствующего аттестованного значения далее производитель СО

осуществляет дополнительную «обработку материала (также называемую "изготовление" или "приготовление")» или подбор условий его применения.

Методика определения АКА сопряжена с рядом критических параметров, связанных с использованием биологических реагентов, таких как, комплемент морских свинок, эритроциты барана и гемолитическая сыворотка, вариабельность которых обуславливает необходимость использования СО, положительный и отрицательный контроли которого подтверждают достоверность получаемых результатов в различных диапазонах значений АКА. СО для определения АКА ЛП ИГЧ, утвержденный Комитетом экспертов ВОЗ по биологической стандартизации, отсутствует. В настоящее время разработано и аттестовано достаточно большое количество СО Европейской и Британской фармакопей. В международной практике для определения АКА ЛП ИГЧ используют СО иммуноглобулина человека ВРР, который является СО ЕФ, утвержден Европейским директором по качеству лекарственных средств и здравоохранения [217]. Анализ НД на ЛП ИГЧ зарубежного производства, зарегистрированные на территории РФ, свидетельствует о применении производителями непосредственно СО ЕФ [53, 54]. В тоже время, ВОЗ ограничивает использование международных и фармакопейных СО для рутинного контроля качества препаратов. Эти СО должны использоваться для аттестации национальных СО [258].

В международной практике СО иммуноглобулина человека в методике определения АКА применяют более 20 лет, в течение которых изготовлено и аттестовано 5 серий СО (таблица 4) [55, 56]. Четыре из этих серий имели назначение не только для определения АКА, но и для оценки молекулярных параметров и/или Fc-функции иммуноглобулина. Указанные СО представляют собой лиофильно высушенный раствор высокоочищенного ИГЧ. Для применения лиофилизат растворяют в соответствующем объеме воды очищенной до получения раствора с расчетным содержанием белка 50 мг/мл. Условием для получения значений в диапазоне более 50 % (положительный контроль) является увеличение количества исходного восстановленного раствора СО. В зависимости

от серии в методике определения АКА контроли формируются использованием исходного раствора СО в количестве 0,2 мл (отрицательный) и 0,6 мл (положительный) или 0,2 и 0,8 мл, соответственно.

Таблица 4 - Стандартные образцы иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи

№ серии (кат. №)	Год утверж- дения	Количество во флаконе, г (объем растворителя, мл)	Аттестованный диапазон значений антикомplementарной активности, %		Дополнительн ый аттестованный параметр
			Отрицательный контроль	Положительный контроль	
1 (Н1000000)	1995	0,5 (10,0)	5-35	50-100	Молекулярные параметры и Fc-функции иммуногло- булина
2 (Н0990000)	2001	1,0 (20,0)	10-30	50-100	Молекулярные параметры и Fc-функции иммуногло- булина
3 (Н0990000)	2005	6,0 (105,4)	10-40	60-100	Fc-функции иммуногло- булина
1 (Y0001504)	2011	6,0 (105,4)	10-40	60-100	Молекулярные параметры
1 (Y0001994)	2018	10,0 (180,4)	10-40	60-100*	–
Примечание: * – объем пробы увеличен с 0,6 мл до 0,8 мл					

Учитывая большой объем, получаемый при восстановлении СО (от 105,4 до 180,4 мл для разных серий, применимых в период с 2005 г.) и короткий срок хранения (14 сут. при температуре 2 – 8 °С) при малом расходе на одно определение (0,8 мл) использование этого СО не может быть рациональным.

Уровень АКА в положительном контроле повышается не за счет увеличенного содержания агрегированных/конформационно измененных молекул белка иммуноглобулина, которые и являются пусковым механизмом каскада активации системы комплемента в организме пациента при иммуноглобулинотерапии, а за счет увеличения количества белка

иммуноглобулина в методике РСК, используемой для оценки качества препарата по уровню АКА. Для отрицательного контроля может использоваться любая серия ИГЧ, соответствующая требованиям НД по АКА. Аттестованные значения АКА этого СО находятся в широком диапазоне и вне зависимости от серии составляют 10-40 % и 60-100 % для отрицательного и положительного контролей соответственно.

Несмотря на то, что в аттестационных исследованиях СО иммуноглобулина человека BRP как правило участвует несколько лабораторий (от 7 до 17) анализ публикаций, содержащих первичные данные с результатами исследований, свидетельствует о том, что у некоторых лабораторий, принимающих участие в испытаниях, получены значения АКА для отрицательного и положительного контролей не соответствующие заданному диапазону, которые в дальнейшем не учитываются в статистической обработке результатов. Коэффициент вариации: для отрицательного контроля при этом составлял – 33 %, для положительного контроля – 15 % [216]. В ходе предварительных исследований исходного материала - кандидата в СО (серия 1, кат. № Y0001994) показано, что использование 0,6 мл исходного материала СО часто приводило к получению значений АКА ниже, чем действующие требования для положительного контроля (60-100 %). Полученные результаты исследования были связаны с вариабельностью критических параметров, а именно, компонента морских свинок. С целью исключения возможности получения результатов, находящихся на нижней границе предписанного диапазона, что может привести к ложной оценке испытаний как недействительных, было рекомендовано использование большего объема СО (0,8 мл) при формировании положительного контроля. Кроме того, СО иммуноглобулина человека BRP (кат. №№ H1000000, H0990000, Y0001504) характеризуется значительной вариабельностью получаемых результатов, так коэффициент вариации для отрицательного контроля различных серий составляет от 15,8 до 36,5 %, для положительного контроля – 12,3 до 16,8 % чем, вероятнее всего, объясняется отсутствие аттестованных опорных значений для соответствующих контролей СО (таблица 5) [55].

Таблица 5 - Значения антикомплементарной активности стандартных образцов (BRP), полученные в межлабораторных исследованиях EDQM

№ серии	Количество лабораторий, участвовавших в межлабораторных исследованиях	Количество выполненных повторов	Значения антикомплементарной активности Хср.±Sx (n – количество повторов, учтенное в статистической обработке), %	
			Отрицательный контроль	Положительный контроль
1 (H1000000)	16	58	20,8±7,6 (n=46) CV=36,5 %	74,3±9,9 (n=46) CV=13,3 %
		18*	22,2±3,5 (n=14)* CV=15,8 %	76,3±10,4 (n=14)* CV=13,6 %
2 (H0990000)	15	35	21,7±4,8 (n=26) CV=22,1 %	76,3±12,8 (n=26) CV=16,8 %
		29*	21,5±5,2 (n=17) CV=24,2 %	74,8±15,9 (n=17)* CV=21,3 %
3 (H0990000)	17	34	25,8±7,4 (n=28) CV=28,7 %	78,0±9,6 (n=28) CV=12,3 %
		30*	21,5±7,0 (n=27)* CV=32,6 %	76,6±10,2 (n=27)* CV=13,3 %
1 (Y0001504)	8	30	20,4±6,6 (n=24) CV=32,4 %	69,7±10,5 (n=24) CV=15,1 %
1 (Y0001994)	7	72	23,3±6,8 (n=56) CV=29,2 %	90,4±3,3 (n=56) CV=3,7 %
Примечания. * – значения, полученные при использовании реактива «Комплемент морских свинок <i>in house</i> »; CV – коэффициент вариации.				

С целью устранения variability результатов в методике ЕФ по определению содержания ГА предусмотрено применение стандартных образцов. [239]. Положительный и отрицательный СО представляют собой раствор иммуноглобулина человека с содержанием ГА в диапазоне от 1:16 до 1:32 и менее 1:2, соответственно [239]. В случае если препарат ИГЧ содержит ГА более, чем в положительном стандартном образце, проводят еще одно определение с использованием стандартного образца лимита содержания ГА. Препарат считают несоответствующим требованиям, если в нем содержатся ГА в титре большем, чем в стандартном образце лимита содержания ГА. Стандартный образец лимита содержания ГА применим исключительно в реакции прямой гемагглютинации, так как представляет собой раствор иммуноглобулина человека с добавлением мышинных моноклональных антител для достижения целевого значения 1:64. Мышиный компонент стандартного образца не может быть выявлен в реакции непрямой гемагглютинации.

Количество анти-А и анти-В ГА в препаратах иммуноглобулинов может быть выявлено методами прямой и непрямой гемагглютинации. Их титр определяют как максимальное разведение препарата, при котором происходит агглютинация тестовых эритроцитов любой степени интенсивности. Для контроля стабильности аналитической работы в различных диапазонах значений результатов определения содержания ГА необходимо использование положительного и отрицательного СО. Для оценки количественного содержания – СО с содержанием ГА в титре 1:64 (СО лимита содержания ГА), равном предельно допустимому для исследуемых препаратов. Содержание анти-А и анти-В ГА в крови доноров не одинаково, соответственно содержание ГА в ИГЧ зависит от степени превалирования в производственном пуле плазмы крови доноров той или иной группы крови [43]. Учитывая это обстоятельство при изготовлении положительного СО (международного и ЕФ) в качестве целевого значения принимается любое, фактически содержащееся в кандидате количество анти-А и анти-В ГА в диапазоне от 1:16 до 1:32, которое может быть либо одинаковым для обоих видов ГА, либо различным. Так, положительный контроль в составе

международного СО представляет собой раствор ИГЧ с различным содержанием ГА: анти-А в диапазоне от 1:32 до 1:64, анти-В – от 1:16 до 1:32. СО ЕФ, также являясь раствором ИГЧ, содержит и анти-А, и анти-В гемагглютинины на уровне 1:32. Для изготовления отрицательного СО используется серия ИГЧ, не содержащая ГА. СО лимита содержания ГА (международный и ЕФ) представляют собой растворы ИГЧ с добавлением мышинных моноклональных антител для достижения целевого значения 1:64. Эти СО аттестованы и рекомендованы для применения только в реакции ПГА, так как в реакции НГА мышинные антитела невозможно выявить. Указанные СО аттестованы той же методикой, в которой и предполагается их применять.

Содержание анти-Д антител в препаратах ИГЧ, определенное в реакции гемагглютинации, не должно превышать титр положительного стандарта. Титр анти-Д антител определяют как максимальное разведение препарата, при котором происходит агглютинация резус-положительных эритроцитов любой степени интенсивности. Специфичность анализа подтверждается применением отрицательного СО, а также резус-отрицательных эритроцитов. В настоящее время в международной практике применяются СО международный и ЕФ:

1) Международный референс-реагент анти-Д антител в препаратах иммуноглобулинов для внутривенного введения: положительный и отрицательный контроли для метода гемагглютинации, утвержденный в 2004 г. (WHO Reference Reagent, Anti-D antibodies in intravenous immunoglobulin: Positive control and Negative control for haemagglutination tests, NIBSC code: 02/228 & 02/226). Оба контроля представляют собой лиофилизированный нормальный иммуноглобулин человека для внутривенного введения с содержанием белка 5 % (Вигам, Bio Products Laboratory, Elstree, UK), расфасованный по 1,0 мл. Для получения положительного контроля в 5 % раствор нормального иммуноглобулина был добавлен восстановленный 2-й Международный стандарт для анти-Д иммуноглобулина (NIBSC code: 01/572) до конечного разведения 1:6000, что соответствует расчетной антирезусной активности 0,0475 МЕ/мл (агглютинация в разведении 1:8). Содержание анти-Д антител в стандарте

определено в ходе совместных исследований 20 лабораторий Европы, Австралии и США в реакции гемагглютинации с использованием эритроцитов фенотипов 0R2R2, 0R1R1, 0rr, обработанных или не обработанных папаином, в реакции гемагглютинации. В положительном контроле определено содержание анти-D антител на уровне, соответствующем разведению 1:8, в отрицательном контроле – не более 1:2 [253].

2) Рабочий стандарт иммуноглобулин человека для внутривенного введения с содержанием анти-D антител и негативный контроль иммуноглобулина человека для внутривенного введения (Working Standard IVIG + anti-D and Negative control IVIG; panel NIBSC code: 04/132 & 04/140; panel NIBSC code: 05/242). Оба контроля представляют собой лиофилизированный нормальный иммуноглобулин человека для внутривенного введения с содержанием белка 5 % (предоставлен Bio Products Laboratory, Elstree, UK), расфасованный по 1,0 мл. Для получения положительного контроля в 5 % раствор нормального иммуноглобулина был добавлен восстановленный 2-й Международный стандарт для анти-D иммуноглобулина (NIBSC code: 01/572) до конечного разведения 1:6000, что соответствует расчетной антирезусной активности 0,0475 МЕ/мл (агглютинация в разведении 1:8). Содержание анти-D антител в Рабочем стандарте иммуноглобулина определено в ходе совместных исследований Национального института биологических стандартов и контроля, Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранения и Центра биологических оценок и исследований Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в реакции гемагглютинации с использованием эритроцитов фенотипов 0R2R2, 0R1R1, 0R1R2, 0rr, обработанных папаином. В положительном контроле стандартного образца определено содержание анти-D антител, соответствующее разведению 1:8, в отрицательном контроле – не более 1:2 [257]. Для применения в качестве стандарта Европейской фармакопеи части образцов стандарта присвоено наименование Immunoglobulin panel for anti-D antibodies test, Biological Reference Preparation, batch 1, Y0000540, а для применения в качестве стандарта FDA – Reference Reagent Anti-D antibodies in

intravenous immunoglobulin: Positive control and Negative control for haemagglutination tests, CBER Lot 1A & 1N-a [238].

Перед использованием их растворяют в заданном объеме воды для инъекций. В результате получают раствор с содержанием иммуноглобулина примерно 50 мг/мл и содержанием анти-D антител, соответствующим разведению образца 1:8. Отсутствие возможности определить точное содержание белка в восстановленном растворе иммуноглобулина ввиду малого объема в дальнейшем не позволяет получить раствор с точным содержанием белка 25 мг/мл, что в сочетании с большой кратностью разведения образцов для использования в реакции гемагглютинации и отсутствием установленной соответствующими объективными методами их антирезусной активности оказывает влияние на погрешность определения содержания в известных стандартах анти-D антител. Указанное в инструкциях по их применению содержание анти-D антител в количестве 0,0475 МЕ/мл является расчетным и обеспечивается в процессе изготовления только точностью разведения в 6000 раз Международного стандарта антирезусного иммуноглобулина с активностью 285 МЕ/мл в растворе иммуноглобулина человека нормального с содержанием белка 50 мг/мл, а аттестация по номинальному титру осуществляется методикой, рекомендованной и для применения.

Оценка предельного содержания АПК проводится хромогенным методом посредством сравнения со СО, откалиброванным в МЕ. Современные СО представляют собой серию препарата АЧ с повышенным содержанием АПК, приближающимся к предельно допустимому в препаратах ИГЧ и АЧ, которое может быть достигнуто изменением определенных этапов технологии изготовления препарата (СО международный и ЕФ) или внесением дополнительно высокоочищенного АПК (СО Фармакопеи США) [44].

В настоящее время в мировой практике разработано и аттестовано несколько стандартных образцов активатора прекалликреина, а именно:

- 1-й Британский стандартный образец активатора прекалликреина (NIBSC 79/572) был утвержден в 1982 г., каждая ампула содержала

приблизительно 5 мл белковой фракции плазмы. Содержание АПК составляло 78,9 ЕД/мл с доверительным интервалом от 73,5 до 84,6 ЕД/мл (степень достоверности 95%) [191];

- Стандартный образец активатора прекалликреина Фармакопеи США (USP cat. No 1559709, USP Lot No F034G0) выпущен в 2016 году, содержит 45 МЕ/мл АПК в 20 % альбумине человека при восстановлении в объеме 0,5 мл [120];

- международные стандартные образцы:

- 1-й Международный стандартный образец активатора прекалликреина (NIBSC 82/530) был утвержден в 1984 г., представляет собой лиофилизат для приготовления раствора с концентрацией альбумина 4,6 % и содержанием АПК равным 85 МЕ/флакон. СО получен из 20 % раствора альбумина человека с добавлением очищенного АПК и последующим разбавлением [165];

- 2-й Международный стандартный образец активатора прекалликреина (NIBSC 02/168) был утвержден в 2003 г., представляет собой лиофилизат 20 % раствора альбумина с содержанием АПК равным 29 МЕ/флакон [173];

- 3-ий Международный стандартный образец активатора прекалликреина (NIBSC 16/364) утвержден 30 октября 2019, представляет собой лиофилизат 20 % раствора альбумина с содержанием АПК равным 30 МЕ/мл [139];

- стандартные образцы Европейской фармакопеи:

- стандартный образец активатора прекалликреина в альбумине BRP EP CRS (Кат. № Y0000263), серия 1, утвержден в 2003 г., представляет собой лиофилизат 20% раствора альбумина (пул из трех серий) с содержанием АПК равное 29 МЕ/флакон [172];

- стандартный образец активатора прекалликреина в альбумине BRP EP CRS (Кат. № Y0000263), серия 2, утвержден в 2008 г., представляет собой лиофилизат 20% раствора альбумина с содержанием АПК равным 30 МЕ/флакон [169];

– стандартный образец активатора прекалликреина в альбумине BRP EP CRS (Кат. № Y0000263), серия 3, утвержден в 2008 г., представляет собой лиофилизат 20% раствора альбумина с содержанием АПК равным 30 МЕ/флакон [170];

– стандартный образец активатора прекалликреина в альбумине BRP EP CRS (Кат. № Y0000263), серии 4, 5, 6 утверждены в 2013 г., представляют собой лиофилизат 20% раствора альбумина с содержанием АПК равным 38 МЕ/флакон [169];

– стандартный образец активатора прекалликреина в альбумине BRP EP CRS (Кат. № Y0000263), серия 7, утвержден в 2019 г., представляют собой лиофилизат 20% раствора альбумина с содержанием АПК равным 37 МЕ/флакон [139];

- стандартные образцы The Center for Biologics Evaluation and Research (CBER):

– CBER Reference Prekallikrein Activator (PKA), lot 2, с содержанием АПК равным 100 МЕ/мл;

– CBER Reference Prekallikrein Activator (PKA), lot 3, утвержден в 1987 г., с содержанием АПК равным 100 МЕ/мл, представляет собой разведение высокоочищенного АПК  $\beta$ -фактор XIIa (26 нг/мл) в 5% растворе альбумина;

- 1-й Национальный стандартный образец активатора прекалликреина (Южная Корея). Исходным материалом являлся следующий состав: 0,08 ммоль/л натрия ацетилтриптофана, 0,08 ммоль/л натрия каприлата, 150 ммоль/л натрия хлорида и 50 мг/мл сывороточного альбумина человека с добавлением АПК до содержания приблизительно 63 МЕ/мл перед розливом во флаконы по 1,1 мл с последующей лиофилизацией [222].

Каждый из перечисленных выше СО является средством передачи единицы величины, выраженной в международных единицах (МЕ), и используется для построения калибровочного графика. Аттестованная характеристика представляет собой среднее значение содержания АПК без указания отклонений. Условия

хранения указанных СО соответствуют температурному режиму не выше минус 20 °С. Необходимость изготовления и аттестации новых серий указанных СО обусловлена истощением запасов.

Стратегия аттестации СО ЕФ и международного базируется на использовании действующего международного СО в межлабораторной аттестации методиками на основе метода ЕФ 2.6.15. Prekallikrein activator [134]. Так, к аттестации серий 2 и 3 СО активатора прекалликреина в альбумине BRP были привлечены 16 лабораторий, межлабораторная вариабельность значений характеризовалась стандартным отклонением 1,14 и 1,38, соответственно, которая снижалась до 0,63 и 1,28 при использовании робастных оценок методом Хубера [170].

Для получения СО активатора прекалликреина в альбумине BRP EP CRS серии 4, 5, 6 использовался материал, аналогичный кандидату в СО BRP серий 2 и 3. В аттестационных исследованиях приняли участие 23 лаборатории, для которых межлабораторная вариабельность, выраженная стандартным отклонением значений от общего среднего, составила 2,34, 2,37 и 2,84 соответственно, которая незначительно изменялась до 2,33, 2,52 и 2,95 при использовании робастных оценок методом Хубера. Анализ полученных результатов позволил авторам исследования предположить возможность влияния ПК на вариабельность полученных результатов [169]. Общее среднее значение было определено как среднее значение между активностью АПК в кандидатах, оцененное относительно действующего международного СО и относительно СО BRP серия 3.

Аттестацию 3-его Международного СО активатора прекалликреина (NIBSC 16/364) и СО активатора прекалликреина в альбумине BRP (Y0000263), серия 7 проводили в 26 лабораториях 16 стран. Для расчета активности кандидатов в СО в большинстве лабораторий использовали стандартную модель линейной регрессии, а также метод параллельных линий или модель коэффициента наклона. В испытаниях кандидата в международный СО внутрилабораторная

вариабельность результатов (повторяемость) соответствовала 1,2 – 16,6 %, при этом межлабораторная вариабельность составила от 4,1 до 5,5 % [139].

Обращает на себя внимание факт, что большинство серий СО изготовлены из АЧ с содержанием белка 200 мг/мл, что связано с большей стабильностью таких образцов, а также с тем, что в таких растворах АЧ чаще встречается значительная контаминация АПК, по сравнению с растворами с содержанием белка 100 мг/мл и 50 мг/мл. В доступных публикациях нет информации об изготовлении и применении в мировой практике СО содержания АПК в ИГЧ.

В соответствии с требованиями ЕФ и для ЛП ИГЧ, и для ЛП АЧ предусмотрено проведение испытаний на содержание АПК по методике ЕФ 2.6.15. Prekallikrein activator с использованием СО, откалиброванного в международных единицах [134]. Анализ нормативной документации на ЛП ИГЧ и АЧ зарубежного производства, зарегистрированных на территории РФ, позволил установить, что для обеих групп препаратов в методиках определения АПК производители используют международный СО активатора прекалликреина или СО активатора прекалликреина в альбумине BRP. Кроме того, для подтверждения приемлемости полученных в ходе испытаний образцов ЛП производители предусматривают применение контрольных образцов, являющихся образцами ЛП ИГЧ или АЧ с установленным (нормируемым) содержанием АПК относительно СО методикой, утвержденной для конкретного ЛП.

В РФ отсутствует национальный СО содержания АПК, как и фармакопейный метод определения содержания АПК.

Таким образом, международные СО или фармакопейные СО, аттестованные относительно международного СО, в первую очередь позволяют стандартизовать качество ЛП по содержанию АПК, оценить воспроизводимость и приемлемость результатов испытаний с их использованием невозможно. Для решения задачи стандартизации методик определения содержания АПК зарубежные производители используют внутрипроизводственные контрольные образцы.

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Проведенный анализ свидетельствует о том, что ЛП ИГЧ и АЧ являются приоритетными в производстве ЛП из ПКЧ. В последние годы в нашей стране значительно возрос интерес к этой группе препаратов как со стороны практических врачей по причине расширения списка показаний к применению, так и со стороны отечественных производителей в силу возросшей потребности в импортозамещении и обеспечении национальной безопасности.

2. Внутривенное введение ЛП ИГЧ и АЧ может сопровождаться НР, причинами которых являются агрегированные или конформационно измененные формы молекул иммуноглобулинов, активирующие систему комплемента; АПК, вызывающий вазодилатационный эффект вследствие активации калликреинкиновой системы; а также антиэритроцитарные антитела, обуславливающие гемолитические реакции; ФСК.

3. Показателями, характеризующими качество ЛП ИГЧ с позиций безопасности применения, является «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела», «Активатор прекалликреина»; обязательным параметром контроля качества ЛП АЧ является содержание АПК. Для исключения тромбоэмболических осложнений иммуноглобулинотерапии в мировой биофармацевтической практике регламентирована необходимость подтверждения элиминации тромбинообразующих компонентов ПКЧ на этапах производства ЛП ИГЧ.

4. Проведенный анализ современного состояния проблемы стандартизации ЛП ИГЧ и АЧ выявил необходимость унификации и гармонизации с международными требованиями отечественных стандартов качества указанных лекарственных средств по уровню АКА, по содержанию АПК, антиэритроцитарных антител.

5. Методы определения АКА, АПК, антиэритроцитарных антител предусматривают использование реагентов биологической природы (тестовые эритроциты человека, антиглобулиновая сыворотка, гемолизин, ПК, папаин и др.),

вариабельность свойств которых обуславливает необходимость использования СО для оценки воспроизводимости результатов испытаний.

5. Международная практика использования СО позволяет стандартизовать методы контроля качества ЛП ИГЧ по содержанию антиэритроцитарных антител методом ПГА, по уровню АКА. СО активатора прекалликреина используется для построения калибровочного графика и позволяет стандартизовать качество ЛП по содержанию АПК. Проведенный анализ обеспеченности СО, для контроля качества ЛП из ПКЧ по содержанию ГА, анти-D антител, АПК, уровню АКА, свидетельствует о необходимости разработки отечественных СО, применимых в унифицированных фармакопейных методиках.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

I. В исследовании использовали лекарственные препараты:

1) иммуноглобулинов человека для внутривенного введения отечественного производства

«Имбиоглобулин», раствор для инфузий 50 мг/мл, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России;

«Иммуновенин<sup>®</sup>», лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, 50 мг/мл, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России;

«Иммуноглобулин человека нормальный», раствор для внутривенного введения 50 мг/мл, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России,

«Габриглобин- IgG», раствор для инфузий 50 мг/мл, ЗАО «Иммуногем»;

«Иммуноглобулин человека нормальный», раствор для внутривенного введения 50 мг/мл, Нижегородская ОСПК им. Климовой

2) иммуноглобулинов человека для внутримышечного введения отечественного производства

«Иммуноглобулин человека противостолбнячный», раствор для внутримышечного введения, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

«Иммуноглобулин человека против гепатита В», раствор для внутримышечного введения, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

«Иммуноглобулин человека нормальный», раствор для внутримышечного введения, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России,

«Иммуноглобулин человека антистафилококковый», раствор для внутримышечного введения, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

«Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита», раствор для внутримышечного введения, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

«Иммуноглобулин человека противоаллергический», раствор для внутримышечного введения, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России;

3) иммуноглобулинов человека для внутривенного введения зарубежного производства

«Гамунекс» раствор для инфузий, 100 мг/мл, Талекрис Биотерапьютикс Инк, США.

«Гамунекс<sup>®</sup>-С» раствор для инфузий, 100 мг/мл, Грифолс Терапьютикс Инк., США

«Привиджен» раствор для инфузий 100 мг/мл, СиЭсЭл Беринг АГ, Швейцария.

«Октагам» раствор для инфузий 50 мг/мл, Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х., Австрия.

«Октагам<sup>®</sup> 10 %» раствор для инфузий 100 мг/мл, Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х., Австрия.

«Иммуноглобулин Сигардис» раствор для инфузий, 50 мг/мл (Сычуаньская Юанда Шуян Фармацевтическая компания, Китай);

«Иммуноглобулин Сигардис МТ» раствор для инфузий, 50 мг/мл (Сычуаньская Юанда Шуян Фармацевтическая компания, Китай);

«И.Г.Вена» раствор для инфузий, 50 мг/мл, Кедрион С.п.А., Италия

4) альбумина человека отечественного и зарубежного производства

«Альбумин» раствор для инфузий 10 %, 20 %, ГУЗ «Липецкая областная станция переливания крови»

«Альбумин» раствор для инфузий 10 %, 20 %, ГБУЗ "Станция переливания крови Калининградской области", Россия

«Альбумин» раствор для инфузий 10 %, ГУЗ "Тамбовская областная станция переливания крови", Россия

«Альбумин» раствор для инфузий 10 %, 20 %, ГУЗ «Свердловская ОСПК», Россия

«Альбумин», раствор для инфузий 10 %, 20 %, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России;

«Альбурекс» раствор для инфузий 20 %, СиЭсЭл Беринг АГ", Швейцария

«Плазбумин<sup>®</sup>-20» раствор для инфузий 20 % Грифолз Терапьютикс Инк., США

II. С целью разработки стандартных образцов содержания гемагглютининов и содержания анти-D антител использовали растворы ИГЧ из плазмы крови доноров различной резус- и групповой принадлежности производства ФГУП «НПО» Микроген» Минздрава России.

III. В исследованиях по разработке методики определения антикомплементарной активности и СО иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность) использовали реагенты и реактивы отечественного и зарубежного производства:

- комплемент морских свинок: набор реагентов «Комплемент сухой», ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России; реагент «Комплемент морской свинки для реакции связывания комплемента» (CFT COMPLEMENT), кат. № ORAY, Siemens, Германия; комплемент сыворотки крови морских свинок, полученный в лабораторных условиях (in house);
- гемолитическая сыворотка (гемолизин): набор реагентов «Сыворотка диагностическая гемолитическая жидкая», ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России; реагент «Сыворотка диагностическая гемолитическая кроличья жидкая для РСК», кат. № 03.16, ЗАО «ЭКОлаб», Россия; реагент «Антисыворотка кролика к эритроцитам барана Амбоцептор 6000» (CFT AMBOCEPTOR), кат. № ORLC, Siemens, Германия;
- реагент «Кровь баранья для питательных сред, стерильная (с цитратом натрия), кат. № 50.98, ЗАО «ЭКОлаб», РФ; набор реагентов «Кровь баранья консервированная для реакции связывания комплемента» кат. № 03.12, ЗАО «ЭКОлаб», РФ; кровь баранья дефибринированная, стабилизированная, полученная в лабораторных условиях (in house);
- желатин-вероналовый буфер (Gelatin veronal buffer), кат. № G6514, производства Sigma, США;
- реактивы для приготовления желатин-содержащих буферных растворов: магния хлорид гексагидрат, Sigma – Aldrich, кат.№ M9272; кальция хлорид,

ROTH, кат.№ CN92.1; раствор желатина 10%, ГБУЗ Свердловской области «ОСПК», Россия;

- СО: иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность и молекулярные параметры) BRP Y0001504, серия 1; иммуноглобулина человека для антикомплементарной активности BRP Y0001994, серия 1.

IV. В исследованиях по разработке унифицированных методик определения содержания антиэритроцитарных антител и по разработке СО содержания анти-А и анти-В ГА; СО содержания анти-D антител использовали планшеты серологические, иммунологические необработанные V-образные, пробирки агглютинационные, гелевые карты DG Gel<sup>®</sup> Coombs, Diagnostic Grifols S.A., Испания) и реагенты/реактивы отечественного и зарубежного производства:

- реагенты эритроцитов: тест-эритроциты ID-DiaCell I-II-III 5%, ID-DiaCell 0-A-B 5%, ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», РФ; стандартные эритроциты Seriscan Diana 2P, Serigrup Diana A1/B, Diagnostic Grifols S.A. кат.№ 210204, Испания; ID-DiaPanel-P, BIO-RAD, США;
- папаин (papain from papaya latex, lyophilized powder,  $\geq 10$  units/mg protein), Sigma-Aldrich, Канада;
- раствор ID-Papain (раствор папаина для папаинизированных эритроцитов), BIO-RAD, США;
- антиглобулиновая сыворотка, ООО Гематолог, РФ;
- раствор ID-CellStab - стабилизирующий раствор для эритроцитов, BIO-RAD, США;
- реактивы для приготовления буферных растворов: натрия хлорид, Panreac; безводный натрия гидрофосфат, Merck; калия хлорид, Panreac; калия дигидрофосфат, Merck; бычий сывороточный альбумин, Sigma; натрия хлорид, Компонент-Реактив, РФ;
- физиологический раствор, ООО «Мосфарм», РФ,
- раствор низкой ионной силы LISS, ООО Гематолог, РФ

- вторичные антитела, меченые Fluorescein (FITC) AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc $\gamma$  fragment specific (Jackson ImmunoResearch), R-Phycoerythrin-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG, F(ab')<sub>2</sub> fragment specific (minimal cross-reaction to Bovin, Horse and Mouse serum proteins) (Jackson ImmunoResearch);
- стандарты: Immunoglobulin (anti-A, anti-B antibodies test) Positive control BRP batch 1, Y0001688; Immunoglobulin (anti-A, anti-B antibodies test) Negative control BRP batch, Y0001689; Immunoglobulin for anti-A, anti-B antibodies Limit test BRP batch 1, Y0001153; WHO Reference Reagent, Anti-D antibodies in intravenous immunoglobulin: Positive control and Negative control for haemagglutination tests, NIBSC 02/228 & 02/226; 2-й Международный стандарт для анти-D иммуноглобулина, NIBSC 01/572;

V. В исследованиях по разработке методики определения активатора прекалликреина и стандартного образца содержания активатора прекалликреина использовали реагенты и реактивы отечественного и зарубежного производства:

- реагенты прекалликреина: производства Coachrom Diagnostica (COA0022), Австрия; HYPHEN BioMed (PP501), Франция; Sekisui Diagnostics GmbH (ADG472), США; Enzyme Research Laboratories (HPK 1302), США; Calbiochem, EDM Millipore Corporation (529583-1MG), Канада; ООО фирма «Технология-Стандарт», РФ;
- хромогенный субстрат S-2302 (Chromogenix).
- реагент Human Coagulation Factor XIIa Beta, Cell Sciences, США;
- стандарты: Prekallikrein Activator in albumin BRP Y0000263, batch 5, batch 6; стандартный образец WHO International Standard 2nd International Standard For Prekallikrein Activator NIBSC 02/168;

VI. В исследования по определению тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ использовали реагенты и стандарты:

- кефалин Pathromtin SL, Actin FS, Siemens, Германия;
- тромбопластин Thromborel S, Dade Innovin, Siemens, Германия;

- стандартная плазма крови человека, Siemens, Германия;
- реагенты плазмы, дефицитной по фактору свертывания крови II, V, VII, IX, X, XI, Siemens, Германия;
- набор реагентов Berichrom для определения активности АТIII, Siemens, Германия;
- хромогенные субстраты S-2222, S-2238, Chromogenix;
- набор реагентов CoaChrom<sup>®</sup>Prothrombin, Rossix Chromogenic, Швеция;
- набор реагентов Rox Factor XIa, Rossix Chromogenic, Швеция;
- набор реагентов Rox FIXa, Rossix Chromogenic, Швеция;
- набор реагентов INNOVANCE<sup>®</sup>ETP, Siemens, Германия;
- стандарты: WHO International Standard for Blood Coagulation Factors II and X, NIBSC 11/126, WHO International Standard for Blood Coagulation Factor IX, NIBSC 14/148, WHO International Standard for Activated Blood Coagulation Factor XI (FXIa), Human, NIBSC 13/100, WHO International Standard for Factor VII, NIBSC 10/252, WHO International Standard for Antithrombin, Human NIBSC 06/166.

VI. Использовано оборудование: автоматизированная система BCS<sup>®</sup>XP, Siemens, Германия; баня водяная Julabo ED-19M, Julabo Labortechnik GmbH, Германия; термометр технический стеклянный ТТМ (диапазон измерений от 0 до 100 °С), ОАО «Термоприбор», Россия; центрифуга многофункциональная 5810R, Eppendorf AG, Германия; весы прецизионные Adventurer AR-5120, Ohaus, США; рН-метр Нитрон, РФ; анализатор иммунологический Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, Германия, проточный цитометр Navios 10 color, Beckman Coulter; хроматограф: ВЭЖХ-система Alliance с УФ-детектированием, Waters Cor., США, эксклюзионная хроматографическая колонка TSKgel G3000SWXL, 7,8 мм×300 мм, размер частиц 5 мкм (№ 0008541, Tosoh Bioscience, Германия) + предколонка: TSKgel G3000SWXL, 6,0 мм×40 мм, размер частиц 7 мкм (№ 0008543, Tosoh Bioscience, Германия).

VII. Определение активности факторов свертывания крови проводили клоттинговыми и хромогенными методами в соответствии с программами автоматизированной системы BCS®XP, в соответствии с инструкциями к соответствующим наборам реагентов с использованием анализатора иммунологического Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, Германия. Для оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ моделирование венозного стаза осуществляли по методу S. Wessler с использованием кроликов породы «Советская шиншилла» (вес 2,0 - 2,5 кг), миорелаксацию проводили препаратом Ксила, «Interchemie werken «De Adelaar» B.V», Нидерланды (0,15 мл/кг - 0,2 мл/кг внутримышечно), общую анестезию - препаратом Золетил 100, «Virbac Sante Animale», Франция (0,15 мл/кг - 0,2 мл/кг с добавлением 0,9 % раствора натрия хлорида до объема 1,0 мл; внутримышечно); объем вводимого препарата соответствовал рекомендуемой для человека разовой дозе в пересчете на кг массы тела.

VIII. Определение содержания антиэритроцитарных антител проводили в реакциях прямой и непрямой гемагглютинации.

Для проведения реакции ПГА в лунки V-образного 96-луночного планшета вносили равное количество образца и 3 % суспензии обработанных папаином эритроцитов человека соответствующего фенотипа. Пробы осторожно встряхивали (на шейкере) в течение 10 с, затем центрифугировали на центрифуге многофункциональной 5810R (Eppendorf AG, Германия) в течение 1 мин при 360–650 g. Планшеты располагали под углом 70 ° и оценивали визуально агглютинацию через 4–5 мин (но не более чем через 10 мин) [28].

Для проведения реакции ПГА с использованием плоского планшета для серологических исследований на его поверхность наносили образец и 3 % суспензию обработанных папаином эритроцитов человека соответствующего фенотипа в соотношении 2:1. Пробы осторожно встряхивали и оценивали визуально агглютинацию через 10 мин.

При проведении реакции ПГА гелевым методом в дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносили по 50 мкл 0,8 %

суспензии обработанных папаином эритроцитов человека соответствующего фенотипа и по 25,0 мкл образца. Пробы инкубировали при температуре  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин [28]. По окончании инкубации пробы центрифугировали на центрифуге Dianafuge, Grifols, Испания в запрограммированном режиме и оценивали агглютинацию.

При проведении реакции НГА в стеклянные пробирки или V-образные лунки 96-луночного планшета вносили равное количество разведения испытуемого образца и суспензии эритроцитов человека соответствующего фенотипа (группы крови), осторожно перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при температуре  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ . По окончании инкубации пробы центрифугировали при 260–470 g в течение 10 мин, удаляли надосадочную жидкость, полученный осадок ресуспендировали в десятикратном объеме 0,9 % раствора натрия хлорида и вновь центрифугировали при 260–470 g в течение 10 мин [76]. Процедуру повторяли не менее 3 раз. Надосадочную жидкость удаляли, добавляли равный осадку эритроцитов объем поливалентной антиглобулиновой сыворотки (сыворотка Кумбса) и осторожно перемешивали. Пробы инкубировали при температуре  $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. По окончании инкубации под микроскопом или визуально исследовали пробы, отмечая наличие агглютинации эритроцитов.

Содержание эритроцитарных антител (титр) определяли как максимальное разведение образца, при котором происходила агглютинация эритроцитов любой степени интенсивности. При изучении агглютинации «на плоскости» при использовании планшет серологических или пробирок степень её интенсивности выражали в «+» следующим образом:

- + (1+) - небольшие одиночные отложения агглютинированных эритроцитов на дне лунки (пробирки). Неагглютинированные эритроциты образуют «маленькое колечко» в центре;
- ++ (2+) - образование на дне лунки широкого плотного «кольца»;
- +++ (3+) - агглютинированные эритроциты образуют «зонтики», в центре

которых выявляются кольца, образованные осевшими неагглютинированными эритроцитами;

++++ (4+) - агглютинируются все эритроциты, которые, образуя «зонтики», выстилают дно лунок.

При отсутствии агглютинации эритроциты оседали на дно лунки (пробирки) в виде небольшого колечка с гладкими краями или «пуговки» [76].

При изучении агглютинации в V-образных 96-луночных планшетах степень её интенсивности выражали в «+» следующим образом:

+ (1+) - стекание эритроцитов по поверхности лунки, менее выраженное, чем при отсутствии агглютинации

++ (2+) - незначительное стекание эритроцитов по поверхности лунки;

+++ (3+) - незначительное изменение формы осадка на дне лунки;

++++ (4+) - агглютинируются все эритроциты, которые плотно лежат на дне лунки и не стекают.

При отсутствии агглютинации эритроциты стекали в виде дорожки по поверхности лунки.

При использовании гелевой технологии степень агглютинации оценивали по распределению агглютинированных эритроцитов в гелевой колонке:

+ (1+) - распределение агглютинатов в нижней трети колонки;

++ (2+) - распределение агглютинатов по всей колонке;

+++ (3+) - распределение агглютинатов в верхней трети колонки;

++++ (4+) - слой агглютинированных эритроцитов в самой верхней части колонки.

Содержание антиэритроцитарных антител определяли как максимальное разведение образца, при котором наблюдали распределение агглютинированных эритроцитов в толще гелевой колонки или в ее верхней части. Неагглютинированные эритроциты оседали на дно микропробирки.

IX. Определение антирезусной активности образцов проводили методом проточной цитофлуориметрии.

Подготовка суспензии стандартных эритроцитов: эритроциты человека

Rh(+), фенотип 0R1R1 (полученные не менее чем от трех доноров) и эритроциты человека Rh(-), фенотип 0rr центрифугировали 5 мин при 1070–1080 g при комнатной температуре (20±5) °С (отдельно полученные от каждого донора), надосадочную жидкость сливали. Полученный осадок ресуспендировали в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л бычьего сывороточного альбумина, и снова центрифугировали в течение 5 мин при 1070–1080 g при комнатной температуре (20±5) °С. Процедуру повторяли не менее 3 раз до получения прозрачной надосадочной жидкости. Осадок эритроцитов от каждого из трех доноров соответствующего фенотипа смешивали в одной пробирке.

Для приготовления суспензии эритроцитов с концентрацией от  $1 \times 10^4$  до  $5 \times 10^4$  клеток/мкл 1 объем осадка эритроцитов ресуспендировали в 29–30 объемах фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л бычьего сывороточного альбумина. Подсчет клеток осуществляли с помощью камеры Горяева.

Подготовка раствора вторичных антител, меченых флюоресцеином или фикоэритрином: восстанавливали содержимое флакона в соответствии с инструкцией по применению. К 1 объему восстановленного раствора меченых вторичных антител добавляли 199 объемов фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л бычьего сывороточного альбумина.

Международный стандарт антирезусного иммуноглобулина после восстановления в 1,0 мл воды очищенной (285 МЕ/мл) разводят последовательно в 10 раз (2,85 МЕ/мл), в 5 раз (0,57 МЕ/мл), в 1,5 раза (0,38 МЕ/мл), далее двукратными шагами до получения разведения с расчетной активностью 0,19; 0,0475; 0,02375; 0,0119; 0,00595 МЕ/мл.

В соответствующие лунки F-образного 96-луночного планшета вносили по 50 мкл суспензии стандартных эритроцитов человека Rh(-), фенотип 0rr и суспензии стандартных эритроцитов человека Rh(+), фенотип 0R1R1. Добавляли по 50 мкл образца, пробы осторожно встряхивали (на шейкере) в течение 15 с, затем инкубировали при температуре (37±2) °С в течение (40±4) мин. По окончании инкубации центрифугировали в течение 3 мин при 50 g. Надосадочную

жидкость удаляли, вносили по 200 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л бычьего сывороточного альбумина. Пробы осторожно встряхивали (на шейкере) в течение 15 с и центрифугировали в течение 3 мин при 50 g, надосадочную жидкость удаляли. Процедуру отмывания эритроцитов повторяли еще дважды.

Во все лунки микропланшета добавляли по 50 мкл раствора вторичных антител, меченых флуоресцеином или фикоэритрином, и инкубировали при комнатной температуре ( $20\pm 5$ ) °C в течение ( $20\pm 2$ ) мин.

По окончании инкубации во все лунки планшета добавляли по 150 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л бычьего сывороточного альбумина, центрифугировали в течение 3 мин при 50 g, надосадочную жидкость удаляли. Во все лунки планшета добавляют по 200 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л бычьего сывороточного альбумина. Пробы осторожно встряхивали (на шейкере) в течение 15 с и центрифугировали в течение 3 мин при 50 g, надосадочную жидкость удаляли. Процедуру отмывания эритроцитов повторяли еще дважды.

Во все лунки планшета добавляли по 50 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л бычьего сывороточного альбумина. Пробы осторожно встряхивали (на шейкере) в течение 15 с и помещали в проточный цитометр Navios 10 color, Beckman Coulter и измеряли флуоресценцию клеток при условии отбора 12 мкл суспензии клеток из каждой лунки и сравнивали значения флуоресценции 10000 клеток с использованием лазера (с соответствующей длиной волны).

На основании результатов измерения флуоресценции рабочих разведений стандартного образца для расчета в МЕ/мл строили график зависимости десятичного логарифма разницы флуоресценции стандартного образца и среднего значения флуоресценции трех измерений холостой пробы (ось ординат, FU) от десятичного логарифма концентрации анти-D иммуноглобулина (ось абсцисс, МЕ/мл).

Содержание активатора прекалликреина определяли хромогенным методом, основанном на опосредованной количественной оценке по способности активации прекалликреина, перевода его в калликреин, отщепляющего от специфического хромогенного субстрата хромофор (п-нитроанилин) с измерением скорости изменения интенсивности окраски в минуту в интервале со 2 по 10 минуты при длине волны 405 нм (хромогенный кинетический тест) или с измерением количества выделившегося хромофора по интенсивности окраски при длине волны 405 нм после внесения 50 % раствора уксусной кислоты, прекращающего процесс расщепления хромогенного субстрата (хромогенный тест по конечной точке) [81, 134].

В три лунки F-образного 96-луночного планшета вносили 0,005 мл образца и 0,045 мл ПК (2 лунки) и трис-буферного раствора (третья лунка), планшет помещали в термостат при температуре  $(37\pm 0,5)$  °С. По окончании 30 мин инкубации во все заполненные лунки вносили по 0,050 мл хромогенного субстрата, перемешивали и при температуре  $(37\pm 0,5)$  °С измеряли скорость изменения интенсивности окраски на анализаторе иммунологический Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, Германия (кинетический тест) или инкубировали при температуре  $(37\pm 0,5)$  °С в течение 15 мин, во все заполненные лунки вносили по 0,050 мл стоп-реагента и измеряли оптическую плотность на анализаторе иммунологический Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, Германия (хромогенный тест по конечной точке).

Определение антикомплементарной активности проводили в реакции связывания комплемента [77, 134]. В качестве источника комплемента использовали сыворотку крови от 10 - 15 морских свинок (мужского пола), изготовленную методом отстаивания при температуре  $(37\pm 0,5)$  °С; после декантации сыворотку объединяли и хранили при температуре не выше минус 70 °С.

Содержание белка определяли колориметрическим методом с биуретовым реактивом [79].

Статистическую обработку полученных данных с расчетом среднего арифметического значения ( $\bar{x}$ ) и стандартного отклонения ( $S_x$ ) проводили с использованием программ Microsoft Excel 7.0. Калибровочные графики строили по методу наименьших квадратов, расчет содержания АПК в кандидатах в СО (компонент для оценки содержания АПК) осуществляли методом параллельных линий с использованием программы «ПАРАЛАЙН» (авторское свидетельство 2006612065).

Среднее арифметическое значение ( $\bar{x}$ ) вычисляли по формуле (1):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} (x_1 + \dots + x_n) \quad (1)$$

Стандартное отклонение ( $S_x$ ) результатов измерений вычисляли с использованием формулы (2):

$$S_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

Для оценки различий средних значений использовали t-критерий Стьюдента для соответствующего числа степеней свободы и уровня значимости  $\alpha=0,05$  (доверительной вероятностью  $P \geq 0,95$ ). Для оценки значимости различий линий регрессии изучаемой зависимости международного СО содержания АПК в альбумине и разработанного СО (компонент для оценки содержания АПК) применяли регрессионный анализ [15].

Статистическую обработку результатов определения содержания антиэритроцитарных антител методами ПГА и НГА проводили с расчетом медианы ( $Me$ ), моды ( $Mo$ ) и диапазона значений в соответствии с [4, 15].

Разработанные методики валидировали в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [8].

### **ГЛАВА 3. ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИИ СТАНДАРТИЗАЦИИ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ**

#### **3.1. Обоснование структурных элементов методологии стандартизации и контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности**

Научный анализ литературных данных, представленный в главе 1, позволил выделить группу НР, возникающих при внутривенном введении ИГЧ и АЧ, которая обусловлена присутствием в указанных препаратах физиологических компонентов ПКЧ, но не являющихся действующим веществом этих ЛП: антиэритроцитарных антител, ФСК, АПК, или конформационно измененных/агрегированных молекул иммуноглобулинов. Указанные контаминанты обладают способностью активировать различные системы гомеостаза: комплемента, калликреин-кининовую, гемостаза, эритроцитарное звено. Следовательно, являясь специфичными компонентами для исходного сырья (плазмы человека для фракционирования) производства ЛП ИГЧ и АЧ, они способны вызывать НР, обусловленные специфической активацией систем гомеостаза. Сопоставимость качества препаратов ИГЧ и АЧ по содержанию анти-А и анти-В гемагглютининов, анти-Д антител, АПК, уровню АКА с вероятностью возникновения соответствующих НР позволяет выделить показатели, характеризующие безопасность этих ЛП: «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела», «Активатор прекалликреина». В тоже время, только контроль соответствия качества препаратов по этим показателям не позволит в полной мере обеспечить безопасность, так как содержание остаточного количества, например, факторов свертывания крови оценивать в каждой серии экономически нецелесообразно. Более актуальным является разработка технологии получения ЛП ИГЧ и АЧ, позволяющая эффективно элиминировать соответствующие контаминанты или

предупредить их наличие. В таком случае достаточным является доказательство отсутствия нежелательной активации свертывающей системы крови в рамках доклинических и клинических исследований. Однако такой подход оправдывает себя только в условиях стабильного производственного процесса.

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 [36, 51, 52]. Выделение специфической безопасности из всего комплекса характеристик ЛП из ПКЧ обеспечивает прослеживаемость в обеспечении качества и безопасности этих препаратов на всех этапах обращения лекарственных средств: от разработки до применения.

Отечественные стандарты качества на ЛП ИГЧ и АЧ характеризуются противоречивостью и существенно отличаются от международных. Так, в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» в качестве показателей специфической безопасности ЛП ИГЧ для внутривенного введения указаны испытания на «отсутствие вирусной контаминации, антикомплементарность и оценка гипотензивного действия» для комбинированных с гистамином ЛП ИГЧ [94]. В тоже время, ФС 42-3159-95 «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения» относительно показателей специфической безопасности устанавливает нормативные требования только по АКА, которые не соответствуют международным стандартам качества, как и методика контроля по этому показателю. ФС 42-122-04 «Альбумин человека» не содержит требований по контролю содержания АПК. ФС 42-3198-95 «Иммуноглобулин человека нормальный» регламентирует качество только ЛП для внутримышечного введения, в тоже время подкожное применение ИГЧ сопровождается более серьезными побочными реакциями, и требует проведения дополнительных испытаний по содержанию антиэритроцитарных антител.

Обоснованное нами понятие специфической безопасности позволило структурировать требования к качеству ЛП ИГЧ, выделив показатели специфической безопасности: препараты для внутривенного введения должны подвергаться обязательному контролю качества по показателям «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела», препараты для подкожного введения - по показателям «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела». Указанные структурные элементы спецификации ЛП ИГЧ были отражены в соответствующих ФС [25, 26].

В результате проведенного анализа фармацевтических разработок, технологических процессов получения ЛП ИГЧ и АЧ, методов их контроля качества нами 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 совокупности принципов и методов обеспечения их качества, сформирована нами на основании взаимосвязанных этапов их разработки, доклинического и клинического исследования, экспертизы в рамках государственной регистрации и производства (Рисунок 10).

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 [88];
- исследовательские (доклинические, клинические, постмаркетинговые исследования);

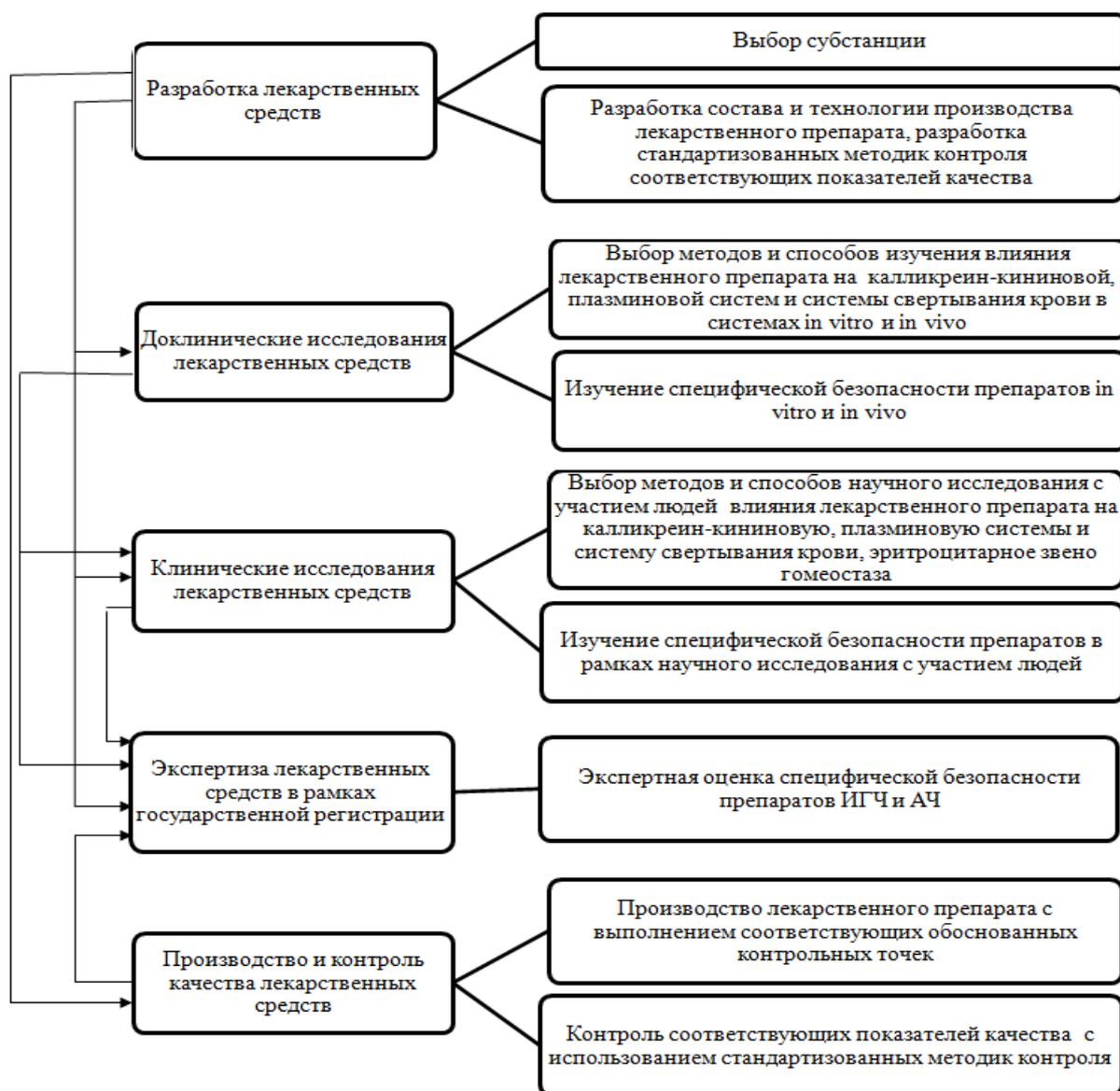


Рисунок 10 - Методология стандартизации ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности

- 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.

### **3.2. Разработка методологических подходов к стандартизации и контролю качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности**

В соответствии с 162-ФЗ одной из целей стандартизации является повышение качества и конкурентоспособности продукции российского производства, которое возможно при условии обеспечения единства измерений и сопоставимости их результатов в части контроля качества лекарственных препаратов [99]. На современном этапе функционирования системы обращения ЛС аспекты обеспечения специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ недостаточно отражены в государственных и отраслевых нормативных документах. В дальнейших исследованиях были разработаны методологические подходы к стандартизации и оценке качества ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности (Рисунок 11).

Прогностический подход позволяет 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.

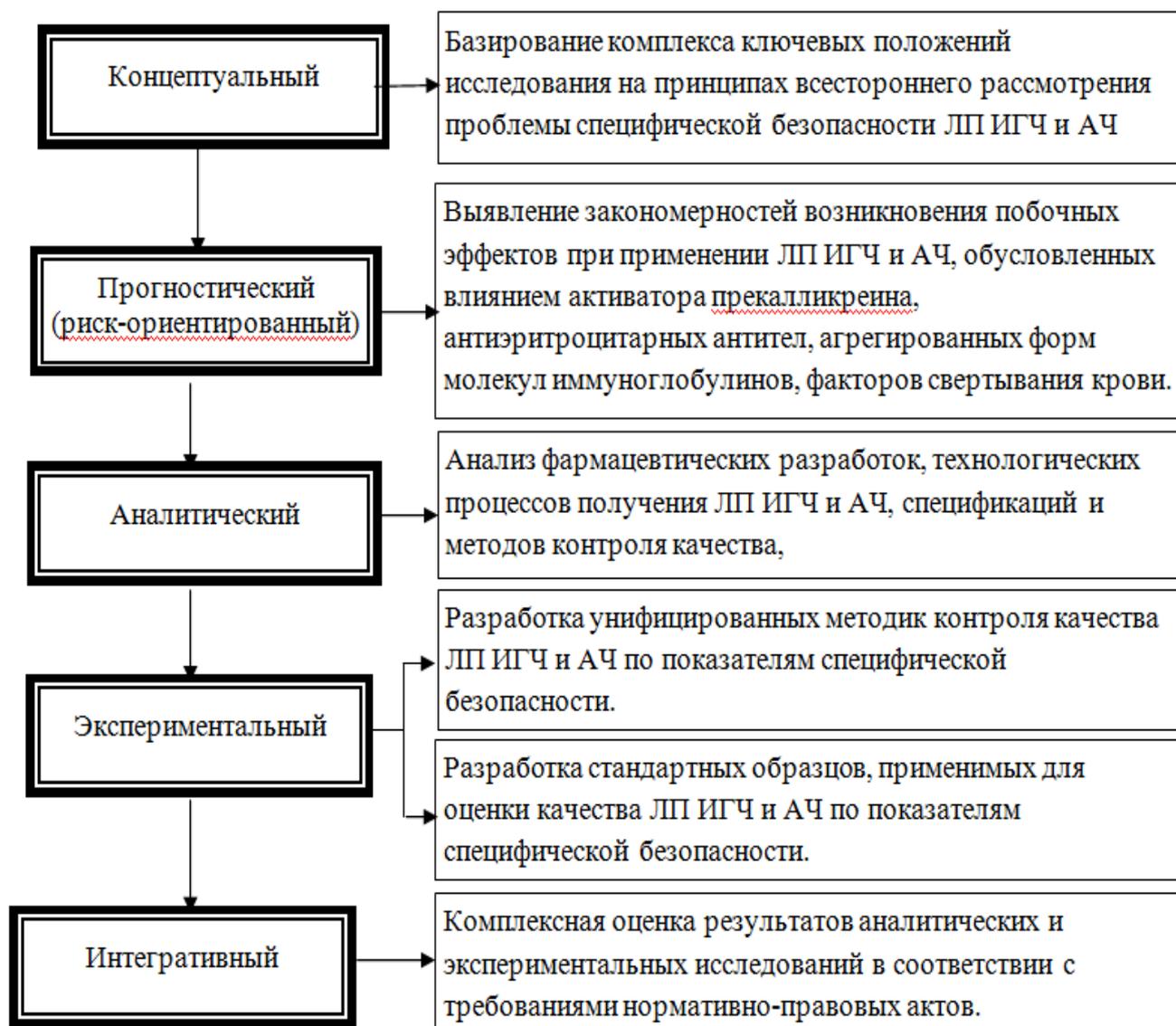


Рисунок 11 – Методологические подходы к обеспечению специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ

Контроль качества инфузионных ЛП ИГЧ должен включать соответствующие методы оценки тромбогенного потенциала как на животных, так и лабораторными методами *in vitro*. В аспекте изучения специфической безопасности посерийный контроль ЛП ИГЧ должен осуществляться с учетом оценки уровня АКА, содержания ГА и анти-D антител, АПК. Для ЛП АЧ обязательной является оценка содержания АПК.

В условиях совершенствования принципов лекарственного обеспечения населения РФ приоритетным направлением является гармонизация национальных

стандартов качества в сфере обеспечения эффективности, безопасности и качества фармацевтической продукции [7, 86]. Методическое обеспечение контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ, как показал научный анализ, представленный в разделе 1, нуждается в совершенствовании, в частности необходима разработка унифицированных стандартизованных методов/методик контроля качества, гармонизированных с международными. Стандартизация предполагает применение стандартных условий и СО, гарантирующих уменьшение разброса результатов измерений до приемлемого уровня, когда становится допустимым использование различных аналитических систем и в значительной степени возможно избежать получения противоречивых заключений на их основе.

### **ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3**

1. Разработаны методологические подходы к стандартизации и оценке качества препаратов крови человека по специфической безопасности, позволившие определить приоритетные направления исследований по обоснованию методологии стандартизации и оценки качества иммуноглобулинов и альбумина человека по показателям специфической безопасности, а также экспериментальную разработку методик и СО, применимых для оценки ЛП по соответствующим показателям качества.

2. Обоснована методология стандартизации и контроля качества препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по специфической безопасности как совокупность принципов и методов обеспечения качества в аспекте влияния на системы гемостаза и комплемента, калликреин-кининовую систему и эритроцитарное звено системы гомеостаза, сформированная на основании взаимосвязанных этапов их разработки, доклинического и клинического исследования, экспертизы в рамках государственной регистрации и производства.

## ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ОСНОВ СТАНДАРТИЗАЦИИ И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛП ИГЧ ПО ТРОМБОГЕННОМУ ПОТЕНЦИАЛУ

### 4.1. Обоснование критериев оценки тромбогенного потенциала лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека

На основании прогностического и аналитического методологических подходов с учетом данных о зарегистрированных случаях тромбоэмболических осложнений у пациентов, получивших инфузии ЛП ИГЧ в высоких дозах с соблюдением режима введения, нами выявлена необходимость оценки тромбогенного потенциала этих ЛП отечественного производства. Стратегия импортозамещения предопределяет возможность применения ЛП ИГЧ российского производства в терапии аутоиммунных, воспалительных и иммунодефицитных заболеваний в больших дозах, у пациентов с сопутствующей патологией, преклонного возраста, т.е. в тех случаях, которые могут привести к развитию тромбоэмболических осложнений при несоответствующем качестве препаратов. Анализ методических подходов, используемых зарубежными исследователями для оценки качества серий препарата Октагам, вызвавших тромбоэмболические НР, позволил установить перечень наиболее значимых параметров [146, 194]:

- количественное содержание и активность ФСК XI и его активированной формы XIa;
- активность ФСК протромбинового комплекса (ФСК II, V, VII, IX (и активированной формы IXa), X);
- частичное тромбопластиновое время и неактивированное частичное тромбопластиновое время;
- эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП);
- способность к генерации тромбообразования в системе *in vivo*.

Количественные характеристики указанных параметров также оценивались в зависимости от результатов клинического применения ЛП ИГЧ (содержание и активность).

Результаты определения неактивированного частичного тромбопластинового времени показали корреляцию между активностью фактора XIa и тромбоэмболическими НР в клинике: сокращение времени свертывания стандартной плазмы до 125 – 150 мин наблюдалось при содержании ФСК XIa 11 мМЕ/мл и более [117].

Серии Октагама, вызвавшие тромбоэмболические НР, показали следующие значения ЭТП:

- а) максимальное количество образовавшегося тромбина более 350 нМоль,
- б) латентный период (лаг-фаза) 7 - 15 мин в зависимости серии,
- в) период образования максимального количества тромбина 9 - 18 мин [146].

Для ЛП Октагам, изготовленного по измененной технологии с этапами хроматографической очистки от ФСК, значения параметров эндогенного тромбинового потенциала в тесте генерации тромбина составили:

- а) максимальное количество образовавшегося тромбина не более 69 нМоль,
- б) латентный период (лаг-фаза) не менее 15 мин,
- в) период образования максимального количества тромбина не менее 21 мин [194].

На модели венозного стаза по S.Wessler в исследованиях Germishuizen W.A. с соавт устновил, что при содержании ФСК XIa от 40 до 140 мМЕ/мл ЛП ИГЧ вызывал образование тромба у кроликов при введении в дозе 1 г/кг веса [144]. При содержании ФСК XIa 60 нг/мл (определенное методом иммуноферментного анализа) образование тромбов при введении ЛП ИГЧ не обнаружено.

Таким образом, нами установлены критерии оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ:

- эндогенный тромбиновый 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);

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

- отсутствие тромбообразования при введении модельным животным [37].

#### **4.2. Унификация методик для оценки тромбогенного потенциала лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека *in vitro* и *in vivo***

Определение активности факторов свертывания крови II, X, V, VII, IX клоттинговыми методами проводили в соответствии с предустановленным алгоритмом анализа активированного тромбопластинового времени автоматизированной системы BCS® XP. Эти методы основаны на оценке изменения времени свертывания крови плазмы крови человека, дефицитной по конкретному фактору свертывания, при внесении соответствующего реагента кефалина или тромбопластина. Остаточные количества факторов свертывания крови в образцах препаратов иммуноглобулинов человека укорачивают этот временной интервал. Активность фактора определяли по калибровочной кривой, установленной с использованием соответствующего международного стандарта. Использовали диапазон разведений стандарта, не превышающий 0,1 МЕ/мл. Определение активности факторов свертывания крови II, X, IXa, XIa хромогенными методами проводили с использованием методик Rossix Chromogenic, адаптированных для системы BCS® XP. Так на основе методики CoaChrom® Prothrombin была разработан алгоритм для определения фактора свертывания крови II:

- 1 цикл – 1) внесение в инкубационную камеру 0,05 мл исследуемого/стандартного образца;

- 2) инкубация исследуемого/стандартного образца при температуре 37 °С в течение от 2 до 4 мин;
- 2 цикл – 1) внесение в инкубационную камеру 0,05 мл рабочего раствора экарина, подогретого до 37 °С;
- 2) инкубация смеси при температуре 37 °С в течение от 3 мин;
- 3 цикл – 1) внесение в инкубационную камеру 0,05 мл хромогенного субстрата, подогретого до 37 °С;
- 2) измерение скорости изменения оптического поглощения в минуту при длине волны 405 нм.

Воспроизведение методики в ручном режиме с использованием спектрофотометра Multiskan Go позволило подтвердить адекватность адаптации для системы BCS® XP.

Для определения активности ФСК II, VII, IX, XI, XII хромогенными методами и неактивированного частичного тромбопластинового времени методики с использованием реагентов других производителей также адаптировали для системы BCS® XP.

Определение остаточной активности ФСК клоттинговыми методами проводили с применением реагентов кефалина Pathromtin SL, Actin FS и тромбопластина Thromborel S, Dade Innovin и международных стандартов соответствующих ФСК для построения калибровочных графиков. В соответствии с ОФС.1.8.2.0003.15 «Определение активности факторов свертывания крови» [75] определение активности ФСК осуществляют в диапазоне 0,3 – 1,0 МЕ/мл. Для оценки применимости существующих методов нами была установлена возможность определения активности ФСК в исследуемых образцах в диапазоне менее 0,1 МЕ/мл (таблица 6).

Полученные результаты в диапазоне активности ФСК X 0,028 - 0,112 МЕ/мл; в котором калибровочный график имел коэффициент корреляции более 0,98 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.

Таблица 6 – Характеристики методик клоттингового определения активности факторов свертывания крови

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

Использование реагента Dade Innovin в этом же диапазоне не позволяет адекватно оценить содержание ФСК X. Для оценки содержания ФСК IX возможно использование в качестве активатора оба изученных реагента кефалина. Специфичность, линейность и правильность унифицированных методик позволяет использовать их для оценки качества ЛП ИГЧ по содержанию ФСК.

Для определение активности фактора XIа с использованием набора реагентов были использованы разведения исследуемых препаратов ИГЧ в соответствии с указаниями в инструкции к набору 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 при условии построения калибровочного графика в диапазоне активности от 0 до 1,4 мМЕ/мл (Рисунок 12).

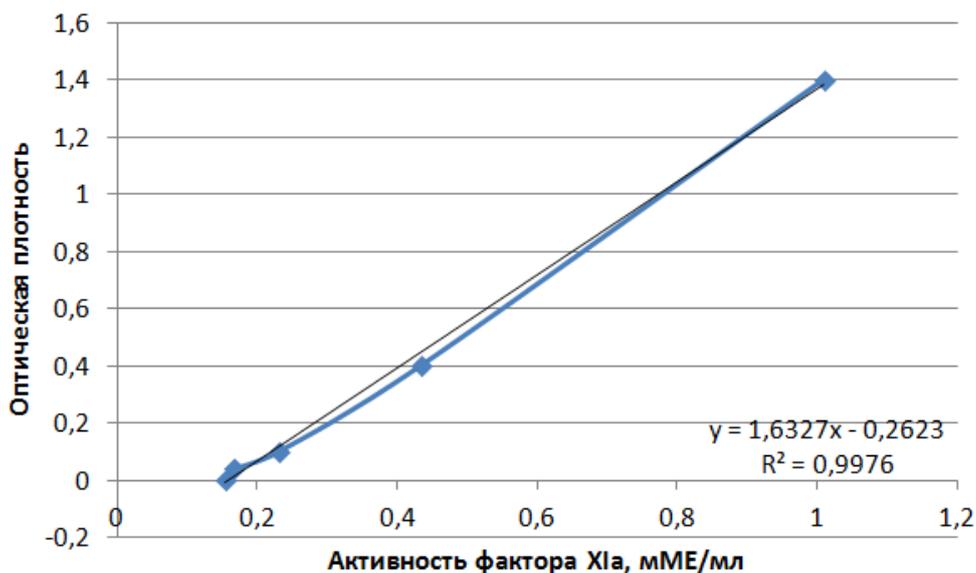


Рисунок 12 – Калибровочный график для определения содержания фактора XIa в ЛП ИГЧ.

Таким образом, проведенная унификация методик определения активности ФСК клоттинговыми методами позволяет применять их для контроля ЛП ИГЧ с целью оценки тромбогенного потенциала. Метод определения частичного тромбопластинового времени применяется в клинической практике для выявления проблем с факторами II, V, X или фибриногеном. В настоящих исследованиях нами был разработан алгоритм оценки частичного тромбопластинового времени для системы BCS® XP:

- 1 цикл – 1) внесение в инкубационную камеру 0,05 мл исследуемого/стандартного образца;
- 2 цикл – 1) внесение в инкубационную камеру 0,05 мл стандартной плазмы крови, подогретой до 37 °С;  
2) инкубация смеси при температуре 37 °С в течение 50 сек;
- 3 цикл – 1) внесение в инкубационную камеру 0,05 мл Actin FS,  
2) инкубация смеси при температуре 37 °С в течение 100 сек;
- 4 цикл – 1) внесение в инкубационную камеру 0,05 мл кальция хлорида,  
2) измерение скорости изменения оптического поглощения в минуту при длине волны 405 нм.

Аналогичным образом был разработан алгоритм с использованием реагента Pathromtin SL. Указанные методики позволили оценить влияние образцов ЛП ИГЧ на изменение скорости образования сгустка. При исследовании образцов ИГЧ с добавлением ФСК XIa до расчетного содержания 50 мМЕ/мл выявлялось сокращение времени свертывания крови стандартной плазмы до 150 сек и менее, при этом при использовании буферного раствора в качестве контрольного образца время свертывания стандартной плазмы было более 300 сек, стандартной плазмы - не менее 250 сек.

Изучение кинетики образования тромбина возможно с использованием методики INNOVANCE® ETP, которая является усовершенствованным вариантом оригинальной методики и позволяет определять максимальное количество тромбина, латентный период генерации тромбина и период образования максимального количества тромбин [80].

В методике INNOVANCE® ETP использовали соотношение стандартной плазмы и образца иммуноглобулина использовали 8:1, используемое рядом производителей ЛП ИГЧ для оценки тромбогенного потенциала препаратов в тесте теста генерации тромбина Technotrombin TGA (Technoclone). Полученные результаты позволили сделать вывод, что латентный период генерации тромбина не превышает 11 мин и период образования максимального количества тромбина не превышает 19 мин для всех изученных образцов. При исследовании образцов ИГЧ с добавлением ФСК XIa до расчетного содержания 50 мМЕ/мл определяемый латентный период генерации тромбина уменьшался до 9 - 10 мин и период образования максимального количества тромбина до 15 - 18 мин, что позволило сделать вывод о приемлемости методики INNOVANCE® ETP для оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ.

### **4.3. Изучение тромбогенного потенциала лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека**

В дальнейших исследованиях для оценки возможности использования унифицированных методик был изучен тромбогенный потенциал инфузионных препаратов ИГЧ отечественного и зарубежного производства по содержанию ФСК протромбинового комплекса и ЭТП (таблица 7). Учитывая особенности производства отечественных ЛП ИГЧ, связанные с отсутствием этапов препаративного выделения из производственного пула ПКЧ белков ФСК, антитромбина III и др. в образцах ЛП ИГЧ также оценили содержание АТ III, обладающего антикоагулянтным действием. Установлено, что активность ФСК крови II и X в изученных ЛП ИГЧ ни клоттинговым, ни хромогенным методами не выявляется, т.е. отсутствует коагуляция дефицитной плазмы по соответствующему фактору или значение изменения оптической плотности в образце достоверно не отличается от холостой пробы. Это закономерно при одновременном присутствии в них АТ III, который является ингибитором тромбина, а также активен в отношении X фактора.

При определении активности ФСК V и XI наблюдалась коагуляция плазмы, дефицитной плазмы по соответствующему фактору, в тоже время нижним пределом используемых калибровочных кривых являлось значение 30 мМЕ/мл, что позволило установить содержание указанных факторов в образцах ЛП ИГЧ как «менее 30 мМЕ/мл».

Все изученные образцы соответствовали критериям оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ, за исключением одного наименования отечественного ЛП ИГЧ по содержанию фактора IX, которое превышало 50 мМЕ/мл. Показатели эндогенного тромбинового потенциала во всех изученных образцов свидетельствует о низком тромбогенном потенциала [37].

Таблица 7 – Результаты изучения тромбогенного потенциала образцов инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека

Наименование/ Производитель (количество определений)	Активность								Показатели ЭТП		
	фактора свертывания ..., мМЕ/мл ( $\bar{x} \pm S_x$ )								АТ III, МЕ/мл ( $\bar{x} \pm S_x$ )	ЛПГТ, мин	ПОМКТ, мин
	II	V	VII	IX	IXa	X	XI	XIa			
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	11	30
Иммуновенин® / ФГУП «НПО «Микроген» (n=10)			15,00±1,80	10, менее	0,07±0,01				1,25±0,20	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	Не определяли	
Имбиоглобулин® / ФГУП «НПО «Микроген» (n=5)			12,00±2,45	70,50±20,1	0,36±0,01				Не определяли	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	27	29
Гамунекс (Талекрис Биотерапьютикс Инк. (n=5)			11,00±1,03	20,06±0,28	0,09±0,02				Не выявляется	18	31
Иммуноглобулин Сигардис (Сычуаньская Юанда Шуян Фармацевтическая компания, Китай) (n=7)			10, менее	30,76±0,32	0,03±0,01				Не выявляется	Не определяли	
Примечания. АТ III – антитромбин III; ЭТП – эндогенный тромбиновый потенциал; ЛПГТ – латентный период генерации тромбина; ПОМКТ – период образования максимального количества тромбина											

Использование программы BCS®XP «Определение активированного частичного тромбопластинового времени» и разработанного алгоритма «Определение неактивированного частичного тромбопластинового времени» с реагентами кефалина Pathromtin SL и Actin FS позволило выявить отсутствие сокращения времени свертывания стандартной ПКЧ при внесении образцов ЛП ИГЧ (таблица 8).

Таблица 8 – Результаты определения частичного тромбопластинового времени с использованием образцов инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека

Наименование/ Производитель (количество определений)	Активированное частичное тромбопластиновое время			Неактивированное частичное тромбопластиновое время		
	Время образования сгустка для образца..., сек			Время образования сгустка для образца..., сек		
	ИГЧ	ИГЧ + ФСК XIa	Буферный раствор	ИГЧ	ИГЧ + ФСК XIa	Буферный раствор
Габриглобин®–Ig G / ЗАО «Имуно-Гем» (n=5)	254	148	350	257	130	360
Имуновенин® / ФГУП «НПО «Микроген» (n=10)	264	130	320	268	125	325
Имуноглобулин человека нормальный / ФГУП «НПО «Микроген» (n=5)	255	150	375	260	110	345
Имбиоглобулин® / ФГУП «НПО «Микроген» (n=5)	269	128	325	260	146	350
Имуноглобулин человека нормальный / ОСПК им. Климовой(n=5)	270	136	299	272	124	300
Гамунекс (Талекрис Биотерапьютикс Инк. (n=5)	289	150	329	290	135	305
Имуноглобулин Сигардис/Сычуаньская Юанда Шуян Фармацевтическая компания, Китай (n=7)	280	145	370	275	137	297
Примечание - значение частичного тромбопластинового времени стандартной плазмы крови человека составляет не менее 250 мин						

В дальнейших исследованиях нами была изучена способность ЛП ИГЧ обуславливать образование тромба на модели венозного стаза *in vivo*. Как показал анализ научной литературы, представленный в разделе 1, наиболее приемлемой для этого является модель S.Wesslera, позволяющая оценивать препараты в дозе, адекватной разовой дозе в пересчете на килограмм веса, а размер формирующихся тромбов является приемлемым критерием для оценки ЛП ИГЧ. В ходе экспериментальных исследований нами разработаны схема проведения премедикации и внутривенной анестезии, схема введения исследуемого препарата, идентичная минимальной разовой терапевтической дозе, методика извлечения из сосуда тромба и определения его размеров. В качестве положительного контроля была использована стандартная ПКЧ (образование тромба в 100 % случаях введения в объеме 2,5 мл), отрицательного – 0,9 % раствор натрия хлорида (отсутствие образования тромба в 100 % случаях введения в объеме 5,0 мл) [S.Wessler]. Результаты исследования, представленные в таблице 9, показали, что введение кролику препарата производства Италия не индуцирует образование тромба. В тоже время, при введении образцов препаратов российского производства, а также производства США и Китай были выявлены тромбы. Введение кроликам 0,9 % раствора натрия хлорида подтвердило отсутствие спонтанного тромбообразования, а введение ПКЧ индуцировало у кроликов образование тромбов.

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 из исследованных ЛП российского и зарубежного производства при введении кроликам в минимальной разовой дозе вызвали 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*.

Таблица 9 – Результаты тромбообразования в яремной вене кроликов при введении ЛП ИГЧ

Наименование образца (производитель, страна)	Номер образца	Вес кролика, кг	Вводимый объем, мл	Длина сосуда, см	Размеры тромба/тромбов, мм
0,9 % раствор натрия хлорида (ЭКОлаб, Россия)	1	2,4	5,0	2,0	Тромбы отсутствовали
	2	2,4	5,0	2,0	
	3	2,3	5,0	2,1	
Стандартная плазма (Siemens, Германия)	1	2,5	2,5	2,0	7,5 x 1,5 (с перетяжкой)
	2	2,6	2,5	2,2	8,5 x 1,5
	3	2,4	2,5	1,8	63 x 1,0
Иммуноглобулин Сигардис (Сычуаньская Юанда Шуян Фармацевтическая компания, Китай)	1	2,3	18,4	2,7	4,0 x 2,0
	2	2,2	18,0	2,0	3,5 x 1,0
	3	2,2	18,1	2,3	3,0 x 2,2
Гамунекс (Талекрис Биотерапьютикс Инк., США) *	1	2,0	6,0	2,0	3,5 x 1,0 1,5 x 2,0
	2	2,1	6,1	1,8	4,0 x 2,1
	3	2,0	6,0	1,9	1,0 x 1,0 2,1 x 2,0
Иммуновенин® (ФГУП «НПО «Микроген», Россия)	1	2,4	19,2	2,3	2,0 x 2,0 1,5 x 2,0
	2	2,3	19,0	1,9	1,4 x 1,0
	3	2,2	18,9	2,0	2,4 x 1,1
И.Г.Вена (Кедрион С.п.А., Италия)	1	2,1	16,8	1,8	Тромбы отсутствовали
	2	2,2	17,0	2,0	
	3	2,1	16,8	1,9	
Примечание - * - содержание белка 100 мг/мл					

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. На основе результатов информационно-аналитических исследований обоснованы критерии оценки тромбогенного потенциала ЛП ИГЧ по остаточному содержанию прокоагулянтных факторов свертывания крови (активность фактора XIa не более 10 мМЕ/мл, активность факторов II, VII, IX, X и др. менее 50 мМЕ/мл), неактивированному частичному тромбопластиновому времени (отсутствие сокращения времени свертывания стандартной плазмы крови человека при внесении образцов препаратов иммуноглобулинов), ЭТП (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).

2. Адаптированными и унифицированными методиками хромогенных и клоттинговых методов клинического анализа установлено остаточное содержание ФСК II, V, VII, IX, IXa, X, XI, XIa в образцах ЛП ИГЧ для внутривенного введения отечественного и зарубежного производства, не превышающее 50 мМЕ/мл, в образцах, произведенных на производственной площадке в г.Н.Новгород ФГУП «НПО «Микроген», остаточное содержание ФСК IX составило от 20 до 130 мМЕ/мл. Выявлено наличие АТ III в образцах ЛП ИГЧ отечественного производства в количестве от 0,41 до 1,83 МЕ/мл. Показан низкий тромбогенный потенциал образцов ЛП ИГЧ (в минимальной разовой дозе, эквивалентной 0,2 г/кг) в тесте генерации тромбина.

3. Обоснована методика изучения тромбообразования при внутривенном введении ЛП ИГЧ кроликам по методу S.Wessler, экспериментально установлена способность к генерации тромбообразования в минимальной разовой дозе, эквивалентной 0,2 г/кг для препаратов производства фармацевтических предприятий РФ, США, Китая.

## **ГЛАВА 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ**

На решение задачи обеспечения единства измерений и сопоставимости их результатов в части контроля качества лекарственных препаратов были направлены дальнейшие исследования по разработке унифицированных методик контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ, гармонизированных с фармакопейными методами (ЕФ, Фармакопея США и др.) по показателям специфической безопасности: «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела», «Активатор прекалликреина».

### **5.1. Разработка унифицированной методики контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека по показателю «Антикомплементарная активность»**

Отечественные методики определения АКА не позволяют установить качество ЛП ИГЧ в соответствии с международными требованиями [54], так как при оценке уровня АКА СО иммуноглобулина человека ВРР значения для положительного и отрицательного контролей не соответствуют аттестованным значениям, указанным в листе-вкладыше на СО [57, 62]. В дальнейших исследованиях нами была разработана унифицированная методика определения АКА ЛП ИГЧ с учетом доступности реагентов.

Для оценки допустимости использования реагентов гемолитической сыворотки различного производства нами была изучена сопоставимость результатов определения рабочей дозы гемолизина, которая должна составлять 2 МГЕ/мл (минимальная гемолитическая единица в мл). При этом критерием соответствия активности гемолитической сыворотки 1 МГЕ/мл

является отсутствие увеличения степени гемолиза при уменьшении ее разведения [62].

Активность рассматриваемых реагентов в условиях эксперимента была идентичной, что позволило сделать вывод о приемлемости их использования в унифицированной методике. В методике определения АКА для получения рабочего разведения реагенты гемолизина, проявившие активность, равную 1 МГЕ/мл, в разведении 1:500, использованы в разведении 1:250.

В дальнейших исследованиях была изучена возможность унификации методики по реагенту кровь баранья, используемому для получения 5 % суспензии эритроцитов. Анализ НД на ЛП ИГЧ, зарегистрированных на территории РФ, позволил установить приоритетность в использовании отечественными производителями крови бараньей дефибринированной, стабилизированной в растворе Олсвера или свежеприготовленной, полученной в лабораторных условиях (*in house*). Для контроля качества ЛП ИГЧ зарубежного производства, предусмотрено использование как коммерческих реагентов, так и крови бараньей (овечьей) полученной в лабораторных условиях (*in house*). Для испытательных лабораторий, осуществляющих контроль качества ЛП на соответствие требованиям НД, изготовление биологических реагентов, в том числе содержащих эритроциты, невозможно. Поэтому, среди доступных к приобретению на территории РФ для дальнейших исследований нами выбраны реагенты отечественного производства «Кровь баранья для питательных сред, стерильная (с цитратом натрия)» и набор реагентов «Кровь баранья консервированная для реакции связывания комплемента», а также кровь баранья дефибринированная, стабилизированная в растворе Олсвера, полученная в лабораторных условиях (*in house*).

Результаты определения АКА СО иммуноглобулина человека BRP с использованием различных реагентов крови подтверждают их применимость в унифицированной методике (таблица 10).

Таблица 10 - Антикомплементарная активность стандартного образца иммуноглобулина человека BRP при использовании различных реагентов крови

Наименование реагента	Наименование компонента СО иммуноглобулина человека BRP	Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека BRP с использованием крови бараньей на ... сутки взятия, процент, $\bar{x} \pm S_x$				t-критерий Стьюдента			
		7	14	21	28	7	14	21	28
Кровь баранья для питательных сред, стерильная (с цитратом натрия)	Отрицательный контроль	17,3±7,9	20,2±6,4	19,4±4,99	18,5±3,4	0,51	0,09	0,27	0,37
	Положительный контроль	76,2±2,7	75,3±3,9	79,2±4,2	75,4±2,6	0,37	1,54	0,39	2,21
Кровь баранья консервированная для реакции связывания комплемента	Отрицательный контроль	20,3±5,4	18,5±3,4	20,5±2,7	20,4±3,9	0,21	0,51	0,68	0,37
	Положительный контроль	75,3±3,2	79,5±2,4	80,3±4,4	84,2±3,0	0,51	0,95	0,20	2,21
Кровь баранья дефибринированная ( <i>in house</i> ).	Отрицательный контроль	21,6±3,3	20,8±2,9	17,9±2,7	Определить невозможно	-	-	-	-
	Положительный контроль	78,2±4,6	84,0±4,1	81,5±4,2	Определить невозможно	-	-	-	-

Примечания.

1 – количество исследований составило 4 для каждого реагента на 7, 14, 21 и 28 сутки

2 - теоретическое значение t-критерия Стьюдента составило 2,447

3– оценка значимости различий осуществлялась между коммерческими реагентами крови и полученным в лабораторных условиях на 7 и 14 сутки, на 21 и 28 сутки – между коммерческими реагентами

В качестве критериев пригодности применения реагентов крови бараньей установлены:

- а) внешний вид реагента, который должен характеризоваться отсутствием гемолиза надосадочной жидкости, алым цветом при встряхивании суспензии;
- б) отсутствием гемолиза при отмывании буферным раствором;
- в) получение прозрачной надосадочной жидкости при третьем отмывании.

При использовании крови бараньей дефибринированной, стабилизированной в растворе Олсвера, полученной в лабораторных условиях (*in house*) по истечении 21 суток после взятия от животного критерии не соблюдались, поэтому срок использования этого реагента ограничен 21 сутками.

Анализ результатов, представленных в таблице 10 показал, что различия между получаемыми результатами определения АКА СО иммуноглобулина человека BRP с использованием различных реагентов крови статистически не значимы. Значимости различий между результатами, полученными с реагентами крови бараньей на разные сроки использования, также не установлено: t-критерий Стьюдента для цитратной крови на 7 и 28 сутки использования был равен 0,21 для положительного контроля и 1,1 для отрицательного; для крови РСК – 2,02 и 0,02, соответственно. Отсутствие значимости различий между результатами определения АКА с использованием крови *in house* на 7 и 21 сутки также подтверждалось меньшим значением экспериментально полученного t-критерия Стьюдента 0,57 и 0,07 для положительного и отрицательного контролей СО, соответственно, по сравнению с теоретическим 2,447.

В соответствии с монографией ЕФ 2.6.17 TEST FOR ANTUCOMPLEMENTARY ACTIVITY OF IMMUNOGLOBULIN перед испытаниями на АКА с учетом данных по валидации методики для конкретного препарата проводят корректировку pH раствора ЛП ИГЧ до

значения 7,0 [134]. Оценка целесообразности корректировки рН при определении АКА отечественных ЛП показала ее значимость для получения достоверных результатов [56].

Результаты анализа литературных данных, представленные в главе 1, свидетельствуют о необходимости унификации методики определения АКА по используемому реагенту комплемент. В настоящее время доступны к применению как коммерческие реагенты, так и изготовленный в лабораторных условиях. В дальнейших исследованиях нами были изучено влияние различных серий и источников получения комплемента морских свинок. Установлено, что только при использовании комплемента морских свинок, изготовленного в лабораторных условиях (*in house*), АКА положительного и отрицательного контролей СО иммуноглобулина человека BRP соответствуют аттестованным значениям (таблица 11). Скрининг различных серий комплемента (*in house*) показал, что для получения сыворотки крови необходимо использовать морских свинок только мужского пола, так как серии комплемента, изготовленные из сыворотки крови особей обоего пола, отличались нестабильностью гемолитических свойств. Оценка уровня АКА ЛП ИГЧ для внутривенного введения отечественного производства показала, что наибольшие значения АКА получены при использовании пулированного комплемента (*in house*) (таблица 12). Сравнительный анализ полученных значений АКА показал, что разница между ними при использовании комплемента различного производства составила от 6 для ЛП «Имуноглобулин человека нормальный, раствор для внутривенного введения» до 1,5 раз для ЛП «Имуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий». Следует отметить, что паспортные данные на исследованные серии ЛП «Имуноглобулин человека нормальный, раствор для внутривенного введения» соответствуют значениям АКА 0,0 СН50/мг белка (n=110), что свидетельствует о неадекватной оценке качества ЛП на производстве с использованием методики МУК 3.3.2.1063-01.

Таблица 11 – Антикомплементарная активность стандартного образца иммуноглобулина человека BRP при использовании комплемента морских свинок различных производителей

Наименование реагента/ производитель	Серия реагента (количество исследований)	Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека BRP, процент, $\bar{x} \pm S_x$		Аттестованные значения антикомплементарной активности СО иммуноглобулина человека BRP, процент	
		Отрицательный контроль	Положительный контроль	Отрицательный контроль*	Положительный контроль**
Комплемент сухой/ ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России	785 (n=6)	<b>8,5±2,2</b>	<b>14,6±3,7</b>	10 - 40	60 - 100
	806 (n=5)	13,4±1,7	Определить невозможно***		
	811 (n=9)	11,6±2,5	<b>36,4±5,9</b>		
	814 (n=8)	11,5±3,1	<b>32,2±5,3</b>		
COMPLEMENT/ Siemens	42178 (n=7)	14,2±2,8	<b>36,3±5,2</b>		
	42794 (n=10)	13,6±2,6	<b>40,1±4,6</b>		
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		

Таблица 12 – Антикомплементарная активность лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения отечественного производства

Наименование реагента/ производитель	Антикомплементарная активность лекарственных препаратов иммуноглобулина человека нормального					
	раствор для внутривенного введения		лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения		раствор для инфузий	
	CH <sub>50</sub> /мг белка, $\bar{x} \pm S_x$	процент, $\bar{x} \pm S_x$	CH <sub>50</sub> /мг белка, $\bar{x} \pm S_x$	процент, $\bar{x} \pm S_x$	CH <sub>50</sub> /мг белка, $\bar{x} \pm S_x$	процент, $\bar{x} \pm S_x$
Комплемент сухой/ ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России	0,06±0,05 (n=33)	3,3±2,1 (n=33)	0,10±0,06 (n=12)	5,1±3,2 (n=12)	0,44±0,04 (n=3)	21,9±2,1 (n=3)
COMPLEMENT/ Siemens	0,18±0,07 (n=9)	8,9±3,5 (n=9)	0,23±0,06 (n=16)	11,6±3,2 (n=16)	0,42±0,12 (n=10)	20,8±5,9 (n=10)
Пулированный комплемент/ <i>in house</i>	0,36±0,09 (n=57)	17,9±4,4 (n=57)	0,42±0,13 (n=74)	20,8±6,4 (n=74)	0,61±0,17 (n=26)	30,4±8,6 (n=26)
Примечание – n – количество исследованных серий лекарственного препарата						

Для ЛП «Иммуноглобулин человека нормальный, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения» по сравнению с установленными значениями в эксперименте, значения АКА по данным производителя в среднем в 4,4 раза меньше:  $4,7 \pm 2,6$  % (n=143) против  $20,8 \pm 6,4$  % (n=74). Для ЛП ИГЧ зарубежного производства характерно использование для контроля качества по показателю «Антикомплементарная активность» пулированного компонента собственного изготовления.

Методикой ЕФ предусмотрено использование желатин-барбиталового буферного раствора. Однако в настоящее время использование 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты и ее солей ограничено соответствующим лицензированием. Методическими рекомендациями было предусмотрено использование желатин-солевого раствора (ЖСР) следующего состава: 8,50 г натрия хлорида; 0,10 г кальция хлорида безводного; 0,04 г магния хлорида 6-водного; 1,00 г желатина; воды очищенной до 1000 мл. Доводят pH раствора до 7,2-7,3 с помощью 0,1М раствора натрия гидроксида. Раствор используют свежеприготовленным.

В дальнейших исследованиях обосновали возможность применения ЖСР в методике ЕФ. Критерием приемлемости служило соответствие значений АКА положительного и отрицательного контролей СО ВРР аттестованным значениям. Так, при использовании ЖСР значения АКА для отрицательного контроля соответствовали диапазону от 12,5 до 22,3 %, в аналогичных условиях при использовании 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 [62]. Указанные значения соответствовали аттестованным.

Таким образом, проведенные исследования позволили разработать унифицированную методику по следующим реагентам: гемолитическая сыворотка, эритроциты барана, комплемент морской свинки, желатин-содержащий буферный раствор.

Результаты исследований были использованы при разработке ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека» [78]. Разработанная унифицированная методика позволяет оценивать уровень АКА ЛП ИГЧ отечественных производителей в соответствии с международными требованиями – не более 1 CH<sub>50</sub>/мг белка (не более 50 %) (таблица 13).

Таблица 13 – Антикомплементарная активность препаратов ИГЧ отечественного производства

Препарат иммуноглобулина человека в лекарственной форме	Антикомплементарная активность	
	CH <sub>50</sub> /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
Примечание – n – количество серий		

С целью получения воспроизводимых результатов методика стандартизована применением СО ЕФ. В то же время, для оценки значимости отклонений в процедуре выполнения испытаний необходим СО с установленными метрологическими характеристиками в виде среднего значения и стандартного отклонения.

## **5.2. 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-А и анти-В ГА, нами были унифицированы методы ЕФ с учетом доступности реагентов на территории РФ. Применительно к методу НГА, выполнение которого возможно с использованием реагентов российского производства, необходима оптимизация следующих критических параметров: подготовка суспензии эритроцитов, соотношение вносимых реагентов, кратность и режимы центрифугирования в процессе отмывания сенсibilизированных эритроцитов, временной интервал, допустимый для оценки результатов [39]. Нами установлена возможность применения не только свежеприготовленных эритроцитов (полученных на станции переливания крови), но и эритроцитов из наборов реагентов, хранящихся в стабилизирующем растворе (таблицы 14, 15).

Таблица 14 - Результаты определения содержания гемагглютининов «на плоскости»

Эритроциты группы крови	Производитель/ наименование реагента	Степень агглютинации стандартных эритроцитов в разведении ... ЛП ИГЧ					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
А(II)	СПК	4+	3+	2+	2+	1+	-
	ID-DiaCell O-A-B 5%	4+	3+	2+	2+	1+	-
В(III)	СПК	3+	2+	2+	1+	-	-
	ID-DiaCell O-A-B 5%	3+	2+	2+	1+	-	-
0(I)	ID-DiaCell O-A-B 5%	-	-	-	-	-	-
Примечание – СПК – станция переливания крови							

В качестве отрицательного контроля были использованы эритроциты группы крови 0(I).

Таблица 15 - Результаты определения содержания гемагглютининов гелевым методом

Эритроциты группы крови	Производитель/ наименование реагента	Степень агглютинации стандартных эритроцитов в разведении ... ЛП ИГЧ					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
А(II)	СПК	4+	3+	2+	2+	1+	-
	ID-DiaCell O-A-B 5%	4+	3+	2+	2+	1+	-
	Serigrup Diana A1/B	4+	3+	2+	2+	1+	-
В(III)	СПК	3+	2+	2+	1+	-	-
	ID-DiaCell O-A-B 5%	3+	2+	2+	1+	-	-
	Serigrup Diana A1/B	3+	2+	2+	1+	-	-
0(I)	ID-DiaCell O-A-B 5%	-	-	-	-	-	-
Примечание – СПК – станция переливания крови							

Методика подготовки эритроцитов включала центрифугирование суспензии в течение 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре, ресуспендирование осадка десятикратном объеме 0,9 % раствора натрия хлорида и снова центрифугирование в течение 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре.

Процедуру повторяли не менее 3 раз до получения прозрачной надосадочной жидкости. Использование более длительного центрифугирования или при большей скорости приводило к образованию плотного осадка эритроцитов, ресуспендирование которого приводило к повреждению клеток, что подтверждалось микроскопией.

Нами разработана методика приготовления контрольных клеток Кумбса, которые представляют собой эритроциты человека группы крови 0(I), резус-положительные, сенсibilизированные антирезусным иммуноглобулином G (анти-D антителами).

Эритроциты человека группы крови 0(I), резус-положительные из коммерческого набора реагентов центрифугировали 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость сливали. Полученный осадок ресуспендировали в десятикратном объеме 0,9 %

раствора натрия хлорида и снова центрифугируют в течение 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре. Процедуру повторяли не менее 3 раз до получения прозрачной надосадочной жидкости. В пробирку вносили 1 объем осадка отмытых эритроцитов, добавляли равный объем антирезусного иммуноглобулина или реагента, содержащего моноклональные анти-D (антирезусные) антитела, в титре 1:4. Смесь перемешивали и инкубировали при температуре  $(37\pm 0,5)$  °C в течение 30 мин. В случае, если происходила агглютинация процедуру повторяли, используя более разбавленный антирезусный иммуноглобулин или реагент, содержащий моноклональные анти-D (антирезусные) антитела. После инкубации сенсibilизированные эритроциты отмывали не менее 3 раз в 0,9 % растворе натрия хлорида до получения прозрачной надосадочной жидкости. Для оценки пригодности контрольных клеток Кумбса в пробирку вносили 1 объем антиглобулиновой сыворотки (сыворотки Кумбса) и 2 объема 5 % суспензии сенсibilизированных эритроцитов, осторожно перемешивают и через 5-10 мин оценивали агглютинацию.

При отсутствии агглютинации повторяли процедуру сенсibilизации резус-положительных эритроцитов группы крови 0(I) менее разбавленным антирезусным иммуноглобулином или реагентом, содержащим моноклональные анти-D (антирезусные) антитела.

С целью установления временного интервала, оптимального для оценки агглютинации нами проведена серия экспериментов с использованием международного СО (положительного с содержанием ГА и отрицательного, на содержащего ГА) (таблица16). Полученные результаты позволили сделать вывод, что временной интервал оценки агглютинации не должен превышать 10 мин, так как затем происходит неспецифическая агглютинация эритроцитов.

Таблица 16 – Результаты определения содержания ГА в международном СО при различном времени оценки агглютинации

Эритроциты группы крови	Время оценки, мин	СО	Степень агглютинации стандартных эритроцитов в разведении					
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
А(II)	1	полож	1+	-	-	-	-	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	3	полож	2+	2+	1+	1+	-	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	5	полож	4+	3+	2+	2+	1+	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	7	полож	4+	3+	2+	2+	1+	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	8	полож	4+	3+	2+	2+	1+	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	10	полож	4+	3+	2+	2+	1+	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
12	полож	4+	4+	3+	3+	1+	1+	
	отриц	2+	1+	1+	1+	1+	1+	
В(III)	1	полож	1+	-	-	-	-	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	3	полож	2+	2+	1+	1+	-	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	5	полож	4+	3+	2+	1+	-	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	7	полож	4+	3+	2+	1+	-	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	8	полож	4+	3+	2+	1+	-	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
	10	полож	4+	3+	2+	1+	-	-
		отриц	-	-	-	-	-	-
12	полож	4+	4+	3+	2+	1+	1+	
	отриц	2+	1+	1+	1+	1+	1+	
0(I)	12	полож	-	-	-	-	-	

Метод ПГА, регламентированный ЕФ, также предусматривает использование эритроцитов группы крови А(II) наиболее иммуногенной подгруппы А<sub>1</sub> и группы крови В(III) для выявления анти-А ГА и анти-В ГА соответственно [134]. Однако для повышения чувствительности реакции необходима предварительная обработка эритроцитов папаином. Нами обоснована методика папаинизации эритроцитов с учетом доступных реагентов папаина. Лиофилизат растворяли в 2,5 мл воды очищенной. Инкубировали при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  в течение 10–15 мин. Раствор использовали свежеприготовленным или хранившимся при температуре  $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$  в течение не более 5 дней или при температуре минус  $(21 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение не более 6 месяцев. Раствор после оттаивания повторно не замораживали. Для папаинизации эритроцитов в стеклянную пробирку вносили равные объемы промытых эритроцитов и приготовленного раствора папаина, инкубировали в течение от 10 до 15 мин при температуре  $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , а затем центрифугировали при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре  $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ , после удаления надосадочной жидкости, осадок ресуспендировали в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора и опять центрифугировали. При 10 минутной инкубации результаты определения содержания ГА в международном СО характеризовались вариабельностью, превышающей 1 шаг разведения, поэтому время инкубации установили 15 мин.

С целью исключения вариабельности получаемых результатов ограничили время учета агглютинации от 4-5 до 10 минут аналогично реакции НГА.

В основе метода определения анти-D антител лежит метод ПГА ЕФ с использованием Rh(+) и Rh(-) эритроцитов, обработанных папаином [134]. При этом использована методика обработки эритроцитов папаином, разработанная в ходе унификации методики определения ГА. В дальнейших исследованиях нами установлена возможность применения не только

свежеприготовленных эритроцитов, но и эритроцитов из наборов реагентов, хранящихся в стабилизирующем растворе (таблица 17).

Таблица 17 - Результаты определения содержания анти-D антител.

Эритроциты группы крови	Производитель/наименование реагента	Степень агглютинации стандартных эритроцитов в разведении ... ЛП ИГЧ					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
R1R1	СПК	2+	1+	-	-	-	-
	ID-DiaCell I-II-III 5%,	2+	1+	-	-	-	-
R2R2	СПК	2+	1+	-	-	-	-
	ID-DiaCell I-II-III 5%,	2+	1+	-	-	-	-
rr	ID-DiaCell I-II-III 5%,	-	-	-	-	-	-
Примечание – СПК – станция переливания крови							

Нами обоснована применимость методики с использованием гелевой технологии, используемой в клинической практике при установлении резус принадлежности, для оценки содержания анти-D антител в ЛП ИГЧ. Были получены результаты определения содержания анти-D антител в международном СО в соответствии с аттестованными значениями: 1:8 для положительного контроля; 1:2 или менее в отрицательном. Титр 1:2 выявлялся в случаях использования тестовых эритроцитов, содержащих антиген С<sup>w</sup>, что допускается инструкцией по применению СО. С целью исключения вариабельности получаемых результатов ограничено время учета агглютинации от 4-5 до 10 минут.

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

международным требованиям (таблица 18). Результаты определения содержания ГА при использовании гелевой технологии и «на плоскости» обоими методами: ПГА и НГА были сопоставимыми, размах значений не превышал одного шага разведений.

Таблица 18 – 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)
Примечания. 1. n – количество серий. 2. указаны Мо титра антиэритроцитарных антител и диапазон значений			

С целью оценки сопоставимости методик, применяемых зарубежными производителями, и разработанных нами провели изучение содержания антиэритроцитарных антител в ЛП ИГЧ зарубежного производства (таблица 19). Применение указанных методик позволило установить содержание ГА в титре, не отличающемся более чем на один шаг разведения.

Проведенные исследования позволили разработать проекты ОФС «Определение анти-A и анти-B гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека», ОФС «Определение анти-A и анти-B гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека». ОФС «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека» на методы/методику контроля содержания антиэритроцитарных антител.

Таблица 19 – Содержание антиэритроцитарных антител в препаратах иммуноглобулинов человека зарубежного производства

Наименование образца (производитель, страна)	Наименование метода	Гемагглютинины		Анти-D антитела
		анти-A	анти-B	
Гамунекс (Талекрис Биотерапьютикс Инк, США) (n=5)	НГА <sup>3</sup>	1:8 (1:4 – 1:16)	1:4 (1:2 – 1:4)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
	НГА <sup>4</sup>	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) (n=5)	ПГА <sup>3</sup>	1:4 (1:4 – 1:16)	1:4 (1:2 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
	ПГА <sup>4</sup>	1:4 (1:4 – 1:16)	1:4 (1:4 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
Иммуноглобулин Сигардис (Сычуаньская Юанда Шуян Фармацевтическая компания, Китай) (n=10)	НГА <sup>3</sup>	1:8 (1:2 – 1:8)	1:8 (1:2 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
	НГА <sup>4</sup>	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 <sup>3</sup>	1:8 (1:4 – 1:32)	1:4 (1:4 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
	НГА <sup>4</sup>	1:8 (1:4 – 1:32)	1:4 (1:4 – 1:8)	1:2 (менее 1:2 – 1:2)
Примечания. 1 - n – количество серий. 2 - указаны Мо титра антиэритроцитарных антител и диапазон значений 3 – методика производителя 4 – разработанная методика				

### 5.3. 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 [134],

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 [41]. Сертификаты анализа прекалликреина производства Coachrom Diagnostica и Nyphen, рекомендованных для использования в методике ЕФ, содержат информацию в виде «ПК-активность на 32 МЕ/мл:  $\Delta A_{405}/10$  мин», которая должна находиться в интервале от 0,2 до 0,6 оптических единиц. 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 1/10, 1/100, 1/200, 1/500. Для исключения ошибок, связанных с изменением ионной силы и значения pH инкубационной смеси использовали соотношение образца и прекалликреина 1:9. Оптимальная прекалликреиновая активность реагентов прекалликреина производства Sekisui Diagnostics GmbH, Enzyme Research Laboratories и Calbiochem, EDM Millipore Corporation соответствовала интервалу  $\Delta A/10$  мин от 0,2 до 0,6 оптических единиц при инкубировании реакционной смеси в течение 30 мин при температуре  $37 \pm 1$  °C (таблица 20). Оптимальная прекалликреиновая активность указанных реагентов, соответствующая  $\Delta A/10$  мин 0,34, 0,37 и 0,54 оптических единиц при инкубировании реакционной смеси в течение 30 мин при температуре

Таблица 20 - Результаты определения прекалликреиновой активности коммерческих реагентов прекалликреина

Наименование производителя реагента прекалликреина	Скорость изменения оптической плотности ( $\Delta A/10$ мин) для прекалликреина в разведении ... при различной продолжительности инкубации, единиц оптической плотности, $\bar{x}$ (количество исследований не менее 3)												
	Без разведения <sup>1</sup>			1/10			1/100			1/200			1/500
	10 мин	20 мин	30 мин	10 мин	20 мин	30 мин	10 мин	20 мин	30 мин	10 мин	20 мин	30 мин	30 мин
Sekisui Diagnostics GmbH	1,013	- <sup>2</sup>	0,638	0,983	1,073	1,140	0,173	0,273	0,336	0,058	0,075	0,077	0,033
Enzyme Research Laboratories	1,530	- <sup>2</sup>	0,822	1,550	1,054	1,150	1,163	0,213	0,370	0,084	0,067	0,051	0,032
EDM Millipore Corporation (Calbiochem)	1,760	1,675	1,332	1,950	1,012	1,850	0,763	0,913	0,835/ 0,544 <sup>3</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	0,331/ 0,098 <sup>3</sup>	0,090/ 0,054 <sup>3</sup>
Coachrom Diagnostica	0,128	0,080	0,194	0,046	0,064	0,051	0,010	0,012	0,034	0,009	0,008	0,01	- <sup>2</sup>
Huphen	0,130	0,154	0,210	0,039	0,024	0,043	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
ООО фирма «Технология-Стандарт»	0,086	0,090	0,400	0,189	0,167	0,190	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
<p>Примечания.  1 – прекалликреин производства Coachrom Diagnostica, Huphen и ООО фирма «Технология-Стандарт» восстанавливали в 2,0 мл воды очищенной производства Sekisui Diagnostics GmbH; Enzyme Research Laboratories и Calbiochem, EDM Millipore Corporation восстанавливали в воде очищенной до расчетного содержания 1,0 мг/мл;  2 – не определяли;  3- для разных серий реагента.</p>													

$37\pm 1^\circ\text{C}$ , была выявлена при использовании ПК в разведении с расчетным содержанием  $0,01$  мг/мл белка. Реагенты ПК производства Coachrom Diagnostica, Nyphen 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  $0,40$ , соответственно. Адекватность использования хромогенного субстрата в концентрации  $2$  мМ подтверждается  $\Delta A/10$  мин равной от  $0,2$  до  $0,6$ , в тоже время разведение хромогенного субстрата до  $0,6$  мМ не применимо для использования микропланшет, так как должно быть внесено в реакционную смесь в соотношении  $1:40$ , и не обеспечивает указанный диапазон  $\Delta A/10$  мин.

Оптимальным временем инкубации реакционной смеси при  $37\pm 1^\circ\text{C}$  является  $30$  мин. Для исключения неспецифического снижения количества прекалликреина и заниженной оценки содержания АПК нецелесообразно увеличивать время инкубации более  $30$  мин. Прекалликреиновая активность реагентов прекалликреина производства Sekisui Diagnostics GmbH, Enzyme Research Laboratories и EDM Millipore Corporation с содержанием белка  $1,0$  мг/мл, соответствующая  $\Delta A/10$  мин в диапазоне  $0,638$ – $1,332$  с последующим увеличением значения этого параметра до  $0,983$ – $1,155$  при содержании белка  $0,1$  мг/мл обусловлена неадекватным соотношением реагентов.

По окончании инкубации в реакционную смесь вносили равное (реакционной смеси) количество хромогенного субстрата в концентрации  $2$  мМ и измеряли при  $37\pm 1^\circ\text{C}$  кинетическое изменение оптической плотности. В методике со стоп-реагентом после внесения хромогенного субстрата инкубацию проводили при  $37\pm 1^\circ\text{C}$  еще  $15$  минут и вносили стоп-реагент в количестве, равном количеству внесенного хромогенного субстрата. Использование указанных соотношений реагентов позволяет воспроизводить методику как в микропланшетах, так и в пробирках.

Разработанными методиками нами было изучено содержание АПК в ЛП ИГЧ и АЧ отечественного производства (таблица 21).

Таблица 21 – Содержание активатора прекалликреина в препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека отечественного производства

Наименование препарата (производитель, город)	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл	
Альбумин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Уфа)	5,3 <sup>1</sup>	5,8 <sup>2</sup>
Альбумин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Пермь)	1,1 <sup>1</sup>	1,9 <sup>2</sup>
Альбумин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Томск)	4,7 <sup>1</sup>	4,7 <sup>2</sup>
Альбумин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Н.Новгород)	Менее 1 <sup>1</sup>	Менее 1 <sup>2</sup>
Альбумин (ГБУЗ «СПК Калининградской области», г. Калининград)	Менее 1 <sup>1</sup>	Менее 1 <sup>2</sup>
Альбумин (ГУЗ СО «СПК № 2 «САНГВИС», г. Екатеринбург)	9,1 <sup>1</sup>	15,4 <sup>2</sup>
Иммуновенин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Уфа)	Менее 1 <sup>1</sup>	Менее 1 <sup>2</sup>
Имбиоглобулин (ФГУП «НПО «Микроген», г. Нижний Новгород)	Менее 1 <sup>1</sup>	Менее 1 <sup>2</sup>
Примечания.		
1. Содержание активатора прекалликреина изучено хромогенным кинетическим методом.		
2. Содержание активатора прекалликреина изучено хромогенным методом с оценкой по конечной точке.		

Полученные результаты свидетельствовали о применимости методик для оценки качества изучаемых препаратов в допустимом диапазоне – не более 35 МЕ/мл [47, 58]. Для подтверждения сопоставимости результатов определения АПК в ЛП ИГЧ и АЧ зарубежного производства разработанными нами методиками и методиками производителей была проведена серия экспериментов с использованием реагентов ПК в соответствии с указаниями в НД; построение калибровочного графика и пробоподготовку образца осуществляли в диапазоне, регламентированном

НД. Подготовка ПК соответствовала используемым методикам (таблица 22). Провели по 3 определения, статистически значимых различий в полученных результатах не установлено.

Таблица 22 – Содержание активатора прекалликреина в препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека зарубежного производства

Группировочное наименование/номер образца (страна производства)	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл, $\bar{x} \pm S_x$		t-критерий Стьюдента
	методика фирмы	разработанная методика	
АЧ/1 (США)	$2,4 \pm 0,6^2$	$2,6 \pm 0,3^2$	0,30
АЧ/2 (Швейцария)	$4,2 \pm 0,2^1$	$3,4 \pm 0,6^1$	1,26
АЧ/3 (Италия)	$6,4 \pm 0,4^1$	$5,7 \pm 0,2^1$	1,57
ИГЧ/4 (Германия)	$2,0 \pm 0,3^1$	$2,3 \pm 0,6^1$	0,45
ИГЧ/5 (Италия) <sup>3</sup>	Менее $5^2$	Менее $5^2$	-
ИГЧ/6 (США)	$5,4 \pm 0,6^2$	$5,2 \pm 0,4^2$	0,28
ИГЧ/7 (Китай) <sup>4</sup>	Менее $10^2$	Менее $10^2$	-
ИГЧ/8 (Китай) <sup>4</sup>	Менее $10^2$	Менее $10^2$	-
Примечания. 1 - Содержание активатора прекалликреина изучено хромогенным кинетическим методом. 2 - Содержание активатора прекалликреина изучено хромогенным методом с оценкой 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 равно 2,776			

Проведенные исследования позволили разработать проект ОФС «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека» на метод контроля содержания АПК в ЛП из ПКЧ.

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Унифицирована методика определения АКА, по желатинсодержащему буферному раствору; компонента, приготовленного пула сыворотки крови не менее 10 морских свинок; объему реакционной смеси при титровании гемолизина, компонента и определении АКА в исследуемом образце иммуноглобулина; у использованию СО иммуноглобулина человека; формуле расчета для выражения АКА в процентах; и расчета АКА, выраженной в единицах компонента, связавшегося с 1 мг белка иммуноглобулина (СН50/мг белка).

2. Унифицированы методики определения содержания антиэритроцитарных антител по используемым реагентам эритроцитов и методике их подготовки, папаина, времени оценки результатов.

3. Унифицированы методики определения содержания АПК по реагенту прекалликреин, установлен критерий приемлемости его использования в методиках. Используемое соотношение реагентов в реакционной смеси, концентрация хромогенного субстрата и временные характеристики методик позволяют стандартизовать условия проведения реакции амидолитического расщепления хромогенного субстрата.

1. Разработаны проекты 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».

## **ГЛАВА 6 ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА**

### **6.1. Обоснование методологии валидации методик, основанных на иммунобиологических реакциях**

В соответствии с классификацией методик, предназначенных для контроля примесей, рассматриваемые нами методики являются испытаниями на предельное содержание, регламентирующими содержание примесей не выше установленного [9, 89]. В соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» для таких методик валидационные исследования ограничиваются определением специфичности, предела обнаружения и, при необходимости, правильности [8]. Для оценки специфичности в отношении определяемого вещества, необходимо экспериментальное подтверждение, что присутствие сопутствующих компонентов не влияет непредусмотренным образом на результат анализа. Допускается оценка специфичности валидируемой методики путем анализа модельных смесей известного состава, содержащих определяемое вещество. Однако отсутствие таких характеристик методик, как прецизионность и сходимостъ не позволяет гарантировать получение сопоставимых результатов в различных лабораториях, а качество препаратов, установленное на производстве, может не соответствовать установленным нормативным требованиям по предельному содержанию.

Для проведения валидационных исследований методик, основанных на полуколичественной оценке результатов, невозможно определить общепринятыми методами сходимостъ, прецизионность, диапазон определения и предел обнаружения. Определение прецизионности представляется собой механизм установления вариабельности результатов в зависимости от изменяющихся условий. Этими условиями могут быть:

оператор, время. Однако принципиальное значение в оценке пригодности методик контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ иммунобиологическими методами приобретает вариабельность свойств используемых биологических реагентов.

Для реагентов эритроцитов это могут быть: производитель, срок использования (после взятия), подготовка (процедура отмывания, обработки папаином и др.). Значительной вариабельностью свойств обладает реагент прекалликреин в зависимости от производителя, так как исходные характеристики этих реагентов различны, фармакопейные требования к нему отсутствуют.

Таким образом, методология валидации методик, основанных на иммунобиологических реакциях основывается на особенностях применения этих методик и зависит от спектра используемых реагентов. Кроме того, для проведения валидации необходимо использовать образцы, содержащие известное количество определяемого вещества. Наиболее приемлемыми для этой цели являются СО.

## **6.2. Разработка алгоритма и проведение валидации методик оценки содержания антиэритроцитарных антител в лекарственных препаратах из плазмы крови человека, основанных на реакциях прямой и непрямой гемагглютинации**

На примере методов определения содержания антиэритроцитарных антител нами был обоснован алгоритм разработки программы валидации методик НГА и ПГА. Предел обнаружения для этих методик зависит от кратности разведения испытуемого образца, так как они являются полуколичественными. Валидационные характеристики прецизионности не могут быть установлены общепринятыми методами (Рисунок 13).



Рисунок 13. Алгоритм валидации методик, основанных на методах гемагглютинации

Определение валидационных характеристик предполагает использование образцов с известным содержанием определяемого вещества. Рассматриваемые методики контроля качества ЛП по показателям специфической безопасности основаны на уникальных биологических эффектах, при этом альтернативные количественные методы оценки содержания примесей отсутствуют.

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 (таблица 23).

Таблица 23 – Валидационные характеристики разработанных методик оценки содержания антиэритроцитарных антител

Показатель качества	Наименование метода	Валидационные характеристики			
		Специфичность	Правильность	Прецизионность	Сходимость
Анти-А и анти-В ГА	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

Предложенный нами алгоритм позволил провести валидационные исследования разработанных методик оценки содержания антиэритроцитарных антител на основе методов НГА и ПГА. При условии соответствия методик установленным нами критериям при испытаниях ЛП ИГЧ вариабельность результатов не будет превышать один шаг разведения.

### **6.3. Разработка алгоритма и проведение валидации методики определения антикомплементарной активности иммуноглобулинов человека, основанной на реакции связывания комплемента**

Нами установлено, что алгоритм разработки программы валидации методик определения АКА должен учитывать перспективы применения биологических реагентов одного или нескольких производителей, срок использования в РСК эритроцитов (после взятия от животного). При этом алгоритм валидации должен включать следующие структурные элементы:

а) выявление факторов, влияющих на неопределенность, которые могут зависеть от:

1. источников получения крови бараньей, регламентированных сроков её использования;

2. вариабельности характеристик реагента компонента морских свинок, обусловленных источником его получения/изготовления;

3. квалификации исследователей;

б) использование в качестве испытуемых образцов положительного и отрицательного контролей СО иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность), которые позволяют охарактеризовать методику в различных диапазонах;

в) установление правильности и сходимости во временном интервале не более трех суток,

г) установление прецизионности с учетом факторов, влияющих на неопределенность.

Предел количественного определения, специфичность и линейность обусловлены методическими особенностями проведения РСК и не требуют подтверждения общепринятыми методами.

Валидационные исследования унифицированной нами методики проводили с учетом выполнения ее квалифицированными сотрудниками с использованием коммерческого реагента кровь баранья двух наименований различных серий в период с 7 по 21 сутки после изготовления [56, 60].

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 не превышает 14 % для обоих контролей, сходимость соответствует коэффициенту вариации 2 % и 4 % для положительного и отрицательного контролей соответственно.

Проведенные дальнейшие исследования внутрилабораторной прецизионности, позволили сделать вывод о том, что коэффициент вариации внутрилабораторной прецизионности (по фактору время) для отрицательного

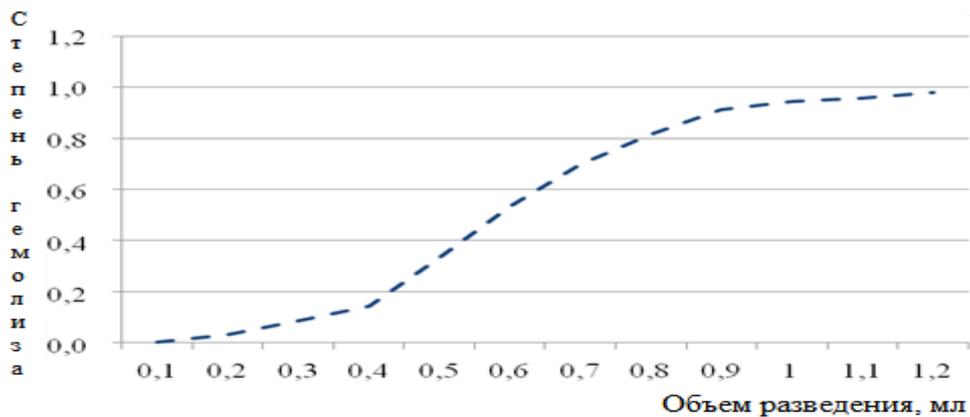
контроля СО иммуноглобулина человека BRP составил 11,97 % (оператор I) и 11,23 % (оператор II), для положительного контроля – 2,08 % (оператор I) и 3,59 % (оператор II). Аналогичным образом рассчитывали коэффициент вариации внутрилабораторной прецизионности (по фактору время и операторы), который составил 11,16 % для отрицательного контроля и 3,14 % для положительного контроля СО иммуноглобулина человека BRP. Анализ значений *F*- и *t*-критериев свидетельствует о статистической незначимости различий между средними значениями и стандартными отклонениями результатов измерений двух операторов с достоверностью 95 % [60].

При оценке правильности критерием приемлемости служили значения АКА отрицательного и положительного контролей СО иммуноглобулина человека BRP, соответствующие аттестованным: 10-40% для отрицательного контроля; 60-100 % для положительного контроля. Значения АКА СО иммуноглобулина человека BRP, полученные в настоящем исследовании, находились в аттестованных интервалах и составляли от 17,1 до 23,5 % (среднее значение составило 20,0 %) для отрицательного контроля и от 79,1 до 88,5 % (среднее значение составило 85,4 %) для положительного контроля. Таким образом, валидируемая методика характеризуется приемлемой правильностью.

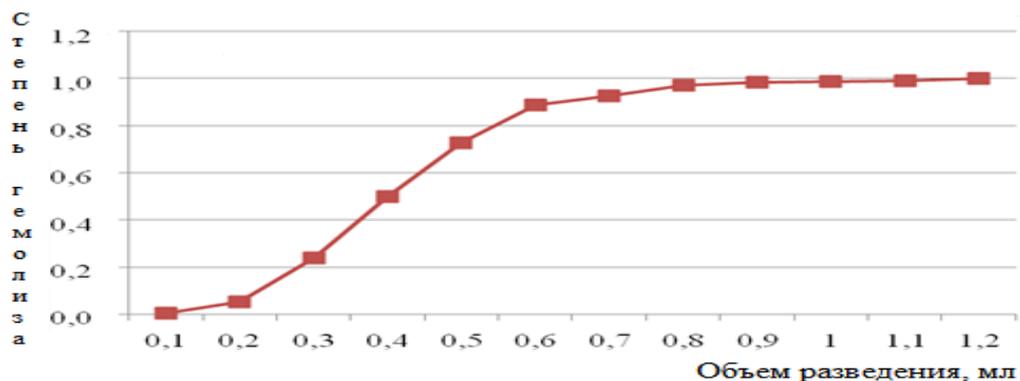
Коэффициент вариации повторяемости, характеризующий повторяемость результатов измерений АКА отрицательного и положительного контролей СО иммуноглобулина человека BRP получили для отрицательного контроля 1,07 %; для положительного контроля 0,18 %. Аналогичным образом провели статистическую обработку полученных результатов для аналитика II. Таким образом, валидационное исследование сходимости позволило сделать вывод о том, что для отрицательного контроля СО иммуноглобулина человека BRP коэффициент вариации составил 1,07 % и 1,03 % для аналитика I и II соответственно, для положительного контроля – 0,18 % и 0,31 % для аналитика I и II соответственно.

Так как единица гемолитической активности комплемента (1 СН50) определяется как количество комплемента, которое в определенных условиях опыта вызывает гемолиз 50 % оптимально сенсibilизированных эритроцитов, предел количественного определения равен 1 СН50/мл, что соответствует значению АКА равному 1 % или 0,02 СН50/мг иммуноглобулина.

Критерием приемлемости при оценке линейности является соответствие графика зависимости степени гемолиза от объема разведения комплемента, который при визуальном осмотре должен иметь линейный характер на участке от 0,15 до 0,85 степени гемолиза (Рисунок 14).



(А)



(Б)

Рисунок 14 – Графики зависимости степени гемолиза от объема разведения комплемента в (А) – отрицательном контроле, (Б) – положительном контроле

Таким образом, проведенные исследования подтвердили применимость обоснованного алгоритма для разработки программы валидации. Результаты

валидационных исследований показали пригодность унифицированной методики для определения АКА.

#### **6.4. Разработка алгоритма и проведение валидации методик определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека, основанных на реакции амидолитического расщепления хромогенного субстрата**

Нами установлено, что алгоритм разработки программы валидации методик определения содержания АПК должен учитывать перспективы применения биологических реагентов одного или нескольких производителей, а также группировочное наименование ЛП, для анализа которого методика используется. При этом алгоритм валидации должен включать следующие структурные элементы:

а) выявление факторов, влияющих на неопределенность, которые могут зависеть от:

1. вариабельности характеристик реагента ПК. При условии регламентированного применения аналогичных реагентов методика должна быть валидирована с использованием всех допустимых аналогов;

2. квалификации исследователей;

б) использование в качестве испытуемых образцов, полученных методом добавок расчетного количества АПК в раствор ИГЧ или АЧ в зависимости от назначения методики;

в) изучение валидационных характеристик в диапазоне допустимого количества содержания АПК, не превышающего 35 МЕ/мл, с использованием образцов, расчетное содержание АПК в которых соответствует диапазону калибровочной кривой.

г) установление прецизионности с учетом факторов, влияющих на неопределенность.

Валидационные характеристики разработанных нами методик определения АПК с использованием всех доступных реагентов ПК подтвердили их соответствие критериям приемлемости [41]. Линейность с коэффициентом корреляции, равным более 0,99 показана в диапазоне от 0 до 35 МЕ/мл (Рисунок 15, 16). Степень извлечения в диапазоне от 94,4 до 111,8 % при использовании методик с кинетическим измерением и по конечной точке подтверждает их правильность (таблица 24).

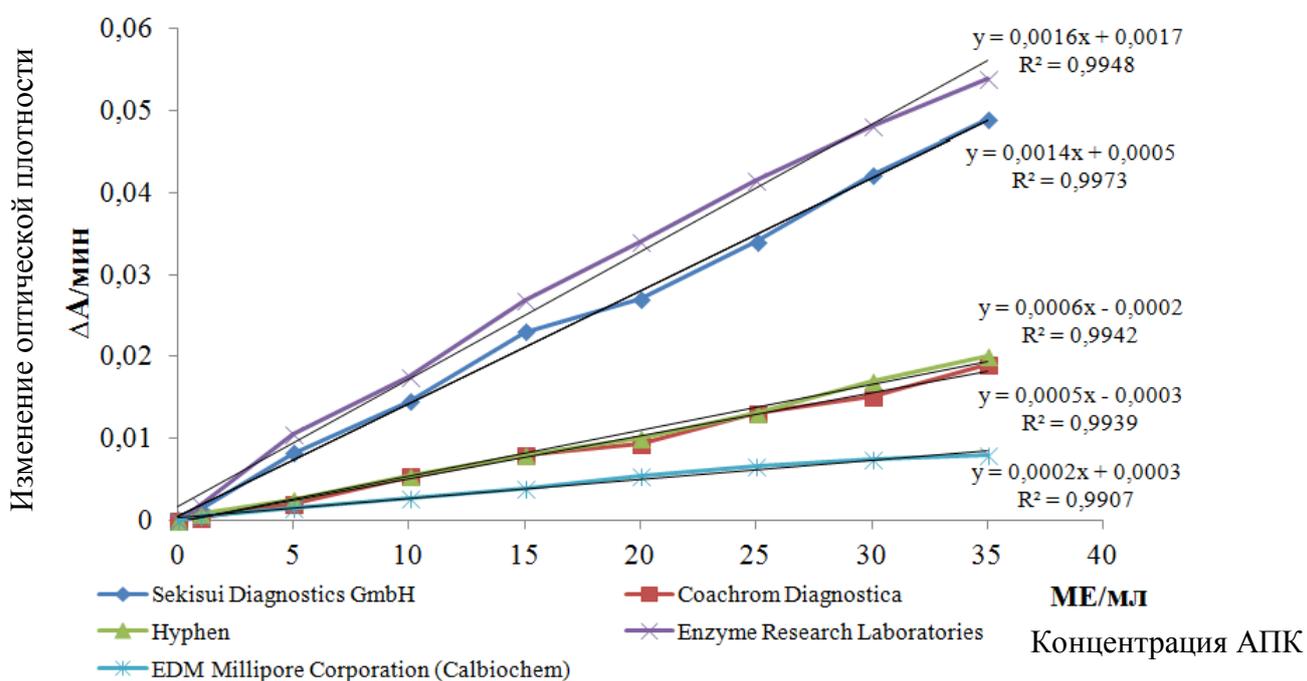


Рисунок 15. Зависимость изменения оптической плотности от концентрации активатора прекалликреина (кинетический тест)

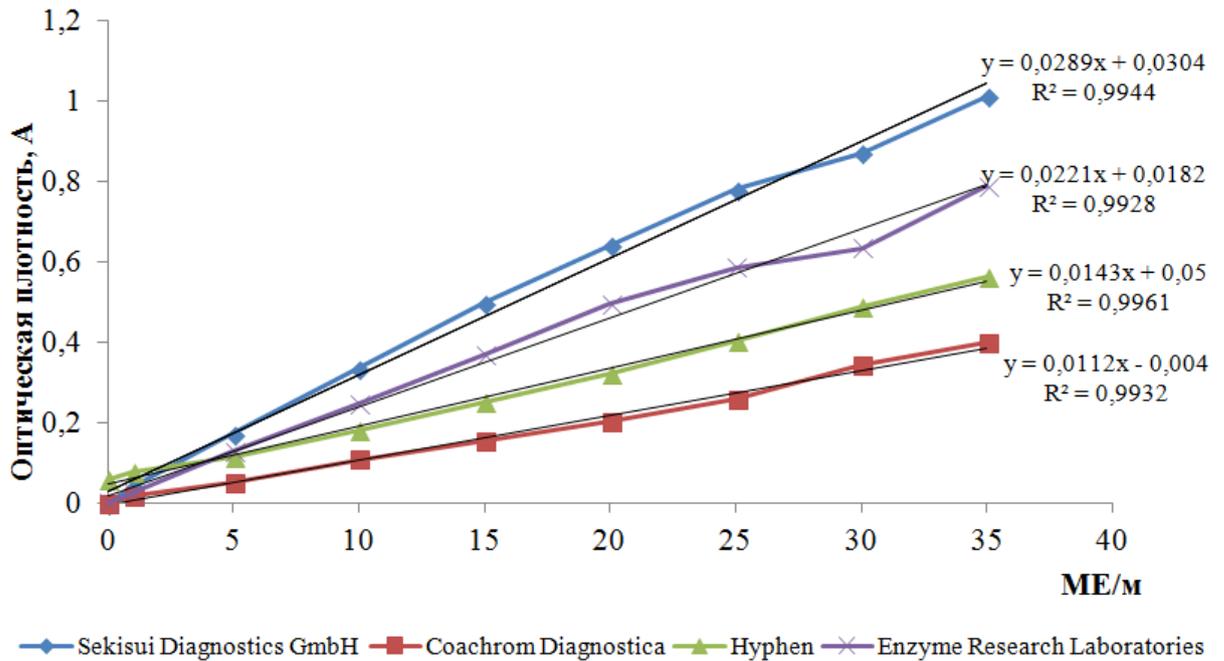


Рисунок 16. Зависимость изменения оптической плотности от концентрации активатора прекалликреина (тест по конечной точке)

Внутрилабораторная прецизионность по фактору реагента ПК составила для образцов альбумина человека с расчетным содержанием 10 МЕ/мл – 8,6 %, с расчетным содержанием 20 МЕ/мл – 5,6 %, с расчетным содержанием 30 МЕ/мл – 4,6 % (без учета содержания белка), для образцов иммуноглобулина человека с расчетным содержанием 10 МЕ/мл – 5,3 %, с расчетным содержанием 20 МЕ/мл – 2,6 %, с расчетным содержанием 30 МЕ/мл – 2,8 %, что соответствует критерию приемлемости для методик анализа биологических препаратов – не более 15 % [9]. Внутрилабораторная прецизионность для образцов (альбумина человека и иммуноглобулинов человека) с расчетным содержанием 1 МЕ/мл составила 13,7 %. При использовании реагента ПК одного производителя внутрилабораторная прецизионность не превышала 2 %, сходимость при этом соответствовала коэффициенту вариации, не превышающему 5 %. Оценка сходимости результатов определения оптической плотности/изменения оптической плотности в двух повторностях позволила установить её критерий приемлемости – 5 %

Таблица 24 - Результаты определения содержания активатора прекалликреина в образцах, полученных методом добавок

Наименование образца	Расчетное содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл	Фактическое содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл						$\bar{x} \pm S_x$	Коэффициент вариации, %
		Кинетический тест (n=7)			Тест по конечной точке (n=6)				
		$\bar{x} \pm S_x$	% выхода	Коэффициент вариации, %	$\bar{x} \pm S_x$	% выхода	Коэффициент вариации, %		
Альбумин человека 5 %	1	1,0±0,2	96,0	15,8	1,0±0,1	101,0	14,6	1,0±0,1	14,8
	10	10,8±0,9	107,8	8,4	10,6±0,8	106,0	7,6	10,7±0,8	7,7
	20	21,1±1,4	105,5	6,4	20,8±1,1	104,2	5,2	21,0±1,2	5,7
	30	29,3±1,3	97,7	4,6	30,5±1,5	101,5	4,9	29,8±1,5	4,9
Альбумин человека 10 %	1	1,0±0,1	96,3	14,3	0,9±0,1	94,4	11,1	1,0±0,1	12,4
	10	10,4±0,8	104,3	7,7	11,2±1,1	111,8	9,5	10,7±1,0	8,9
	20	19,5±1,0	97,3	5,0	21,3±1,0	106,3	4,5	20,3±1,3	6,5
	30	29,3±1,0	97,7	3,6	31,1±1,2	103,8	3,9	30,1±1,4	4,7
Альбумин человека 20 %	1	1,0±0,1	102,7	14,1	1,0±0,2	105,6	16,0	1,0±0,1	14,3
	10	10,7±0,8	106,9	7,6	9,6±0,7	96,2	7,6	10,2±0,9	9,0
	20	20,7±1,1	103,3	5,2	20,8±0,8	104,1	3,8	20,7±0,9	4,5
	30	29,6±1,7	98,7	5,8	30,3±0,6	101,1	2,1	29,9±1,4	4,6
Иммуноглобулин человека для внутривенного введения (разведение до 3 %)	1	1,0±0,1	96,4	14,9	1,0±0,1	99,0	13,9	1,0±0,1	13,7
	10	10,2±0,6	102,4	6,2	10,5±0,5	105,4	4,4	10,4±0,5	5,3
	20	20,6±0,6	103,0	2,9	20,8±0,5	104,2	2,4	20,7±0,5	2,6
	30	30,5±1,2	101,6	3,9	30,3±0,5	101,1	1,7	30,4±0,9	2,8

Примечание - n – количество исследований

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Обоснованная методология валидации методик оценки показателей специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ позволила разработать алгоритмы и провести в соответствии с ними валидационные исследования разработанных методик.

2. Проведенная валидация методик оценки содержания АПК, антиэритроцитарных антител, определения уровня АКА подтвердила их пригодности для контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ, что позволило разработать и внедрить ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения» [78]; ОФС 1.8.2.0005.15 «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека» [76], ОФС.1.8.2.0004.15 «Испытание на анти-Д антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека» [28], ОФС.1.8.2.0013.18 «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека» [81].

## **ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ПО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ**

В соответствии с разработанной нами методологией стандартизации ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности одним из её структурных элементов является контроль качества унифицированными методиками с подтвержденной воспроизводимостью результатов испытаний, а также использованием стандартных образцов, позволяющих исключить влияние вариабельности свойств реагентов на результаты испытаний. Методы контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности основаны на иммунобиологических реакциях с использованием реагентов биологического происхождения, стандартность свойств которых по всем параметрам обеспечить в настоящее время невозможно. Валидационные исследования разработанных методик, представленные в главе 6, свидетельствует о вкладе в неопределенность результатов испытаний таких реагентов, как эритроциты человека и папаин (реакции ГА), эритроциты барана и комплемент морских свинок (РСК), ПК (реакции амидолитического расщепления). Для установления приемлемости результатов испытаний целесообразно использование СО. Критерием в таком случае может быть соответствие полученных значений характеристик СО аттестованным значениям [10, 11, 16 - 18]. В тоже время, СО образцы могут быть и носителем единицы измерения. Такими СО являются СО содержания АПК, т.к. определение содержания АПК в ЛП ИГЧ и АЧ осуществляется относительно СО, калиброванного в МЕ. СО содержания анти-D антител и СО лимита содержания анти-A и анти-B гемагглютининов также являются носителем единицы измерения, но не используются для построения калибровочного графика [44, 52]. Методология применения международных СО для контроля качества биологических ЛП предусматривает их

использование только для аттестации национальных/фармакопейных СО, а не для рутинных испытаний [258].

Таким образом, методологические подходы к стандартизации ЛП ИГЧ и АЧ по специфической безопасности можно разделить на три группы, направленные на: стандартизацию методик, разработку доступных национальных СО, носителей единицы нормируемой величины, и обоснование системы и критериев оценки воспроизводимости результатов. Учитывая перспективы применения указанных СО в одной (фармацевтической) отрасли, целесообразна разработка отраслевых СО.

## **7.1. Разработка стандартных образцов для контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по показателям специфической безопасности.**

### **7.1.1. Разработка стандартного образца «Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)»**

#### **7.1.1.1. Обоснование состава, свойств и критериев выбора кандидатов в стандартный образец для определения уровня антикомплементарной активности иммуноглобулинов человека**

При разработке СО Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность) использовали принцип максимального приближения к содержанию в его составе примесей, характеризующих уровень АКА ЛП ИГЧ [44, 64]. Известно, что молекулы иммуноглобулина приобретают способность спонтанно активировать систему комплемента вследствие агрегации в процессе фракционирования ПКЧ и хранения препарата. Аналогичные изменения строения и межмолекулярных взаимодействий иммуноглобулинов класса G могут быть обусловлены нагреванием, обработкой органическими растворителями и химическими реагентами.

В целях разработки СО для определения АКА проводились исследования по нескольким направлениям. Первоначально была проведена оценка возможности использования препаратов ИГЧ отечественного производства в качестве СО. При этом отрицательный и положительный контроли формировались путем изменения исходного количества иммуноглобулина (0,2 мл для отрицательного контроля и 0,6 мл для положительного контроля) аналогично СО иммуноглобулина человека ВРР. Были изучены по три серии различных лекарственных форм ИГЧ отечественного производства. Результаты исследований свидетельствуют о возможности использования изученных ЛП ИГЧ в качестве отрицательного контроля и их непригодность в качестве положительного контроля СО для определения АКА (минимальная степень гемолиза превышала 50%) [63].

Для получения положительного контроля применили метод нагрева на водяной бане при температуре  $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Более целесообразно с точки зрения использования в качестве кандидата в СО рассматривать раствор ИГЧ, расфасованный в ампулы небольшого объема. Дальнейшие исследования были направлены на установление оптимальных условий термической обработки готовых ЛП ИГЧ для внутримышечного введения (Рисунок 17).

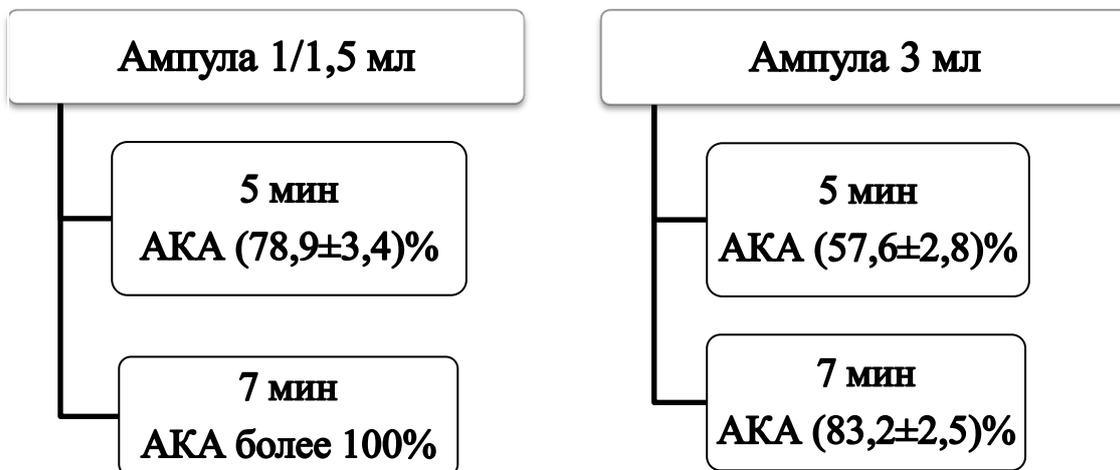


Рисунок 17 – Выбор оптимальных условий термической обработки препаратов иммуноглобулина в различной фасовке

Термическая обработка изученных серий препаратов иммуноглобулинов человека для внутримышечного введения позволяет изменять значения АКА до диапазона, превышающего 50%, т.е. удовлетворяющих требованиям, предъявляемым к положительному контролю СО иммуноглобулина человека. Оптимальная продолжительность термической обработки установлена для ампул по 3 мл – 7 минут; для ампул по 1/1,5 мл – 5 минут. Следует отметить, что при внесении в технологию производства ЛП ИГЧ для внутримышечного введения этапа вирусной инаktivации при кислотном значении рН, была установлена оптимальная продолжительность инкубирования кандидата в положительный контроль (фасовка по 1,5 мл) в течение 7 мин, которая позволила получать значения АКА  $76,9 \pm 1,5$  %.

Нами установлена возможность применения для получения положительного контроля ЛП ИГЧ различных группировочных названий (таблица 25), однако учитывая более высокую себестоимость специфических иммуноглобулиновых препаратов их применение для разработки СО не оправдано.

Таким образом, предложенная нами методология разработки СО иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность) позволила обосновать:

- комплектность СО (набор, включающий положительный и отрицательные контроли, готовые к применению в методике определения АКА без дополнительной пробоподготовки);
- 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  $(56 \pm 1)$  °С в течение времени, необходимого для достижения уровня АКА более 50 %).

Таблица 25 – Антикомплементарная активность препаратов иммуноглобулинов человека, подвергшихся термической обработке

Наименование препарата	Значения АКА без прогрева, % ( $\bar{x} \pm S_x$ )	Значения АКА после прогрева, % ( $\bar{x} \pm S_x$ )
Иммуноглобулин человека противостафилококковый	43,2±1,4	84,9±1,5
Иммуноглобулин человека противостолбнячный	40,5±1,1	86,1±0,4
Иммуноглобулин человека против гепатита В	35,2±3,3	88,8±0,3
Иммуноглобулин человека противоаллергический	33,4±1,5	73,3±0,9
Иммуноглобулин против клещевого энцефалита	41,0±1,5	89,3±0,5
Иммуноглобулин человека нормальный	32,6±2,5	75,7±1,2

Результаты исследований позволили получить патент на изобретение «Способ получения положительного контроля стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека и стандартный образец иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека: RU 2577703» (Приложение А) [84].

#### **7.1.1.2. Разработка программы аттестации стандартного образца для определения уровня антикомплементарной активности иммуноглобулинов человека**

Программа аттестации серии СО Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность) предусматривала получение результатов в условиях промежуточной прецизионности в одной лаборатории двумя исследователям в течение 14 дней при одновременном использовании СО

Иммуноглобулина человека ВРР актуальной серии с целью подтверждения приемлемости результатов испытаний. Каждый оператор использовал по 3 набора при каждой постановке и определял АКА в соответствии с ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения».

Испытания проводили оба исследователя в 1 (первый), 3 (третий), 8 (восьмой), 9 (девятый) и 14 (четырнадцатый) дни после вскрытия ампул (три набора) с одной серией реагента кровь баранья консервированная для РСК (ЗАО «ЭКОлаб») 14-, 16-, 15- и 20-дневного срока. Аналогичным образом проводили испытания оба исследователя с другими тремя наборами с другой серией реагента кровь баранья (ЗАО «ЭКОлаб»).

Установление дополнительной характеристики «Белок» проводили по результатам, полученным в одной лаборатории одним исследователем с использованием ОСО содержания белка в иммуноглобулине (ОСО 42-28-430) в течение 14 дней по методике [79].

Для расчета аттестованных значений по содержанию белка проводили оценку статистической значимости различий полученных результатов для положительного и отрицательного контролей в 1 и 14 дни после вскрытия с использованием t-критерия Стьюдента.

Для расчета аттестованных значений по антикомплементарной активности проводили оценку статистической значимости различий полученных результатов для положительного и отрицательного контролей в 1, 3, 8, 9 и 14 дни после вскрытия, а также результатов, полученных с использованием двух серий реагента кровь баранья консервированная для РСК (ЗАО «ЭКОлаб») с использованием t-критерия Стьюдента.

При условии отсутствия статистически значимых различий полученные результаты объединяли для положительного контроля и для отрицательного контроля, вычисляли среднее арифметическое значение ( $\bar{x}$ ), стандартное отклонение ( $S_x$ ) по формулам (1, 2):

Аттестованную характеристику по антикомплементарной активности представляли в виде  $\bar{x} \pm 2S_x$  (%) для положительного и отрицательного контролей.

**7.1.1.3. Получение, аттестация и изучение стабильности  
стандартного образца «Иммуноглобулина человека  
(антикомплементарная активность)»**

СО иммуноглобулина человека для определения АКА представляет собой комплект, состоящий из ампулы отрицательного контроля и ампулы положительного контроля. В качестве кандидата в СО нами были использованы коммерческие серии препарата «Иммуноглобулин человека нормальный», раствор для внутримышечного введения ампулы по 1,5 мл производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России.

Получение СО включает этапы: 1) оценка уровня АКА коммерческого препарата ИГЧ без каких-либо физических воздействий с целью установления возможности его использования в качестве отрицательного контроля (при условии соответствия уровня АКА от 10 до 45 %.), 2) приготовление растворов ИГЧ с установленной АКА для положительного контроля - путем прогревания раствора коммерческого ЛП ИГЧ при температуре  $56 \pm 1$  °С до достижения уровня АКА 60–90%. Было изготовлено и аттестовано 4 серии ОСО 42-28-430 «Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)» (таблицы 26 – 29).

Таблица 26 - Результаты аттестации ОСО Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность) (серия 1)

О п е р а т о р	День проведения исследования / номер образца		Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека BRP, процент		Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека, процент				
			Отрицательный контроль	Положительный контроль	Отрицательный контроль		Положительный контроль		
					X	$(\bar{x} \pm S_x)$	X	$(\bar{x} \pm S_x)$	
1	1	1	33,7	90,6	43,0	41,5±1,8	78,9	78,2±2,3	
		2			41,8		76,5		
	3	1	35,1	87,6	42,6		78,8		
		2			39,6		78,9		
	8	1	13,5	79,4	44,3		78,3		
		2			37,0		85,3		
		3			41,0		77,7		
	9	3	30,5	89,0	42,3		79,0		
	14	3	32,6	89,4	43,4		81,2		
	2	1	1	22,3	86,8		41,7		76,5
			2				41,2		78,0
		3	1	23,6	91,9		41,6		76,5
2			44,2			74,9			
8		1	25,8	81,9	38,5	78,4			
		2			42,5	79,8			
		3			41,6	75,4			
9		3	32,0	88,4	42,4	77,5			
14		3	31,5	89,5	41,6	75,9			

Таблица 27- Результаты аттестации ОСО Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность) (серия 2)

Оператор	День проведения исследования	Антикомплементарная активность стандартного образца иммуноглобулина человека BRP, процент		Номер образца	Антикомплементарная активность аттестуемого стандартного образца, процент			
		Отрицательный контроль	Положительный контроль		Отрицательный контроль		Положительный контроль	
					X	$(\bar{x} \pm S_x)$	X	$(\bar{x} \pm S_x)$
1	1	15,7	64,9	1	40,6	40,5±3,6	81,0	76,6±3,1
	2	25,5	73,4	2	45,4		81,7	
	3	19,8	69,8	4	41,1		86,2	
				5	39,8		80,4	
	8	29,6	89,9	6	47,1		76,9	
				7	46,9		78,3	
	9	24,3	89,6	8	44,2		74,3	
				9	41,9		74,8	
				10	38,4		75,6	
	14	21,4	85,5	14	39,4		75,7	
				15	41,2		74,3	
				16	34,4		77,5	
				17	32,5		76,1	
	2	1	20,3	65,5	1		36,9	
2		18,1	67,4	2	40,8	77,2		
				3	43,6	73,7		
3		17,4	65,2	4	35,6	77,2		
				5	37,0	73,7		
8		27,3	88,7	8	43,6	74,3		
				9	46,1	76,4		
				10	40,1	78,8		
9		24,2	86,6	11	39,2	74,1		
				12	40,9	71,3		
				13	40,9	72,7		
14		18,3	87,2	14	38,3	74,9		
				15	40,5	74,6		
	16			39,5	78,0			
	17			37,4	79,0			

Таблица 28- Результаты аттестации ОСО Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность) (серия 3)

День проведения испытаний /оператор	Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека ВРР, процент		Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека (серия 3), процент			
	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Отрицательный контроль		Положительный контроль	
			X	( $\bar{x} \pm S_x$ )	X	( $\bar{x} \pm S_x$ )
1/1	15,1	86,3	29,5	38,7±4,5	70,4	69,9±4,8
			29,2		65,6	
			33,6		66,8	
			38,3		70,3	
3/1	13,0	88,3	29,2		67,0	
			33,1		67,1	
			39,2		68,9	
			36,6		70,4	
14/1	23,9	80,6	41,0		79,9	
			42,0		73,1	
			39,3		66,1	
			38,3		64,5	
			45,1		73,5	
			42,0		77,0	
1/2	23,4	76,6	40,5		79,8	
			44,0		69,9	
			36,4	68,1		
			37,1	65,3		
			38,7	71,2		
			39,2	78,7		
3/2	15,8	77,3	41,4	70,5		
			35,6	64,2		
			36,7	65,4		
			40,7	72,5		
			41,8	74,5		
14/2	22,8	80,6	44,8	71,3		
			40,7	60,0		
			40,0	65,1		
			43,4	70,5		
			45,8	68,2		

Таблица 29 - Результаты определения антикомплементарной активности и содержания белка в СО иммуноглобулина человека (серия 4)-

Оператор	День проведения испытаний	Номер образца,	Антикомплементарная активность, процент					
			СО иммуноглобулина человека BRP		СО иммуноглобулина человека (серия 4)			
			Отрицательный контроль	Положительный контроль	Отрицательный контроль		Положительный контроль	
					X	( $\bar{x} \pm S_x$ )	X	( $\bar{x} \pm S_x$ )
1	1	1			30,7	27,7 ± 6,2	79,3	77,6 ± 3,5
		2	12,2	75,2	28,0		76,8	
		3			24,5		76,5	
2	1	1			20,6	28,2 ± 13,2	70,2	70,8 ± 6,6
		2	16,0	80,2	31,1		67,8	
		3			32,9		74,3	
1	3	1			21,5	21,8 ± 3,0	70,3	69,7 ± 3,5
		2	12,2	75,2	20,4		71,1	
		3			23,4		67,7	
2	3	1			30,0	29,0 ± 1,8	70,7	70,8 ± 0,9
		2	29,0	74,3	29,0		71,4	
		3			28,2		70,5	
1	8	1			34,1	34,8 ± 2,8	76,7	77,1 ± 0,75
		2	21,1	79,9	33,8		77,4	
		3			36,4		77,3	
2	8	1			25,3	24,8 ± 3,3	68,7	68,9 ± 2,4
		2	26,3	73,6	23,0		67,8	
		3			26,2		70,2	
1	9	1			40,9	38,7 ± 3,7	78,8	77,8 ± 2,2
		2	18,6	83,7	38,0		76,6	
		3			37,4		78,1	
2	9	1			39,0	36,6 ± 5,1	73,0	72,1 ± 1,9
		2	20,2	75,4	37,0		71,1	
		3			33,9		72,3	
1	14	1			37,5	36,1 ± 3,0	73,6	72,6 ± 1,9
		2	21,7	76,0	36,4		72,6	
		3			34,5		71,7	
2	14	1			24,7	24,9 ± 2,6	66,8	68,0 ± 5,1
		2	24,0	82,4	26,4		66,3	
		3			23,8		71,0	

Для оценки результатов определения антикомплементарной активности в образцах СО, полученных двумя операторами использовали t-критерий Стьюдента. Так, при аттестации серии 4 было установлено отсутствие значимых различий: t-критерий Стьюдента при сравнении средних величин

для положительного контроля составил 1,15 при табличном 2,048; для отрицательного – 0,36 (число степеней свободы равно 28), что позволило объединить полученные результаты и аттестованную характеристику установить на основании среднего значения. Для подтверждения стабильности свойств СО проводили оценку АКА в образцах на разные сроки вскрытия экземпляров. Так для серии 4 была установлена стабильность АКА в образцах в течение 14 суток после вскрытия ампулы (таблица 30).

Таблица 30 - Результаты определения антикомплементарной активности в различные дни с различным сроком службы экземпляров СО

Оператор	Номер образца	Временной интервал после вскрытия (сутки)	Антикомплементарная активность, процент							
			СО иммуноглобулина человека (серия 4)							
			Отрицательный контроль				Положительный контроль			
			X	$\bar{x}$	S <sub>x</sub>	Коэффициент вариации	X	$\bar{x}$	S <sub>x</sub>	Коэффициент вариации
1	1	Первые	30,7	27,7	3,1	11,2	79,7	77,6	1,7	2,3
	2		28,0				76,8			
	3		24,5				76,5			
2	1		20,6	28,2	6,6	23,5	70,2	70,7	3,3	4,6
	2		31,1				67,8			
	3		32,9				74,3			
1	1	Третьи	21,5	21,8	1,5	6,9	70,3	69,7	1,8	2,5
	2		20,4				71,1			
	3		23,4				67,7			
2	1		30,0	29,0	0,9	3,1	70,7	70,8	0,5	0,7
	2		29,0				71,4			
	3		28,2				70,5			
1	1	Восьмые	34,1	34,7	1,4	4,09	76,7	77,1	0,4	0,5
	2		33,8				77,4			
	3		36,4				77,3			
2	1		25,3	24,8	1,6	6,6	68,7	68,9	1,2	1,7
	2		23,0				67,8			
	3		26,2				70,2			
1	1	Девятые	40,9	38,7	1,9	4,8	78,8	77,8	1,1	1,4
	2		38,0				76,6			
	3		37,4				78,1			
2	1		39,0	36,6	2,6	7,01	73,0	72,1	0,9	1,3
	2		37,0				71,1			
	3		33,9				72,3			
1	1	Четырнадцатые	37,5	36,1	1,5	4,2	73,6	72,6	0,9	1,3
	2		36,4				72,6			
	3		34,5				71,7			
2	1		24,7	24,9	1,3	5,3	66,8	68,0	2,6	3,8
	2		26,4				66,3			
	3		23,8				71,0			

Оценка результатов определения антикомплементарной активности в образцах ОСО на 1 и 14 сутки после вскрытия двумя операторами позволила сделать вывод об отсутствии значимых различий: t-критерий Стьюдента при сравнении средних величин для положительного контроля составил 0,29 при табличном 2,228, для отрицательного – 0,33 (число степеней свободы равно 10).

Так как в методике определения АКА в соответствии с [78] предусмотрена возможность использования различных реагентов крови бараньей, для аттестации ОСО Иммуноглобулина человека серии 4 применили два реагента с различным сроком хранения после получения (таблица 31).

Оценка результатов определения антикомплементарной активности в образцах ОСО с использованием различных серий реагента крови позволила сделать вывод об отсутствии значимых различий: t-критерий Стьюдента при сравнении средних величин для положительного контроля составил 0,1 при табличном 2,048; для отрицательного – 0,81 (число степеней свободы равно 28); с использованием крови одной серии на 14 и 21 сутки жизни - также отсутствуют различия: t-критерий Стьюдента при сравнении средних величин для положительного контроля составил 0,07 при табличном 2,228; для отрицательного – 0,09 (число степеней свободы равно 10).

Изучение стабильности разработанного СО невозможно методом ускоренного старения при повышенных температурах, поэтому его стабильность СО определяли методом естественного старения при температуре  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Полученные результаты позволили установить срок годности СО, составивший 24 месяца.

Для подтверждения стабильности и обоснования возможности продления срока годности ОСО (серия 2) проводили исследования по подтверждению значений АКА аттестованным значениям по истечении 1 года использования (таблица 32) [46].

Таблица 31 - Результаты определения антикомплементарной активности с использованием различных серий реагента кровь баранья консервированная для РСК (ЗАО «ЭКОлаб»)

День проведения испытаний	Оператор	Образец	Серия реагента кровь баранья консерви- рованная	Антикомплементарная активность, процент							
				СО иммуноглобулина человека (серия 4)							
				Отрицательный контроль				Положительный контроль			
				X	$\bar{x}$	S <sub>x</sub>	Коэффициент вариации	X	$\bar{x}$	S <sub>x</sub>	Коэффициент вариации
1	1	1	40/19	30,7	27,7	3,1	11,2	79,7	77,6	1,7	2,3
		2		28,0				76,8			
		3		24,5				76,5			
	2	1	40/19	20,6	28,2	6,6	23,5	70,2	70,7	3,2	4,6
		2		31,1				67,8			
		3		32,9				74,3			
2	1	1	40/19	21,5	21,7	1,5	6,9	70,3	69,7	1,8	2,5
		2		20,4				71,1			
		3		23,4				67,7			
	2	1	40/19	30,0	29	0,9	3,1	70,7	70,8	0,5	0,66
		2		29,0				71,4			
		3		28,2				70,5			
7	1	1	41/19	25,3	34,7	1,4	4	68,7	77,1	0,4	0,5
		2		23,0				67,8			
		3		26,2				70,2			
	2	1	41/19	34,1	24,8	1,6	6,6	76,7	68,9	1,2	1,7
		2		33,8				77,4			
		3		36,4				77,3			
8	1	1	41/19	40,9	39	1,9	4,8	78,8	77,8	1,1	1,4
		2		38,0				76,6			
		3		37,4				78,1			
	2	1	41/19	39,0	36,6	2,5	7,0	73,0	72,1	0,9	1,3
		2		37,0				71,1			
		3		33,9				72,3			
14	1	1	41/19	37,5	36,1	1,5	4,2	73,6	72,6	0,9	1,3
		2		36,4				72,6			
		3		34,5				71,7			
	2	1	41/19	24,7	24,9	1,3	5,3	66,8	68	2,6	3,8
		2		26,4				66,3			
		3		23,8				71,0			

Таблица 32 – Результаты определения АКА и белка в ОСО Иммуноглобулина человека (серия 2) при продлении срока годности

Номер образца	Антикомплементарная активность СО иммуноглобулина человека, процент				Содержание белка, мг/мл		
	Отрицательный контроль		Положительный контроль		Отрицательный контроль	Положительный контроль	Аттестованное значение
	X	Аттестованное значение	X	Аттестованное значение			
1	37,0	29,7 -47,7	78,9	60,3-79,5	95,4	96,5	95,1 – 101,7
	34,9		78,8				
	45,4		72,5				
	34,5		76,5				
	31,0		73,8				
	38,6		69,8				
2	35,0		74,4		96,5	96,0	
	37,7		78,9				
	38,4		65,1				
	29,7		72,4				
	31,1		74,9				
	29,7		66,6				
3	46,9		77,7		95,8	97,9	
	38,2		70,9				
	47,3		68,5				
	39,0		70,0				
	32,3		68,5				
	36,9		66,9				

Результаты аттестации серий ОСО 42-28-430 представлены в таблице 33.

Таблица 33 - Антикомплементарная активность и содержание белка в компонентах ОСО 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 всех серий составила не более 10 %, что свидетельствует о высокой стабильности аттестованных характеристик [55]. На серии СО была разработана нормативно-техническая документация, включающая паспорт (Приложение Б), инструкцию по применению, макеты первичной и вторичной упаковок.

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

#### **7.1.2.1. Обоснование состава и свойств стандартного образца для определения содержания гемагглютининов**

Для стандартизации методов определения содержания ГА могут быть использованы положительный и отрицательный СО. При этом отрицательный СО не должен содержать специфичных групповых антител к антигенам эритроцитов человека А и В (анти-А и анти-В ГА). Его применение позволит гарантировать исключение результатов, полученных при неспецифической реакции агглютинации и являющихся ложноположительными [43, 53].

Положительный СО должен содержать анти-А и анти-В ГА, специфичные к антигенам эритроцитов человека А и В в титре, приближенном к наиболее часто встречающемуся в ЛП ИГЧ, но не превышающему предельно допустимое содержание. В тоже время, необходимо наличие стандартного образца, который будет иметь точно установленное содержание ГА, которое является предельно допустимым. Наиболее значимыми в отношении осложнений инфузионной терапии ЛП ИГЧ являются антиэритроцитарные антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса G. Для их оценки используют методы ПГА и НГА. Поэтому, СО должен содержать IgG, специфичные к групповым антигенам эритроцитов А и В, выявляемые обоими методами [43].

Использование стратегии разработки фармакопейного и международного СО неприменима, так как мышинные моноклональные антитела к групповым антигенам эритроцитов А и В, входящие в их состав, не могут быть выявлены в реакции НГА [239]. Поэтому, в настоящих исследованиях для разработки СО были использованы растворы ИГЧ, изготовленные из плазмы крови доноров соответствующей группы и резус-принадлежности [44]. В зависимости от исходного содержания ГА в плазме, использовали различную степень концентрирования раствора ИГ с учетом содержания белка 50 мг/мл.

#### **7.1.2.2. Разработка критериев выбора кандидатов в компоненты стандартного образца для определения содержания гемагглютининов**

На первом этапе исследований была получена экспериментальная серия ОСО 42–28–431–2014 «СО иммуноглобулина человека содержания анти-А и анти-В антител», представляющая собой раствор иммуноглобулина человека с содержанием анти-А ГА в титре 1:512 – 1:256; анти-В ГА – в титре 1:256. 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). Были изучены серии полуфабриката иммуноглобулина человека с заданным содержанием анти-А и анти-В ГА (таблица 34).

Кандидаты в СО на предприятии-изготовителе были подвергнуты технологической обработке с целью корректировки содержания белка до 52 мг/мл и предоставлены для изготовления ОСО.

Содержание анти-А гемагглютининов в кандидате в СО с повышенным содержанием гемагглютининов по результатам 6 измерений ( $n=6$ ) составило 1:64 с диапазоном значения 1:64 – 1:128 при доверительной вероятности 0,95; анти-В гемагглютининов – 1:32 с диапазоном значения 1:32 – 1:32 при доверительной вероятности 0,95. Содержание анти-А и анти-В гемагглютининов в кандидате в отрицательный компонент СО составило менее 1:2. Серии подготовлены для проведения аттестации и исследований стабильности.

Таблица 34 –Характеристики серий полуфабриката иммуноглобулина человека, предназначенных для разработки компонентов «Набора для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов»

Наименование характеристики	Значение для серии полуфабриката с содержанием анти-А и анти-В гемагглютининов	
	повышенным	менее 1:2
Групповая принадлежность доноров плазмы	I	IV
Объем загрузки, л	200	68
Количество индивидуальных донаций (гемокон) в загрузке, шт	816	282
Объем полученного полуфабриката, л	13,1	3,7
рН полуфабриката	6,7	6,8
Содержание белка в полуфабрикате, мг/мл	67	62
Содержание анти-А гемагглютининов	1:512	Менее 1:2
Содержание анти-В гемагглютининов	1:254	Менее 1:2

Экспериментальные исследования позволили выявить, что серию с содержанием анти-А и анти-В гемагглютининов 1:64 получить сложно, так как содержание анти-В гемагглютининов в крови доноров ниже, чем анти-А гемагглютининов. Поэтому, разработку компонента лимит содержания анти-А и анти-В гемагглютининов проводили из двух составляющих:

1) «лимита содержания анти-А гемагглютининов» с содержанием анти-А гемагглютининов 1:64 (при условии любого содержания анти-В гемагглютининов) и

2) «лимита содержания анти-В гемагглютининов» с содержанием анти-В гемагглютининов 1:64 (при условии любого содержания анти-А гемагглютининов).

Таким образом, проведенные исследования позволили обосновать состав СО «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов»:

- «положительный компонент стандартного образца» с содержанием анти-А и анти-В гемагглютининов в титре 1:32 – 1:128,

- «отрицательный компонент стандартного образца» с содержанием анти-А и анти-В гемагглютининов в титре менее 1:2,

- «лимит содержания анти-А и анти-В гемагглютининов», состоящий из «лимита содержания анти-А гемагглютининов» с содержанием анти-А гемагглютининов 1:64 (при условии любого содержания анти-В гемагглютининов) и «лимита содержания анти-В гемагглютининов» с содержанием анти-В гемагглютининов 1:64 (при условии любого содержания анти-А гемагглютининов).

### **7.1.2.3. Разработка программы и методик аттестации стандартного образца для определения содержания гемагглютининов**

Установление значений аттестуемых характеристик ОСО по содержанию гемагглютининов необходимо проводить по результатам, полученным в одной лаборатории в условиях промежуточной прецизионности с привлечением двух исследователей с использованием методик испытаний в соответствии с ОФС.1.8.2.0005.15 Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека [76] и проекта ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека».

Испытания методом прямой гемагглютинации осуществляли с использованием стандартных образцов Европейской Фармакопеи (положительный стандартный образец иммуноглобулина (метод определения анти-А и анти-В антител) BRP (кат. № Y0001688), отрицательный стандартный образец иммуноглобулина (метод определения анти-А и анти-В антител) BRP (кат. № Y0001689), стандартный образец иммуноглобулина лимит содержания анти-А и анти-В антител, BRP (кат. № Y0001153)). Определение содержания белка проводили с использованием ОСО 42-28-340 (ОСО содержания белка в иммуноглобулине) по методике [79].

Для проведения испытаний с целью продления срока годности использовали шесть наборов ОСО 42-28-439. Испытания проводили в течение 14 дней для подтверждения стабильности свойств ОСО после вскрытия. Трехкратно проводили определение аттестуемых характеристик в 3 наборах:

- 1 определение - два исследователя с использованием одних и тех же наборов, вскрытых непосредственно перед проведением испытаний;
- 2 определение (7 сутки после вскрытия) - два исследователя с использованием тех же наборов, вскрытых в первый день, укупоренных PARAFILM® и хранившихся при температуре  $(5\pm 3)$  °С в течение 7 дней;
- 3 определение (14 сутки после вскрытия) - два исследователя с использованием тех же наборов, вскрытых в первый день, укупоренных PARAFILM® и хранившихся при температуре  $(5\pm 3)$  °С в течение 14 дней.

Содержание анти-А и анти-В антител определяли «на плоскости» и с использованием гелевой технологии в реакции непрямой гемагглютинации, а также в реакции прямой гемагглютинации «на плоскости». Содержание гемагглютининов выражали разведением образца, в котором определяется агглютинация тестовых эритроцитов любой степени интенсивности.

Для установления содержания белка получали результаты в одной лаборатории одним исследователем с использованием ОСО содержания белка в иммуноглобулине (ОСО 42-28-340). Для проведения испытаний использовали 3 набора кандидата в ОСО 42-28-439. Получали результаты для каждого компонента из каждого набора в первый день после вскрытия ампул.

#### **7.1.2.4. Получение, аттестация и изучение стабильности стандартного образца «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов»**

В дальнейших исследованиях был получен СО 42-28-439 «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, которые 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.

Компоненты с содержанием ГА представляют собой растворы ИГЧ, изготовленные из плазмы крови доноров I(0) группы и различаются титром от 1:16 до 1:32 (для положительных компонентов) и 1:64 для компонентов с лимитом содержания соответствующих ГА. Отрицательный компонент – раствор ИГЧ, изготовленный из плазмы крови доноров IV (AB) группы.

Стратегия разработки СО для определения содержания ГА на основе растворов ИГЧ, содержащих примеси ГА, которые и обуславливают возникновение НР иммуноглобулинотерапии, дала возможность использовать для его аттестации оба метода, регламентированные для контроля качества препаратов: ПГА и НГА. Это позволяет не только стандартизовать методы, но и проводить сравнительную оценку различных ЛП ИГЧ по содержанию примесей ГА (таблица 35).

Дополнительно каждый компонент был охарактеризован по содержанию белка.

Таблица 35 – 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, $\bar{x} \pm S_x$
	анти-А		анти-В		
	НГА	ПГА	НГА	ПГА	
Положительный А	1:32	1:16/ 1:16 – 1:32	-	-	50,1±0,8
Положительный В	-	-	1:16/ 1:16 – 1:32	1:16	5,2±0,4
Отрицательный	Менее 1:2	Менее 1:2	Менее 1:2	Менее 1:2	50,4±0,1
Лимит содержания анти-А ГА	1:64/ 1:62 – 1:64	1:64	-	-	50,2±0,6
Лимит содержания анти-В ГА	-	-	1:64/ 1:64 – 1:68	1:64	50,1±0,3

Положительные и отрицательный компоненты СО обязательны к применению при каждом испытании ЛП ИГЧ. 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 гемагглютининов в испытуемом образце не должен превышать таковой в компонентах СО лимита содержания анти-А и/или анти-В ГА. Проведенные исследования позволили запатентовать изобретение «Стандартный образец содержания анти-А и анти-В гемагглютининов в препаратах крови человека: RU 2671415» (Приложение А) [85].

Стабильность СО определяли методом естественного старения в течение двух лет (срок наблюдения) при температуре  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ . Проведенные исследования по подтверждению аттестованной характеристики и оценка стабильности свойств ОСО 42–28–431–2014 позволили установить стабильность свойств ОСО 42-28-439 в течение 4 лет.

Для продления первоначально установленного срока годности ОСО 42-28-439 определение содержания ГА и белка проводили в соответствии с Программой продления срока годности (таблицы 36, 37). Стандартные образцы Европейской фармакопеи ВРР анализировали методом прямой гемагглютинации.

Таблица 36 – Содержание белка в образцах компонентов ОСО «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов», серия 1

День проведения испытаний после вскрытия	Образец	Положительный компонент А	Положительный компонент В	Отрицательный компонент	Компонент лимит анти-А	Компонент лимит анти-В
1	1	50,98 мг/мл	50,31 мг/мл	50,49 мг/мл	50,31 мг/мл	50,02 мг/мл
	2	49,63 мг/мл	49,73 мг/мл	50,21 мг/мл	49,53 мг/мл	50,40 мг/мл
	3	49,73 мг/мл	50,49 мг/мл	50,40 мг/мл	50,69 мг/мл	49,92 мг/мл
$\bar{x} \pm 2S_x$		50,1±1,5 мг/мл	50,2±0,8 мг/мл	50,4±0,3 мг/мл	50,2±1,2 мг/мл	50,1±0,5 мг/мл

Содержание белка во всех компонентах стандартного образца составило от 49,73 до 50,98 мг/мл; различия в данных по содержанию белка в испытаниях при аттестации и при продлении срока годности статистически не значимы.

Среднее значение содержания гемагглютининов в компонентах ОСО соответствовало установленным ранее и составило:

- в положительном компоненте А – количество анти-А гемагглютининов, соответствующее разведению 1:32 (в реакции непрямой гемагглютинации); 1:16 (в реакции прямой гемагглютинации);

- в положительном компоненте В - количество анти-В гемагглютининов, соответствующее разведению 1:16 (в реакции непрямой гемагглютинации); 1:16 (в реакции прямой гемагглютинации);

- в отрицательном компоненте содержание анти-А и анти-В гемагглютининов соответствует разведению менее 1:2;

- в компоненте лимит содержания анти-А гемагглютининов – количество анти-А гемагглютининов, соответствующее разведению 1:64.

- в компоненте лимит содержания анти-В - количество анти-В гемагглютининов, соответствующее разведению 1:64.

Таблица 37 – Содержание гемагглютининов в компонентах ОСО «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов», серия 1

День	Образец	Аналитик	ОСО 42–28–431–2014		Положительный компонент А		Положительный компонент В		Отрицательный компонент		Компонент лимит анти-А		Компонент лимит анти-В		Положительный СО (BRP)		Отрицательный СО (BRP)		СО лимит содержания (BRP)		
			ПГА	НГА	ПГА	НГА	ПГА	НГА	ПГА	НГА	ПГА	НГА	ПГА	НГА	ПГА	НГА	А	В	А	В	А
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	1	1	1:256	1:256	1:16	1:32	1:16	1:16	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:66	1:32	1:64	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	
			1:256	1:256	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:62	-	1:64	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	-	-	1:16	1:32	1:16	1:16	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	
			-	-	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:64	-	1:64	-	-	-	-	-	-	
	3	1	-	-	1:16	1:32	1:16	1:16	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	
			-	-	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:64	-	1:64	-	-	-	-	-	-	
	1	1	2	1:256	1:256	1:32	1:32	1:16	1:32	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64
				1:256	1:256	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:64	-	1:64	-	-	-	-	-	-
		2	2	-	-	1:16	1:32	1:16	1:16	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64
				-	-	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:64	-	1:64	-	-	-	-	-	-
		3	2	-	-	1:16	1:32	1:16	1:16	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32	1:64	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64
				-	-	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:64	-	1:64	-	-	-	-	-	-
9	1	1	1:256	1:256	1:16	1:32	1:16	1:32	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32	1:64	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	
			1:256	1:256	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:64	-	1:66	-	-	-	-	-	-	
	2	1	-	-	1:16	1:32	1:16	1:16	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	
			-	-	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:64	-	1:64	-	-	-	-	-	-	
	3	1	-	-	1:16	1:32	1:16	1:16	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32	Менее 1:2	Менее 1:2	1:64	1:64	
			-	-	-	1:32	-	1:16	-	Менее 1:2	-	1:64	-	1:64	-	-	-	-	-	-	



Содержание анти-А и анти-В гемагглютининов в компонентах ОСО 42–28–431–2014, хранившегося при температуре  $(5\pm 3)$  °С в течение 5 лет, составило 1:256. Указанное значение соответствует результатам ежегодной оценки его стабильности в условиях естественного хранения в период с 2016 по 2019 год.

Срок годности СО «Набор для определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов» (ОСО 42-28-439) серия № 1 продлен на 18 месяцев. 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)
- и подготовлена соответствующая нормативно-техническая документация (Приложение Б):

### **7.1.3. Разработка стандартного образца «Набор для определения содержания анти-Д антител»**

#### **7.1.3.1. Обоснование состава и свойств стандартного образца для определения содержания анти-Д антител**

СО «Набор для определения содержания анти-Д антител» должен включать в себя два компонента: отрицательный и положительный.

Отрицательный компонент не должен содержать анти-D антитела, его предназначение – оценка специфичности реакции гемагглютинации: при отсутствии специфичных антител этот образец не должен вызывать агглютинацию резус-положительных эритроцитов, 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 [40].

### **7.1.3.2. Разработка критериев выбора кандидатов в компоненты стандартного образца для определения содержания анти-D антител**

Ранее в ФГБУ «НЦ ЭСМП» был разработан СОС Иммуноглобулина человека содержания анти-D антител (СОС 42–28–432–2014) с содержанием анти-D антител в титре 1:8. В основу его получения был положен принцип изготовления международного стандартного образца: разведение антирезусного иммуноглобулина человека до необходимого содержания антител. Однако срок годности такого образца составил менее года, что предопределило целесообразность поиска других способов получения положительного компонента стандартного образца.

Нами предложен в качестве кандидата в положительный компонент СОС раствор ИГЧ, полученный из плазмы крови Rh(-) доноров IV(AB) группы, в которой могут выявляться анти-D антитела; в отрицательный компонент – раствор ИГЧ, полученный из плазмы крови Rh(+) доноров IV(AB) группы. Принципиально важным является факт использования доноров IV(AB) группы крови, так как только в этом случае будет исключена неспецифическая агглютинация, обусловленная групповыми антигенами эритроцитов системы АВ0.

В качестве кандидата в положительный компонент стандартного образца была закуплена серия ИГЧ, изготовленная из соответствующей плазмы в филиале ФГУП «НПО «Микроген» в г. Уфа. Результаты

предварительного анализа индивидуальных донаций свидетельствовали о наличии у некоторых доноров высокого содержания анти-D антител (1:256 и выше). Для разработки отрицательного компонента на основе плазмы резус-положительных доноров на том же предприятии была получена серия полуфабриката иммуноглобулина человека, не содержащая анти-D антитела (таблица 38).

Таблица 38 – Основные характеристики серии полуфабриката иммуноглобулина человека, предназначенных для разработки компонентов «Набора для определения содержания анти-D антител»

Наименование характеристики	Значение для серии полуфабриката с содержанием анти-D антител	
	повышенным	менее 1:2
Резус-принадлежность доноров плазмы	Отрицательный (Rh-)	Положительный (Rh+)
pH полуфабриката	6,8	6,7
Содержание белка в полуфабрикate, мг/мл	69	62
Содержание анти-D антител	1:32	Менее 1:2

В ходе дальнейшей технологической обработки указанных полуфабрикатов с целью корректировки содержания белка до 50 мг/мл кандидаты в СО с содержанием анти-D антител в титре 1:8 и менее 1:2, соответственно подготовлены для проведения аттестации и исследований стабильности.

### **7.1.3.3. Разработка программы и методик аттестации стандартного образца для определения содержания анти-D антител**

Разработанная программа предусматривала проведение аттестации СО с использованием метода ПГА «на плоскости» и гелевой технологии в

соответствии с методиками, регламентированными для контроля качества ЛП ИГЧ. Учитывая тот факт, что оценка количественного содержания анти-D антител методами гемагглютинации предусматривает приготовление двукратных разведений образцов, получаемые значения будут иметь большую неопределенность. Для более точного установления значений аттестуемой характеристики в настоящих исследованиях мы применили метод проточной цитофлюориметрии.

Установление содержания белка проводили по результатам, полученным в одной лаборатории одним исследователем с использованием ОСО содержания белка в иммуноглобулине (ОСО 42-28-340). Для проведения испытаний использовали 3 набора кандидата в ОСО. Получали результаты для каждого компонента из каждого набора в первый день и в 14 день после вскрытия ампул.

Установление значений аттестуемой характеристики ОСО по содержанию анти-D антител проводили по результатам, полученным в одной лаборатории с привлечением двух исследователей с использованием методик испытаний в соответствии с ОФС.1.8.2.0004.15 «Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека» [28].

В испытаниях использовали международный стандарт WHO Reference Reagent, Anti-D antibodies in intravenous immunoglobulin: Positive control and Negative control, NIBSC 02/228 & 02/226 (при определении титра анти-D антител) и международный стандарт для анти-D иммуноглобулина NIBSC 01/572 (при определении антирезусной активности).

Для проведения испытаний с целью продления срока годности использовали 6 наборов ОСО. Испытания проводили в течение 14 дней с целью изучения стабильности свойств СО после вскрытия. Трехкратно проводили определение аттестуемой характеристики в 3 наборах методом гемагглютинации:

- 1 определение - два исследователя с использованием одних и тех же наборов, вскрытых непосредственно перед проведением испытаний;

- 2 определение (7 сутки после вскрытия) - два исследователя с использованием тех же наборов, вскрытых в первый день, закупоренных PARAFILM® и хранившихся при температуре  $(5\pm 3)$  °С в течение 7 дней;
- 3 определение (14 сутки после вскрытия) - два исследователя с использованием тех же наборов, вскрытых в первый день, закупоренных PARAFILM® и хранившихся при температуре  $(5\pm 3)$  °С в течение 14 дней.

Дополнительно в эти же дни проводили определение антирезусной активности методом гемагглютинации и методом проточной цитофлуориметрии. Так как расчетный диапазон антирезусной активности положительного компонента СО в соответствии с международными требованиями не должен превышать 0,0475 МЕ/мл, 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 цитофлуориметрии и методом ПГА с использованием международного СО антирезусного иммуноглобулина. Указанные методы используются для определения специфической активности антирезусных иммуноглобулинов в соответствии с ЕФ [106]. Однако регламентируемый диапазон калибровочной кривой превышает 0,1 МЕ/мл, что предопределило необходимость оптимизации методик для целей аттестации СО.

Антирезусную активность, выраженную в МЕ/мл, определяли в сравнении с антирезусной активностью международного стандарта антирезусного иммуноглобулина в реакции гемагглютинации и методом проточной цитофлуориметрии по калибровочному графику.

Приготовление проб СО проводили в зависимости от содержания белка. В методиках определения содержания анти-D антител и антирезусной активности методом гемагглютинации образцы разводили до содержания белка 25 мг/мл, это разведение принимали 1:2. Далее готовили еще одно

двукратное разведение отрицательного компонента (1:4). Дальнейшие разведения положительного компонента СО осуществляли параллельно двумя рядами двукратным шагом для получения разведений 1:4, 1:8, 1:16; из разведения 1:2 с шагом 0,67 получали разведение 1:3, затем получали разведения 1:6, 1:12. Международный стандарт NIBSC 02/228 & 02/226 разводили в соответствии с инструкцией по применению.

В методике определения антирезусной активности методом проточной цитофлуориметрии компоненты разрабатываемого и международного стандарт NIBSC 02/228 & 02/226 использовали без разведения.

Международный стандарт антирезусного иммуноглобулина после восстановления в 1,0 мл воды очищенной (285 МЕ/мл) разводили последовательно в 10 раз (2,85 МЕ/мл), в 5 раз (0,57 МЕ/мл), в 1,5 раза (0,38 МЕ/мл), далее двукратными шагами до получения разведения с расчетной активностью 0,19; 0,0475; 0,02375; 0,0119; 0,00595 МЕ/мл.

В исследовании использовали эритроциты DiaCell I-II-III 5% фенотипов ccddee (rr) и CC<sup>w</sup>DDee (R1R1) и конъюгаты фикоэритрин PE и флуоресцеин FITC. Использование FITC характеризуется линейностью калибровочного графика при более низких концентрациях по сравнению с красителем PE (таблица 38).

Таблица 39– Результаты оценки валидационных характеристик методики цитофлуориметрического определения антирезусной активности иммуноглобулина человека с использованием различных меток

Флюоресцентная метка	Характеристики методики			
	Специфичность	Линейность	Диапазон	Правильность
Фикоэритрин	+	$y=1,2594x+0,0708$ $R^2=0,986$	от 1,425 до 0,0445 МЕ/мл	105 %
Флуоресцеин	+	$y=1,0379x+0,0018$ $R^2=0,985$	от 0,356 до 0,006 МЕ/мл	103 %

Отличий в применении фенотипов  $CC^wDDee$  или  $CCDDee$  установлено не было. После открытия флакона использование эритроцитов возможно в течение не более 14 суток, так как в дальнейшем развивается спонтанный гемолиз при проведении процедуры отмывания.

При исследованиях для контроля специфичности использовали резус-отрицательные эритроциты фенотипа  $ccddee$  (rr), в которые добавляли раствор стандартного образца первого разведения, используемого для построения калибровочной кривой. Результаты показали, что флюоресценция превышала значение холостой пробы, однако, для установления достоверности различий подтверждалась только при соблюдении критерия: среднее значение флюоресценции отрицательного контрольного образца (буферный раствор) должно быть менее половины среднего значения флюоресценции первого разведения стандарта положительного контроля (Рисунок 18).

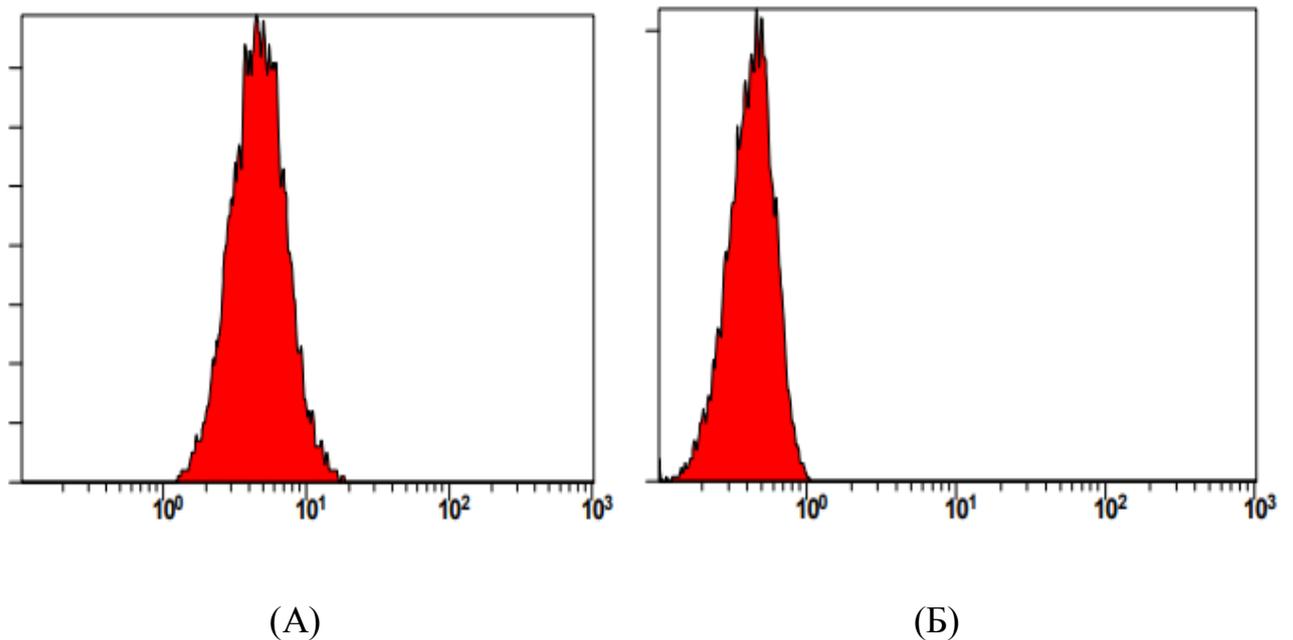


Рисунок 18 - Результаты определения флюоресценции стандартного образца в концентрации 0,267 МЕ/мл при использовании резус-положительных (А) и резус-отрицательных (Б) эритроцитов

Нами проведены валидационные исследования методик определения антирезусной активности, которые позволили установить их соответствие установленным критериям по параметрам линейности, специфичности, правильности, внутрилабораторной прецизионности (таблица 40).

Таблица 40 – 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»	+	Не применимо	85-115%	15 %
ПГА гелевая технология	+	Не применимо	90-115%	12 %
Проточная цито-флуориметрия	+	$y=8,8141x+0,0725$ ; $R^2=0,9977$ ; 0,006 – 0,095 МЕ/мл	90-110 %	14%

#### 7.1.3.4. Получение, аттестация и изучение стабильности стандартного образца «Набор для определения содержания анти-D антител»

ОСО «Набор для определения содержания анти-D антител» представляет собой набор, состоящий из растворов иммуноглобулина человека из плазмы крови доноров соответствующей групповой и резус-принадлежности:

- иммуноглобулин человека, полученный из плазмы крови Rh(-) доноров IV(AB) группы крови, разлитый в ампулы НС-1 емкостью 3 мл по 3,0 мл, производитель филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, г. Уфа, Россия;

- иммуноглобулин человека, полученный из плазмы крови Rh(+) доноров IV(AB) группы крови, разлитый в ампулы НС-1 емкостью 3 мл по 3,0 мл, производитель филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, г. Уфа, Россия.

Среднее значение содержания указанных антител в компонентах ОСО соответствовало заявленным требованиям и составило (таблица 41):

- в положительном компоненте количество анти-D антител, соответствующее разведению 1:8 (Me) с размахом варьирования от 1:4 до 1:8 (методом «на плоскости»); 1:8 (Me) с размахом варьирования от 1:8 до 1:8 (методом с использованием гелевой технологии);

- антирезусная активность методом проточной цитофлюориметрии для положительного компонента составила  $0,23 \pm 0,04$  МЕ/мл ( $\bar{x} \pm 2S_x$ )

- в отрицательном компоненте содержание анти-D антител соответствует разведению менее 1:2.

Содержание белка в компонентах стандартного образца составило мл ( $\bar{x} \pm 2S_x$ ):

- в положительном компоненте содержания анти-D антител –  $50 \pm 1$  мг/мл;

- в отрицательном компоненте содержания анти-D антител –  $54 \pm 3$  мг/мл, с доверительной вероятностью 0,95.

Таким бразом был разработан и аттестован ОСО 42-28-440 «Набор для определения содержания анти-D антител», подготовлен комплект нормативно-технической документации (паспорт (Приложение Б), инструкция по применению, макеты первичной и вторичной упаковки).

Стабильность СО определяли методом естественного старения в течение двух лет (срок наблюдения) при температуре  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ , что позволило установить срок годности СО, составивший 2 года (срок наблюдения).

Таблица 41 – Результаты аттестации СО «Набор для определения содержания анти-D антител»

Дата	Аналитик	Содержание анти-D антител				Антирезусная активность, МЕ/мл, $\bar{X} \pm 2S_x$	Содержание белка, мг/мл, $\bar{X} \pm S_x$			
		метод «на плоскости»		метод с использованием гелевой технологии			Положительный компонент	Отрицательный компонент	Положительный компонент	Отрицательный компонент
		Положительный компонент	Отрицательный компонент	Положительный компонент	Отрицательный компонент					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
14.04.2017	1	1:4	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2	0,23±0,04	отсутствует	50±1	54±3	
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
	2	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:4	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
	3	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:4	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
17.04.2017	1	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2	0,21±0,04	отсутствует	49±2	53±4	
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
	2	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
	3	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:4	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
18.04.2017	1	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2	0,20±0,04	отсутствует	58±3	53±3	
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
	2	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
	3	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует			

Продолжение таблицы 41

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11.05.2017	1	1:4	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2	0,19±0,44	отсутствует	47±4	51±3
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
	2	1:4	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
	3	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:4	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
12.05.2017	1	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2	0,23±0,14	отсутствует	50±1	52±4
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
	2	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:4	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
	3	1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		
		1:8	Менее 1:2	1:8	Менее 1:2		отсутствует		

Определение содержания анти-D антител, белка и антирезусной активности при продлении срока годности подтвердили их соответствие аттестованным значениям (таблицы 42 - 44).

Таблица 42 – Содержание белка в образцах компонентов ОСО «Набор для определения содержания анти- D антител»

День после вскрытия	Образец	Положительный компонент	Отрицательный компонент
1	1	49,7 мг/мл	50,0 мг/мл
	2	50,7 мг/мл	48,7 мг/мл
	3	49,8 мг/мл	49,3 мг/мл
$\bar{x} \pm 2S_x$		50,0 $\pm$ 0,1 мг/мл	49,4 $\pm$ 1,4 мг/мл

Таблица 43 – Антирезусная активность образцов компонентов ОСО «Набор для определения содержания анти-D антител» методом гемагглютинации

День	Аналитик	Последнее разведение, в котором определяется агглютинация					
		ОСО		NIBSC		Международный стандарт антирезусного иммуноглобулина	
		плоскость	гель	плоскость	гель	плоскость	гель
1	1	1:6	1:8	1:8	1:8	1:16000	1:32000
		1:8	1:8				
		1:12	1:8				
	2	1:8	1:8	1:8	1:4	1:32000	1:36000
		1:8	1:8				
		1:4	1:8				
2	1	1:6	1:8	1:4	1:4	1:32000	1:16000
		1:8	1:8				
		1:8	1:8				
	2	1:8	1:8	1:8	1:8	1:32000	1:30000
		1:8	1:8				
		1:6	1:8				
3	1	1:12	1:8	1:8	1:16	1:32000	1:16000
		1:8	1:8				
		1:8	1:8				
	2	1:8	1:8	1:8	1:8	1:32000	1:30000
		1:8	1:8				
		1:12	1:8				

Таблица 44 – Характеристики стандартного образца «Набор для определения содержания анти-D антител»

Дата	Аналитик	Содержание анти-D антител в СО								Антирезусная активность, МЕ/мл,									
		метод «на плоскости»				метод с использованием гелевой технологии				Метод гемагглютинации				Метод проточной цитофлуориметрии					
		Положительный компонент		Отрицательный компонент		Положительный компонент		Отрицательный компонент		Положительный компонент		Отрицательный компонент		Положительный компонент		Отрицательный компонент			
		OCO	NIBSC	OCO	NIBSC	OCO	NIBSC	OCO	NIBSC	OCO	NIBSC	OCO	NIBSC	OCO	NIBSC	OCO	NIBSC		
19.06.2019	1	1:6	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	1:8	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	0,107	0,071	0,143	0,071	Не выявляется	Не выявляется	-	-	-	-
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,143	0,071	-					-	-	-	
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,214	0,071	-					-	-	-	
	2	1:8	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	1:8	1:4	Менее 1:2	Менее 1:2	0,071	0,016	0,071	0,032			-	-	-	-
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,071	0,016	-					-	-	-	
		1:4		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,036	0,016	-					-	-	-	
26.06.2019	1	1:6	1:4	Менее 1:2	Менее 1:2	1:8	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	0,053	0,143	0,036	0,071	Не выявляется	Не выявляется	0,026	0,05	Не выявляется	
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,071	0,143	0,025					-		-	
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,071	0,143	0,029					-		-	-
	2	1:8	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	1:8	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	0,071	0,076	0,071	0,076			-	-	-	-
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,071	0,076	-					-	-	-	
		1:6		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,053	0,076	-					-	-	-	
03.07.2019	1	1:12	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	1:8	1:16	Менее 1:2	Менее 1:2	0,107	0,143	0,071	0,285	Не выявляется	Не выявляется	0,02	0,058	Не выявляется	
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,071	0,143	0,031					-		-	
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,071	0,143	0,029					-		-	-
	2	1:8	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	1:8	1:8	Менее 1:2	Менее 1:2	0,071	0,076	0,071	0,076			-	-	-	-
		1:8		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,071	0,076	-					-	-	-	
		1:12		Менее 1:2		1:8		Менее 1:2	0,107	0,076	-					-	-	-	
05.07.2019	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,018	0,04	Не выявляется	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,016		-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,014		-	-
X ср										0,085	0,088	0,08	0,10	-	-	0,03	0,049	-	-
S <sub>x</sub>										0,04	0,05	0,04	0,09	-	-	0,005	0,009	-	-

Содержание белка во всех компонентах стандартного образца составило от 48,7 до 50,7 мг/мл.

Антирезусная активность методом гемагглютинации для положительного компонента ОСО составила в среднем 0,09 МЕ/мл, что соответствует антирезусной активности положительного стандарта NIBSC в этих испытаниях, методом проточной цитофлуориметрии – 0,03 МЕ/мл, при соответствующей активности положительного стандарта NIBSC – 0,049 МЕ/мл в этих испытаниях.

Результаты испытаний позволили продлить срок годности СО «Набор для определения содержания анти- D антител» (ОСО 42-28-440) серия № 1 на 18 месяцев.

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 45).

Таблица 45 – Значения характеристик компонентов стандартного образца «Набор для определения содержания анти-D антител»

Наименование компонента СО	Содержание анти-D антител, определенное методом ПГА..., Мо/диапазон значений	Содержание белка, мг/мл, $\bar{x} \pm S_x$	Антирезусная активность, МЕ/мл, $\bar{x} \pm S_x$	
			Проточная цитофлуориметрия	ПГА
Положительный	1:8/1:4 – 1:8 <sup>1</sup> 1:8/1:8 – 1:8 <sup>2</sup>	50,9±0,3	0,027± 0,004	0,062± 0,009 <sup>1</sup> 0,055± 0,006 <sup>2</sup>
Отрицательный	Менее 1:2 <sup>1</sup> Менее 1:2 <sup>2</sup>	50,1±0,7	Менее 0,006	Не выявляется
Примечания. 1 – методика «на плоскости» 2 – гелевая технология				

Предложенный нами методологический подход в обосновании выбора кандидатов в компоненты СО и стратегия его аттестации позволил получить патент на изобретение «Стандартный образец содержания анти-D антител в препаратах иммуноглобулинов человека: RU 2682714» (Приложение А) [83].

#### **7.1.4. Разработка стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина»**

##### **7.1.4.1. Обоснование состава, свойств и алгоритма разработки стандартного образца для определения содержания активатора прекалликреина**

Анализ мировых тенденций в разработке СО активатора прекалликреина, проведенный в разделе 1, позволил определить возможные направления в разработке национального СО активатора прекалликреина: выбор готового лекарственного препарата альбумина человека с повышенным содержанием активатора прекалликреина и/или разработка СО на основе препарата альбумина человека с добавлением соответствующего количества реагента «Активированный фактор XIIa» до содержания не менее 35 МЕ/мл.

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 19). Использование препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения отечественного производства в качестве исходного сырья при разработке СО содержания АПК не целесообразно, ввиду низкого содержания в данных препаратах АПК (по результатам предварительных исследований содержание АПК составляет менее 5 МЕ/мл), а также необходимости пробоподготовки с целью доведения концентрации по белку до 30 г/л, что увеличивает время проведения рутинных испытаний.

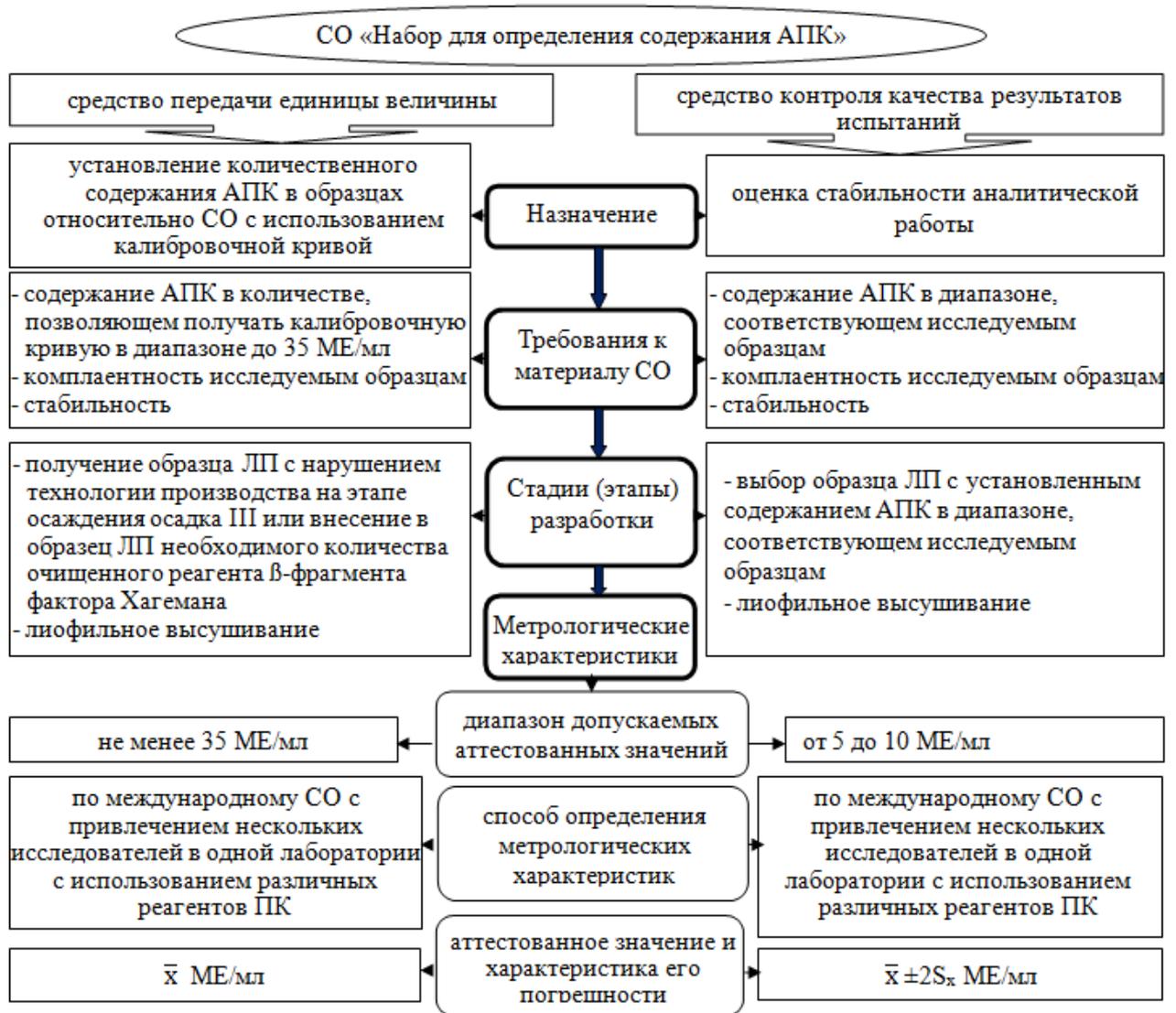


Рисунок 19 - Алгоритм разработки СО для определения содержания АПК

Кроме того, учитывая отсутствие на российском рынке зарегистрированного реагента ПК, нами была изучена возможность разработке СО для определения содержания АПК в комплекте с ПК, изготовленным ООО фирма «Технология-Стандарт»

#### 7.1.4.2. Разработка программы аттестации стандартного образца для определения содержания активатора прекалликреина

Программа аттестации СО содержания АПК предусматривала использование различных доступных реагентов прекалликреина в зависимости от комплектности аттестуемого СО.

Подготовка образцов:

- в день проведения испытаний необходимое количество ампул/флаконов должно быть извлечено из низкотемпературного холодильника и выдержано при комнатной температуре не менее 60 мин;

- для определения содержания активатора прекалликреина содержимое ампулы/флакона должно быть восстановлено необходимым количеством воды очищенной (компонент для оценки содержания активатора прекалликреина – 1,0 мл; компонент контроля – 1,0 или 2,0 мл).

Для определения содержания активатора прекалликреина могут быть использованы СО Европейской фармакопеи Prekallikrein Activator in albumin BRP, Y0000263 и/или международный СО WHO International Standard 2nd International Standard For Prekallikrein Activator NIBSC, 02/168.

Для определения содержания активатора прекалликреина должны быть использованы реагенты прекалликреина производства Coachrom Diagnostica (COA0022), Австрия; NYPHEN BioMed (PP501), Франция; Sekisui Diagnostics GmbH (ADG472), США; Enzyme Research Laboratories (HPK 1302), США; Calbiochem, EDM Millipore Corporation (529583-1MG), Канада; ООО фирма «Технология-Стандарт», РФ.

Установление аттестованных значений содержания активатора прекалликреина в компонентах СО проводят по результатам, полученным в одной лаборатории с привлечением двух исследователей с использованием методик испытаний в соответствии с ОФС.1.8.2.0013.18 «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека» [81].

Должны быть проведены предварительные исследования, подтверждающие отсутствие калликреиновой активности в ОСО. С этой целью определяют содержание активатора прекалликреина в образце ОСО одновременно со СО ЕФ или международным СО в семи разведениях (расчетное содержание активатора прекалликреина 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 МЕ/мл), внося в лунки 96-ти луночного планшета с плоским дном по 0,005 мл аттестуемого ОСО и соответствующих

разведений СО в трех повторностях. В лунки двух повторностей затем вносят по 0,045 мл раствора прекалликреина, в лунку третьей повторности (холостая проба) – 0,045 мл трис-буферного раствора, планшет помещают в термостат при температуре  $(37 \pm 0,5)$  °С. По окончании 30 мин инкубации во все заполненные лунки вносят по 0,050 мл хромогенного субстрата, перемешивают и при температуре  $(37 \pm 0,5)$  °С измеряют скорость изменения интенсивности окраски на анализаторе иммунологическом Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, Германия.

Если значение скорости изменения оптической плотности в холостой пробе не превышает 2 % от значения скорости изменения оптической плотности в лунках испытуемых повторностей, то аттестуемое ОСО не обладает калликреиновой активностью и в дальнейших исследованиях по установлению аттестуемой характеристики анализ холостой пробы можно не проводить.

Для установления аттестуемой характеристики проводили исследования в два дня:

- 1 определение: в течение одного рабочего дня два оператора с использованием трех ампул компонента для оценки содержания АПК, шести ампул компонента контроля и трех различных реагентов прекалликреина (производства Coachrom Diagnostica; HYPHEN BioMed; Enzyme Research Laboratories). На одном 96-луночном планшете размещали разведения СО (ЕФ или международного), разведения компонента для оценки содержания активатора прекалликреина (три образца) (расчетное содержание активатора прекалликреина 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 МЕ/мл), компоненты контроля, восстановленные в 1,0 мл и 2,0 мл воды очищенной (по три образца). На одном планшете проводили испытания с использованием реагента прекалликреина одного производителя.

Компоненты контроля анализировали без разведения.

После восстановления компонента для оценки содержания активатора прекалликреина в 1,0 мл воды очищенной каждый оператор готовил разведения СО самостоятельно из одной ампулы по схеме (Рисунок 20).

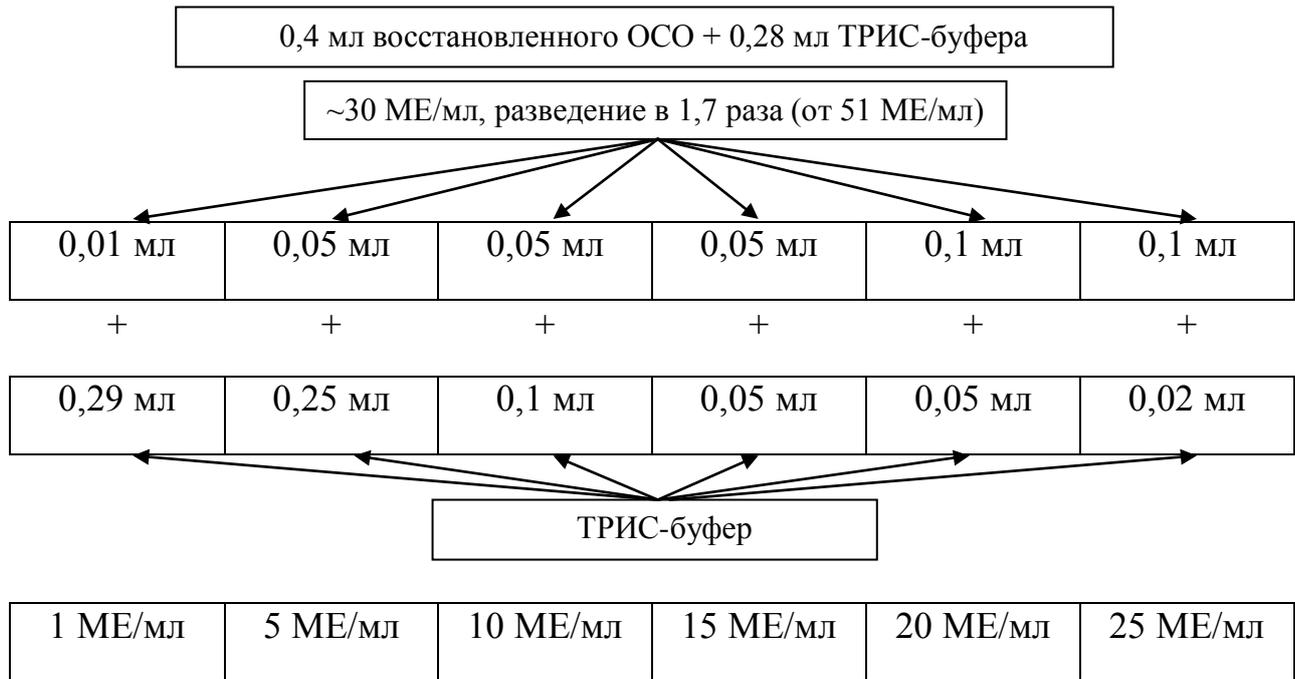


Рисунок 20 – Схема приготовления разведений компонента для оценки содержания АПК

- 2 определение: в течение одного рабочего дня (с интервалом 1-2 дня от первого определения) два оператора с использованием трех наборов и двух различных реагентов прекалликреина (производства Calbiochem, EDM Millipore Corporation; ООО фирма «Технология-Стандарт»). На одном 96-луночном планшете размещали разведения СО (ЕФ или международного), разведения компонента для оценки содержания активатора прекалликреина (три образца) (расчетное содержание активатора прекалликреина 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 МЕ/мл), компоненты контроля, восстановленные в 1,0 мл и 2,0 мл воды очищенной (по три образца). На одном планшете проводили испытания с использованием реагента прекалликреина одного производителя.

Компоненты контроля анализировали без разведения.

После восстановления компонента для оценки содержания активатора прекалликреина в 1,0 мл воды очищенной каждый оператор готовил разведения ОСО самостоятельно из одной ампулы по указанной выше схеме.

Определение потери массы при высушивании проводили с использованием 2 наборов (6 ампул/флаконов) одним оператором в соответствии с ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании».

Определение времени получения восстановленного ОСО проводили при подготовке ОСО к испытаниям по установлению аттестуемой характеристики (6 образцов компонента для оценки содержания активатора прекалликреина; по 6 образцов компонентов контроля при восстановлении в 1,0 мл и 2,0 мл воды очищенной).

Стабильность ОСО изучают в условиях хранения при температуре не выше минус 20 °С методом естественного старения. Оценку аттестуемой характеристики проводят ежемесячно с использованием трех образцов компонента для оценки содержания активатора прекалликреина; по 3 образца компонентов контроля при восстановлении в 1,0 мл и 2,0 мл воды очищенной).

Для расчета аттестованных значений по содержанию активатора прекалликреина проводили оценку статистической значимости различий полученных результатов для каждого из компонентов, полученных с использованием всех реагентов прекалликреина на основании оценки t-критерия Стьюдента, а также оценки статистической значимости различий линий регрессии для аттестуемого ОСО и международного или фармакопейного СО.

При условии отсутствия статистически значимых различий полученные результаты объединяли для каждого соответствующего компонента, вычисляли среднее арифметическое значение ( $\bar{x}$ ), стандартное отклонение ( $S_x$ ) и расширенную неопределенность аттестованного значения ( $\Delta X$ ) (при необходимости) по результатам серии измерений (по 18 результатов определения кинетическим тестом и тестом со стоп-реагентом для каждого исследователя).

Аттестованную характеристику по содержанию активатора прекалликреина представляли:

- в компоненте для оценки содержания активатора прекалликреина в виде среднего значения, выраженного в МЕ/ампулу(флакон);

- в компоненте контроля в виде  $\bar{x} \pm 2S_x$ , выраженного в МЕ/мл при восстановлении в 1,0 и 2,0 мл воды очищенной.

#### **7.1.4.3. Получение, аттестация и изучение стабильности стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина»**

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 XHa применяли в качестве кандидата в компонент для оценки содержания АПК. Образцы после розлива по 1,0 мл в ампулы подвергали замораживанию при температуре минус 70<sup>0</sup>С и лиофильному высушиванию на установке Usifroid.

Аттестацию СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» осуществляли разработанными методиками определения содержания АПК с использованием доступных реагентов ПК и международного СО содержания АПК в альбумине (таблицы 46, 47).

Сравнительная оценка значимости различий линий регрессии для международного СО содержания АПК в альбумине и разработанного нами СО (компонент для оценки содержания АПК) позволила сделать вывод о статистической незначимости различий линий регрессии для указанных СО

Оценка результатов определения содержания АПК в образцах компонентов ОСО, полученных двумя операторами, позволила сделать вывод об отсутствии значимых различий: t-критерий Стьюдента при сравнении средних величин при табличном 2,032 (число степеней свободы равно 34) составил

- для компонента для оценки содержания АПК - 0 (кинетический тест); 0,05 (тест по конечной точке);

Таблица 46 – Оценка зависимости изменения оптической плотности/оптической плотности от концентрации АПК в компонентах СО «Набор для определения содержания АПК»

Серия	Наименование теста	Реагент прекалликреина	Уравнение Линейной регрессии	R <sup>2</sup>	Параллелизм		Линейность	
					Fтеор.	Fэксп	Fтеор.	Fэксп
1	Кинетический тест	1	$y=0,0021x+0,0016$	0,9942	9,55	0,00	9,01	0,65
		2	$y=0,0012x+0,0007$	0,9969	6,94	0,82	6,16	0,34
		3	$y=0,0005x+0,0002$	0,9993	6,94	0,05	6,16	0,67
		4	$y=0,0004x+0,0003$	0,9970	6,94	0,43	6,16	0,13
		5	$y=0,0017x-0,0039$	0,9984	5,59	1,21	4,35	2,79
	Тест по конечной точке	1	$y=0,054x+0,1111$	0,9902	9,55	0,00	9,01	0,65
		2	$y=0,0328x+0,0394$	0,9912	6,94	0,09	6,16	0,40
		3	$y=0,0149x+0,0686$	0,9975	9,55	0,00	9,28	0,18
		4	$y=0,0102x+0,0785$	0,9986	6,94	0,74	6,16	0,30
		5	$y=0,0235x+0,0228$	0,9929	5,32	0,26	3,84	2,58
2	Кинетический тест	1	$y=0,0019x+0,0019$	0,996	5,79	0,44	5,05	0,57
		2	$y=0,0015x+0,0016$	0,9944	6,94	0,48	6,16	0,36
		3	$y=0,0004x+0,0004$	0,9924	6,94	0,05	6,16	0,18
		4	$y=0,0005x+0,0004$	0,9933	6,94	0,14	6,16	0,45
		5	$y=0,0017x-0,0049$	0,9962	5,59	1,10	4,36	3,50
	Тест по конечной точке	1	$y=0,0484x+0,2517$	0,9906	5,79	0,44	5,05	0,57
		2	$y=0,0281x+0,1035$	0,9900	6,94	0,09	6,16	0,25
		3	$y=0,0143x+0,0702$	0,9953	9,55	0,02	9,28	2,50
		4	$y=0,0093x+0,085$	0,9969	6,94	0,25	6,16	0,64
		5	$y=0,0238x+0,0071$	0,9918	5,32	0,93	3,84	3,02

Примечание – использованы реагенты прекалликреина, производства  
1 - Calbiochem. EDM Millinore Corporation  
2 - Enzyme Research Laboratories  
3 - Hynphen  
4 - Coachrom Diagnostica  
5 – ООО фирма «Технология-Стандарт»

Таблица 47- Результаты определения содержания АПК в компонентах СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина»

Реагент ПК производства	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)		
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$				
Calbiochem, EDM Millipore Corporation	1	для оценки содержания АПК	1	51,1	49,7	1,6	3,3	52,3	50,6	1,6	3,1	50,1±1,5	50,6±1,2	
			2	48,3				49,9						
			3	49,4				49,5						
	2		1	50,9	51,3	0,6	1,1	51,8	50,6	1,0	2,0	51,0±0,8		
			2	51,2				50,2						
			3	52,0				49,9						
	1	контроля <sup>1</sup>	1	10,3	10,9	0,5	4,5	10,6	10,9	0,9	8,2	10,9±0,6	10,7±0,7	
			2	11,1				11,9						
			3	11,2				10,2						
			2	1	10,0	10,6	0,7	6,5	9,7	10,5	1,2	11,3		10,6±0,9
				2	10,5				10,0					
				3	11,4				11,9					
	1	контроля <sup>2</sup>	1*	5,7	5,9	0,3	5,4	5,8	6,0	0,2	2,9	6,0±0,2	6,0±0,2	
			2*	5,8				6,1						
			3*	6,3				6,1						
2			1*	6,0	6,0	0,1	1,7	5,9	6,0	0,2	2,5	6,0±0,1		
			2*	6,1				6,2						
			3*	5,9				6,0						

Реагент ПК производства	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)	
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$			
Enzyme Research Laboratories	1	для оценки содержания АПК	1	54,3	52,6	1,5	2,8	53,8	51,0	3,3	6,4	51,8 $\pm$ 2,4	51,0 $\pm$ 2,0
			2	51,8				47,4					
			3	51,8				51,87					
	2		1	51,2	49,8	1,2	2,5	51,6	50,6	1,1	2,2	50,2 $\pm$ 1,1	
			2	49,3				49,4					
			3	48,9				50,9					
	1	контроля <sup>1</sup>	1	11,6	10,8	0,8	7,4	11,8	10,9	1,0	9,3	10,9 $\pm$ 0,8	10,4 $\pm$ 1,0
			2	10,9				9,8					
			3	10,0				11,1					
	2		1	11,1	10,3	1,1	10,4	10,6	9,6	0,9	9,5	10,0 $\pm$ 1,0	
			2	10,8				9,2					
			3	9,1				8,9					
	1	контроля <sup>2</sup>	1*	7,0	6,4	0,6	8,9	6,5	6,2	0,3	5,0	6,3 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,4
			2*	5,9				5,9					
			3*	6,2				6,1					
2	1*		6,5	5,9	0,6	9,3	6,4	6,0	0,3	5,3	6,0 $\pm$ 0,4		
	2*		5,4				5,9						
	3*		5,9				5,8						

Реагент ПК производства	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)				
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$						
Нуphen	1	для оценки содержания АПК	1	49,4	50,0	2,0	4,0	51,9	51,6	0,4	0,8	50,8 $\pm$ 1,5	51,2 $\pm$ 1,2			
			2	48,41				51,1								
			3	52,3				51,7								
	2		1	50,6	51,4	0,9		1,8	52,3	51,9				0,4	0,7	51,7 $\pm$ 0,7
			2	52,4					51,9							
			3	51,2					51,6							
	1	контроля <sup>1</sup>	1	10,7	9,4	1,2	12,4	10,1	9,9	0,3	2,6	9,7 $\pm$ 0,8	10,4 $\pm$ 1,0			
			2	9,2				9,6								
			3	8,4				9,9								
	2		1	7,8	8,5	0,7		7,7	9,0	9,2				0,7	7,3	8,9 $\pm$ 0,7
			2	8,6					8,7							
			3	9,1					10,0							
	1	контроля <sup>2</sup>	1*	6,2	6,0	0,2	3,5	5,9	6,0	0,2	2,9	6,0 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,2			
			2*	5,8				6,2								
			3*	5,9				5,9								
	2		1*	5,9	5,9	0,1		1,7	6,0	6,0				0,4	5,9	5,9 $\pm$ 0,2
			2*	6,0					5,6							
			3*	5,8					6,3							

Реагент ПК производства	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)			
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$					
Coachrom Diagnostica	1	для оценки содержания АПК	4	49,9	50,6	2,6	5,1	49,0	50,7	3,2	6,3	50,6 $\pm$ 2,6	50,7 $\pm$ 2,3		
			5	48,4				54,3							
			6	53,4				48,7							
	2		4	48,5	50,9	3,0		48,9	50,5	1,8				3,5	50,7 $\pm$ 2,2
			5	50,0				52,4							
			6	54,2				50,3							
	1	контроля <sup>1</sup>	4	11,3	10,3	1,1	10,8	10,6	10,1	1,2	12,2	10,2 $\pm$ 1,1	10,0 $\pm$ 0,9		
			5	10,5				11							
			6	9,1				8,7							
	2		4	10	9,5	0,9		9,8	10,1	0,8				8,3	9,8 $\pm$ 0,8
			5	8,5				9,4							
			6	10,1				11							
	1	контроля <sup>2</sup>	4*	5,9	6,0	0,2	3,8	5,7	6,0	0,3	4,2	6,0 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 0,2		
			5*	5,9				6,0							
			6*	6,3				6,2							
	2		4*	6,2	6,1	0,1		5,9	6,1	0,2				3,4	6,1 $\pm$ 0,1
			5*	6,1				6,0							
			6*	6,1				6,3							

Реагент ПК производства	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)		
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$				
ООО фирма «Технология- Стандарт»	1	для оценки содержания АПК	4	54,3	51,1	1,8	3,6	51,9	51,1	0,5	1,0	51,1±1,3	51,1±1,2	
			5	49,4				50,4						
			6	49,9				50,9						
			4	52,0				50,9						
			5	50,3				51,3						
			6	50,9				51,0						
	2		4	51,2	51,1	1,3	2,5	52,9	51,3	1,1	2,2	51,2±1,2		
			5	48,6				51,9						
			6	52,0				49,5						
			4	51,6				50,8						
			5	50,9				51,0						
			6	52,0				51,6						
	1	1	контроля <sup>1</sup>	4	9,8	9,9	0,2	2,2	9,2	10,0	0,6	6,1	10,0±0,4	10,1±0,4
				5	9,6				9,5					
				6	10,1				10,0					
				4	9,9				10,1					
				5	10,0				10,4					
				6	10,2				10,9					
2		4		10,8	10,5	0,4	3,8	10,7	10,1	0,4	3,7	10,3±0,4		
		5		10,5				9,8						
		6		9,9				9,7						
		4		10,9				9,9						
		5		10,6				10,3						
		6		10,1				10,2						

Реагент ПК производства	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)	
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$			
ООО фирма «Технология- Стандарт»	1	контроля <sup>2</sup>	4*	6,3	6,0	0,2	3,0	6,0	6,0	0,2	2,9	6,0±0,2	6,0±0,2
			5*	6,1				6,3					
			6*	5,8				5,9					
			4*	5,9				5,8					
			5*	5,9				6,0					
			6*	6,1				6,1					
	2		4*	5,8	6,0	0,2	2,7	6,0	6,0	0,2	2,6	6,0±0,2	
			5*	5,9				5,7					
			6*	6,2				6,1					
			4*	6,2				6,0					
			5*	6,0				6,1					
			6*	6,0				6,1					

Примечания.

1 – после восстановления в 1,0 мл воды очищенной.

2 – после восстановления в 2,0 мл воды очищенной

- для компонента контроля восстановленного в 1,0 мл воды очищенной - 0,09 (кинетический тест); 0,12 (тест по конечной точке);
- для компонента контроля восстановленного в 2,0 мл воды очищенной - 0 (кинетический тест и тест по конечной точке).

Оценка результатов определения содержания АПК в образцах компонентов ОСО, полученных двумя тестами (кинетический и по конечной точке) позволила сделать вывод об отсутствии значимых различий: t-критерий Стьюдента при сравнении средних величин при табличном 2,002 (число степеней свободы равно 58) составил

- для компонента для оценки содержания АПК – 0,05;
- для компонента контроля восстановленного в 1,0 мл воды очищенной - 0;

Полученные результаты определения активности АПК объединили для соответствующих компонентов ОСО и рассчитали среднее значение содержания активатора прекалликреина (таблица 48).

Таблица 48- Содержание активатора прекалликреина в компонентах СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (ОСО 42-28-445) (серия 1)

Наименование компонента	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл ( $p=0,95$ )			Коэффициент вариации, процент
	Кинетический тест	Тест по конечной точке	Среднее значение	
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

Аттестацию СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином) осуществляли разработанными методиками определения содержания АПК с использованием

реагента ПК, входящего в состав набора, и международного СО содержания АПК в альбумине (таблица 49).

Оценка результатов определения содержания АПК в образцах компонентов ОСО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином), полученных двумя операторами, позволила сделать вывод об отсутствии значимых различий: t-критерий Стьюдента при сравнении средних величин при табличном 2,032 (число степеней свободы равно 34) составил

- для компонента для оценки содержания АПК - 0 (кинетический тест); 0,05 (тест по конечной точке);
- для компонента контроля восстановленного в 1,0 мл воды очищенной - 0,09 (кинетический тест); 0,12 (тест по конечной точке);
- для компонента контроля восстановленного в 2,0 мл воды очищенной - 0 (кинетический тест и тест по конечной точке).

Оценка результатов определения содержания АПК в образцах компонентов аттестуемого ОСО, полученных двумя тестами (кинетический и по конечной точке) позволила сделать вывод об отсутствии значимых различий: t-критерий Стьюдента при сравнении средних величин при табличном 2,002 (число степеней свободы равно 58) составил

- для компонента для оценки содержания АПК – 0,05;
- для компонента контроля восстановленного в 1,0 мл воды очищенной - 0;
- для компонента контроля восстановленного в 2,0 мл воды очищенной - 0.

Полученные результаты определения активности АПК объединили для соответствующих компонентов ОСО и рассчитали значение содержания активатора прекалликреина (таблица 50).

Таблица 49- Результаты определения содержания активатора прекалликреина в компонентах СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином)

Определение/ планшет	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)		
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$				
1/1 планшет	1	для оценки содержания АПК	1	51,0	50,2	0,8	1,6	51,0	50,6	0,6	1,2	50,4±0,7	50,7±0,8	
			2	50,3				49,9						
			3	49,4				50,9						
	2	1	50,9	51,3	0,6	1,2	51,8	50,8	1,0	1,9	51,1±0,8			
		2	51,0				50,8							
		3	52,0				49,9							
	1	1	контроля <sup>1</sup>	1	10,3	10,5	0,5	4,5	10,6	10,5	0,3	2,9	10,5±0,4	10,5±0,6
				2	10,1				10,8					
				3	11,0				10,2					
		2		1	10,0	10,4	0,3	3,0	9,7	10,5	1,2	11,3	10,1±0,9	
				2	10,5				10,0					
				3	10,6				11,9					
1	1	контроля <sup>2</sup>	1*	5,7	6,0	0,3	5,1	5,8	6,0	0,2	2,9	6,0±0,2	6,0±0,2	
			2*	5,9				6,1						
			3*	6,3				6,1						
	2		1*	6,0	6,0	0,1	1,7	5,9	6,0	0,2	2,5	6,0±0,1		
			2*	6,1				6,2						
			3*	5,9				6,0						

Определение/ планшет	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)		
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$				
1/2 планшет	1	для оценки содержания АПК	1	54,3	52,6	1,5	2,8	53,8	51,0	3,3	6,4	51,8 $\pm$ 2,4	51,0 $\pm$ 2,0	
			2	51,8				47,4						
			3	51,8				51,87						
	2		1	51,2	49,8	1,2	2,5	51,6	50,6	1,1	2,2	50,2 $\pm$ 1,1		
			2	49,3				49,4						
			3	48,9				50,9						
	1	1	контроля <sup>1</sup>	1	10,6	10,5	0,5	4,4	10,4	10,2	0,3	2,5	10,3 $\pm$ 0,4	10,2 $\pm$ 0,7
				2	10,9				9,9					
				3	10,0				10,2					
		2		1	11,1	10,6	0,7	6,4	10,6	9,6	0,9	9,5	10,1 $\pm$ 0,9	
				2	10,8				9,2					
				3	9,8				8,9					
1	1	контроля <sup>2</sup>	1*	6,5	6,2	0,3	4,8	6,1	6,0	0,1	1,9	6,1 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 0,2	
			2*	5,9				5,9						
			3*	6,2				6,1						
	2		1*	6,5	6,1	0,3	5,7	6,1	5,9	0,2	2,6	6,0 $\pm$ 0,3		
			2*	5,9				5,9						
			3*	5,9				5,8						

Определение/ планшет	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)		
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$				
1/3 планшет	1	для оценки содержания АПК	1	49,4	50,0	2,0	4,0	51,9	51,6	0,4	0,8	50,8 $\pm$ 1,5	51,2 $\pm$ 1,2	
			2	48,41				51,1						
			3	52,3				51,7						
	2		1	50,6	51,4	0,9	1,8	52,3	51,9	0,4	0,7	51,7 $\pm$ 0,7		
			2	52,4				51,9						
			3	51,2				51,6						
	1	1	контроля <sup>1</sup>	1	10,3	10,1	0,2	2,1	10,1	10,0	0,1	1,0	10,0 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,5
				2	9,9				10					
				3	10,0				9,9					
		2		1	10,0	9,9	0,1	1,0	9	9,2	0,7	7,4	9,6 $\pm$ 0,6	
				2	9,8				8,7					
				3	9,9				10					
1	1	контроля <sup>2</sup>	1*	6,0	5,9	0,1	1,0	5,9	6,0	0,2	2,9	6,0 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,1	
			2*	5,9				6,2						
			3*	5,9				5,9						
	2		1*	5,9	5,9	0,1	1,7	6,0	5,9	0,2	3,9	5,9 $\pm$ 0,2		
			2*	6,0				5,6						
			3*	5,8				6,0						

Определение/ планшет	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)			
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$					
2/1 планшет	1	для оценки содержания АПК	4	49,9	50,6	2,6	5,1	49,0	50,7	3,2	6,3	50,6 $\pm$ 2,6	50,7 $\pm$ 2,3		
			5	48,4				54,3							
			6	53,4				48,7							
	2		4	48,5	50,9	3,0	5,8	48,9	50,5	1,8	3,5			50,7 $\pm$ 2,2	
			5	50,0				52,4							
			6	54,2				50,3							
	1	контроля <sup>1</sup>	4	10	10,0	0,5	4,5	10,6	10,5	0,5	4,4	10,3 $\pm$ 0,5	10,1 $\pm$ 0,5		
			5	10,5				10,9							
			6	9,6				10							
			2	4	10	10,0	0,2	1,5	9,8	10,1	0,8			8,3	10,0 $\pm$ 0,6
				5	9,8				9,4						
				6	10,1				11						
1	контроля <sup>2</sup>	4*	5,9	6,0	0,2	2,9	5,9	6,0	0,2	2,5	6,0 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,1			
		5*	5,9				6,0								
		6*	6,2				6,2								
		2	4*	6,0	6,1	0,1	1,0	5,9	6,0	0,1			1,7	6,0 $\pm$ 0,1	
			5*	6,1				6,0							
			6*	6,1				6,1							

Определение/ планшет	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)		
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$				
2/2 планшет	1	для оценки содержания АПК	4	54,3	51,1	1,8	3,6	51,9	51,1	0,5	1,0	51,1 $\pm$ 1,3	51,1 $\pm$ 1,2	
			5	49,4				50,4						
			6	49,9				50,9						
	2		4	51,2	51,1	1,3	2,5	52,9	51,3	1,1	2,2	51,2 $\pm$ 1,2		
			5	48,6				51,9						
			6	52,0				49,5						
	1	контроля <sup>1</sup>	4	9,8	9,9	0,2	1,5	9,9	9,9	0,1	1,0	9,9 $\pm$ 0,1	10,1 $\pm$ 0,4	
			5	9,9				9,8						
			6	10,1				10,0						
			2	4	10,8	10,4	0,5	4,4	10,7	10,1	0,6	5,5		10,3 $\pm$ 0,5
				5	10,5				9,8					
				6	9,9				9,7					
1	контроля <sup>2</sup>	4	6,3	6,1	0,3	4,1	6,0	6,0	0,1	1,7	6,0 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,2		
		5	6,1				6,1							
		6	5,8				5,9							
		2	4	5,8	6,0	0,2	3,5	6,0	5,9	0,2	3,5		6,0 $\pm$ 0,2	
			5	5,9				5,7						
			6	6,2				6,1						

Определение/ планшет	Оператор	Компонент...	Номер образца	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (кинетический тест)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл (тест по конечной точке)			RSD, %	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (для обоих тестов)		
				Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$		Значение	Среднее значение $\bar{x}$	Стандартное отклонение $S_x$				
2/3 планшет	1	для оценки содержания АПК	4	52,0	51,1	0,9	1,7	50,9	51,1	0,2	0,4	51,1±0,6	51,2±0,5	
			5	50,3				51,3						
			6	50,9				51,0						
	2		4	51,6	51,5	0,6	1,1	50,8	51,1	0,4	0,8	51,3±0,5		
			5	50,9				51,0						
			6	52,0				51,6						
	1	1	контроля <sup>1</sup>	4	9,9	10,0	0,2	1,5	10,1	10,2	0,2	2,0	10,1±0,2	10,1±0,2
				5	10,0				10,4					
				6	10,2				10,0					
		2		4	10,3	10,2	0,1	1,0	9,9	10,1	0,2	2,1	10,2±0,2	
				5	10,2				10,3					
				6	10,1				10,2					
1	1	контроля <sup>2</sup>	4	5,9	6,0	0,1	1,9	5,8	6,0	0,2	2,6	6,0±0,1	6,0±0,1	
			5	5,9				6,0						
			6	6,1				6,1						
	2		4	6,2	6,1	0,1	1,9	6,0	6,1	0,1	1,0	6,1±0,1		
			5	6,0				6,1						
			6	6,0				6,1						

Примечания.

1 – после восстановления в 1,0 мл воды очищенной.

2 – после восстановления в 2,0 мл воды очищенной

Таблица 50- Содержание активатора прекалликреина в компонентах СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином) (ОСО 42-28-446) (серия 1)

Наименование компонента	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл ( $p=0,95$ )			Коэффициент вариации, процент
	Кинетический тест	Тест по конечной точке	Общее	
Для оценки содержания АПК	50,9±0,9	51,0±1,0	51,0±0,9	1,9
Контроль содержания АПК (при восстановлении в 1,0 мл)	10,2±0,4	10,1±0,6	10,1±0,5	5,0
Контроль содержания АПК (при восстановлении в 2,0 мл)	6,0±0,2	6,0±0,1	6,0±0,2	2,7

Учитывая возможную дополнительную активацию АПК в условиях повышенных температур хранения, ускоренные тесты для установления срока годности СО не проводили. Аналогичным образом устанавливается стабильность свойств международного и фармакопейного СО активатора прекалликреина в альбумине. Для этих СО рекомендованный температурный режим хранения – не выше минус 20 °С. 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) (таблицы 51, 52).

Таблица 51 – Содержание активатора прекалликреина в компонентах стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина»

Наименование компонента СО	Содержание активатора прекалликреина на ... месяц хранения, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл ( $p=0,95$ )					
	1	2	3	6	9	12
Для оценки содержания АПК	49,6±3,1	51,0±4,0	51,1±3,6	50,6±2,1	51,1±2,2	50,9±1,6
Контроль	10,7±1,6	9,9±1,7	10,2±1,5	10,6±1,2	10,1±1,4	10,1±1,8
	6,1±1,3	6,0±1,8	6,0±0,9	5,9±1,3	6,2±1,2	6,0±0,9

Таблица 52 – Содержание активатора прекалликреина в компонентах стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином)

Наименование компонента СО	Содержание активатора прекалликреина на ... месяц хранения, $\bar{x} \pm S_x$ , МЕ/мл (p= 0,95)					
	1	2	3	6	9	12
Для оценки содержания АПК	49,6 $\pm$ 2,1	51,0 $\pm$ 1,8	51,1 $\pm$ 3,4	50,6 $\pm$ 0,1	51,1 $\pm$ 2,3	50,9 $\pm$ 0,6
Контроль	10,7 $\pm$ 1,3	9,9 $\pm$ 1,5	10,2 $\pm$ 1,9	10,5 $\pm$ 1,2	10,4 $\pm$ 1,3	10,1 $\pm$ 1,6
	6,0 $\pm$ 1,7	6,0 $\pm$ 1,2	6,1 $\pm$ 0,9	5,9 $\pm$ 1,6	6,1 $\pm$ 1,2	6,1 $\pm$ 0,6

## **7.2. Исследования по унификации порядка обеспечения воспроизводимости результатов, получаемых при контроле качества отечественных препаратов крови человека по показателям специфической безопасности**

### **7.2.1. Обоснование принципов обеспечения воспроизводимости результатов испытаний лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека 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 показателям; 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 21).

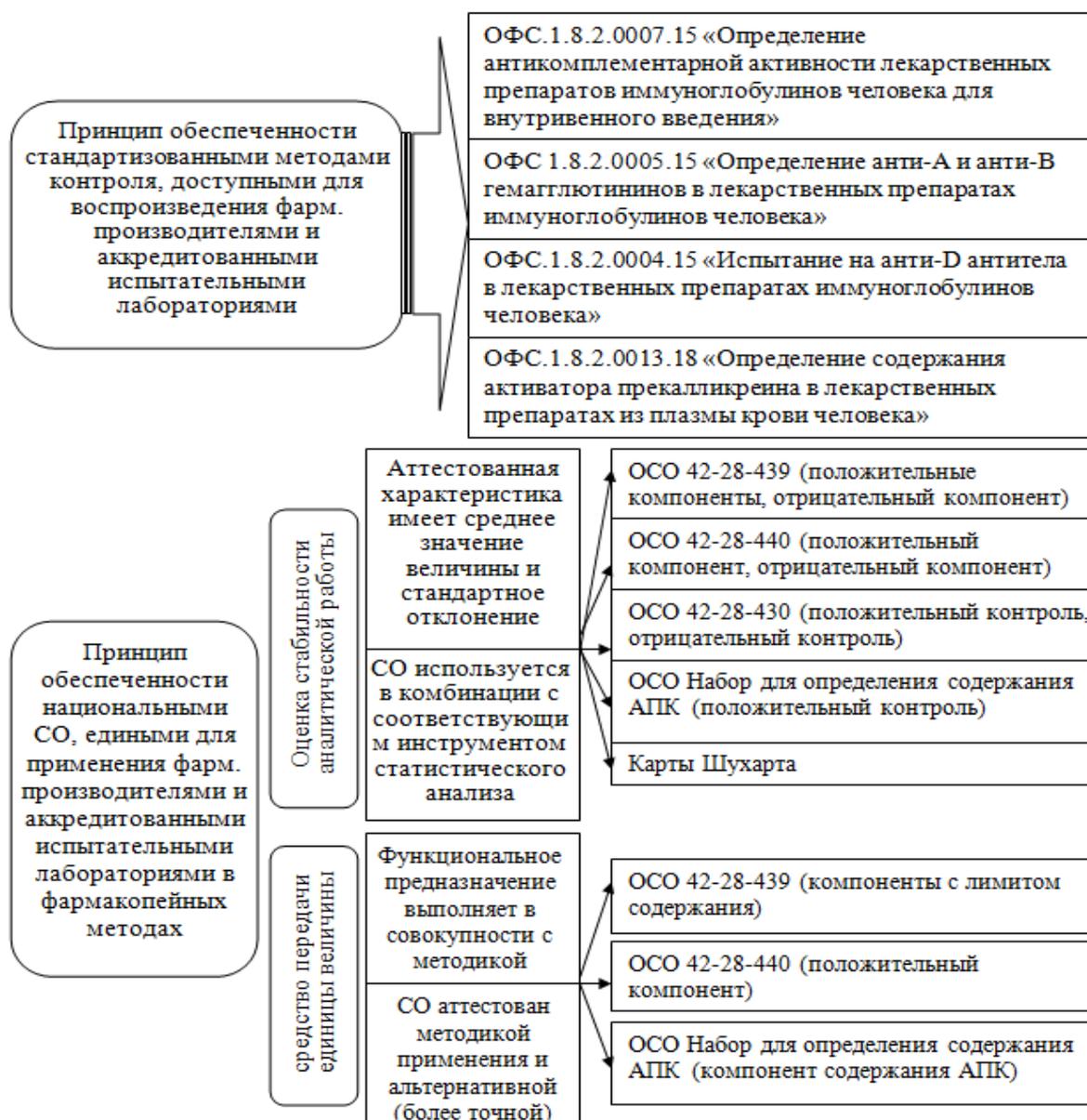


Рисунок 21 – Принципы обеспечения воспроизводимости результатов испытаний ЛП ИГЧ и АЧ по показателям специфической безопасности

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, поэтому в дальнейших исследованиях нами были установлены подходы к решению задачи оценки воспроизводимости результатов испытаний.

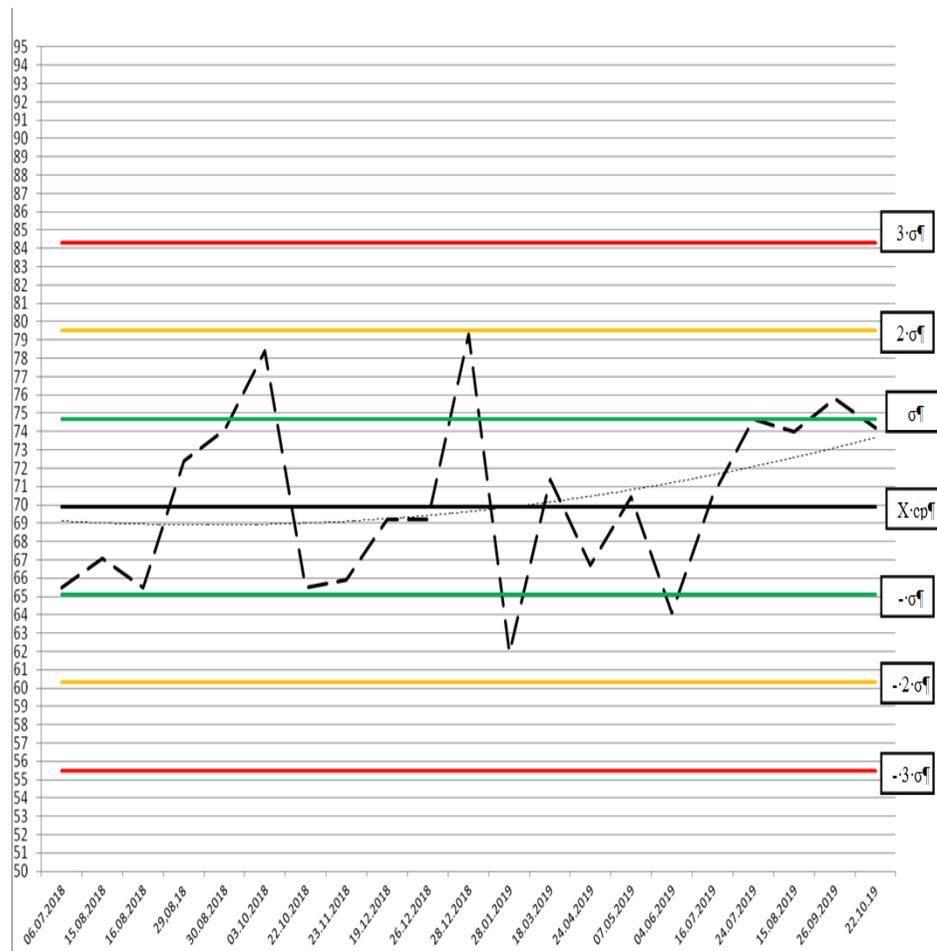
### **7.2.2. Экспериментальные исследования по подтверждению стабильности аналитической работы.**

В дальнейших исследованиях нами показана 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, Шухарта), позволяет оценивать воспроизводимость результатов, а также выявлять причины изменений и оперативно их устранять [49].

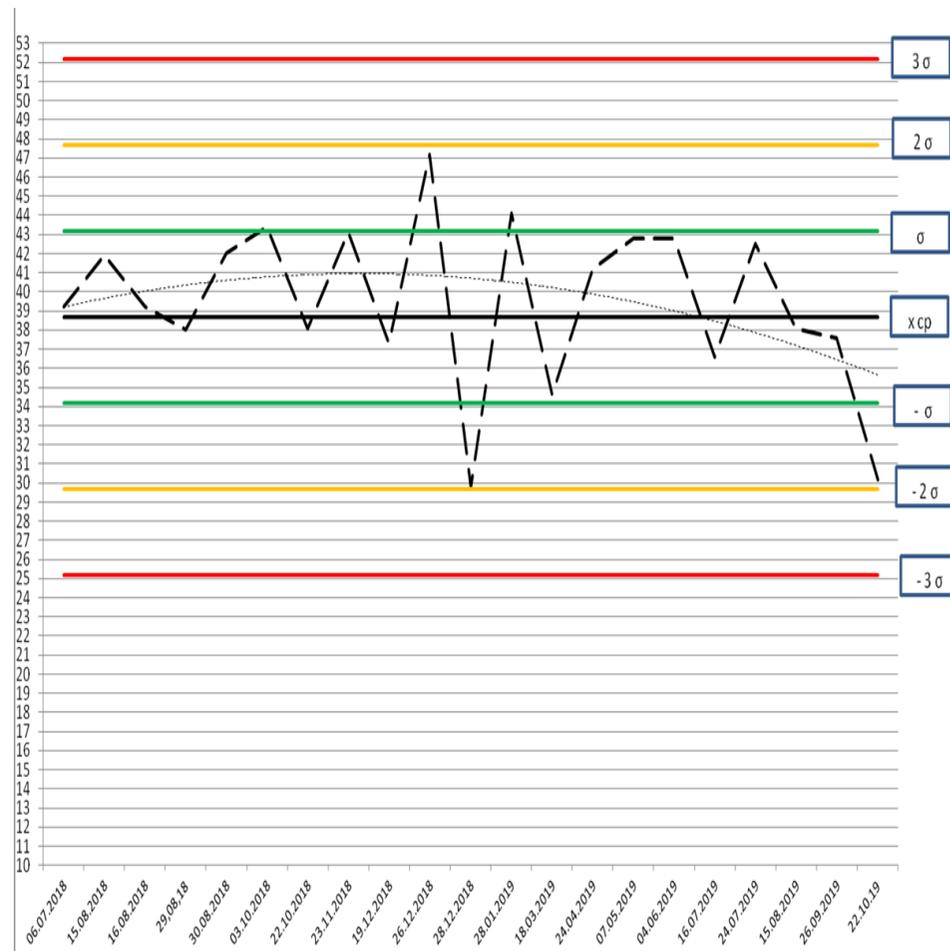
В специализированной лаборатории ИЦЭК МИБП нами внедрена система оперативного контроля за процессом испытаний с использованием СО «Иммуноглобулина человека» (ОСО 42-28-430) и карт Шухарта (Рисунок 22).

Методология применения СО при выполнении испытаний позволяет оценивать воспроизводимость результатов, полученных с использованием как одного образца СО на протяжении 14 суток его годности к применению после вскрытия, так и разных образцов одной серии.

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 трендов, связанных с их влиянием на воспроизводимость результатов анализа.



(A)



(B)

Рисунок 22 – Контрольные карты для оценки стабильности аналитической работы в испытаниях по показателю «Антикомплементарная активность» с использованием (А) - положительного компонента, (В) – отрицательного компонента СО 42-28-430-2018.

Однако, учитывая приближение к верхней и нижней границам поля допуска при выполнении испытаний в декабре был проведен анализ вероятных причин и установлено влияние серии реагента кровь баранья, которая была исключена из применения.

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 с доверительной вероятностью 0,95. Принципы оценки контрольных карт с получаемыми результатами аналогичны испытаниям по определению антикомплементарной активности.

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 7

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

2. 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).

3. 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.

## **ГЛАВА 8. РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА**

### **8.1. Разработка принципов экспертной оценки специфической безопасности лекарственных препаратов из плазмы крови человека.**

Для минимизации риска развития возможных нежелательных эффектов при применении к препаратам крови человека предъявляют высокие требования специфической безопасности. Специфическая безопасность препаратов крови человека - это фактор, характеризующий риски причинения вреда здоровью при их применении, обусловленные влиянием на системы гемостаза и комплемента, калликреин-кининовую систему и эритроцитарное звено системы гомеостаза. Экспертную оценку специфической безопасности препаратов крови осуществляют в первую очередь в рамках их государственной регистрации. Экспертиза препаратов крови является многогранным процессом, затрагивающим как анализ соответствующих аспектов фармацевтической разработки, технологического процесса производства лекарственного препарата, так и оценку предложенных заявителем методов контроля качества лекарственного препарата [42].

Методология экспертизы специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ складывается из научно-обоснованных принципов и критериев экспертной оценки, распространяющихся на следующие составляющие экспертизы которые соответствуют государственным стандартам проведения экспертной работы:

- 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 [38].

Для оптимизации процесса экспертизы и получения адекватной оценки специфической безопасности препаратов крови нами разработаны основные принципы её проведения.

1. Принцип презумпции потенциальной опасности, связанной с негативным влиянием на системы гемостаза, комплемента, калликреин-кининовую, эритроцитарное звено гомеостаза

Экспертиза ЛП ИГЧ и АЧ, как и других ЛП из ПКЧ должна основываться на допущении того факта, что все препараты крови человека обладают тем или иным свойством, обуславливающим при введении пациенту развитие нежелательных реакций, связанных с влиянием на системы гемостаза, комплемента и/или калликреин-кининовую. Наличие этих свойств связано с особенностями фармацевтической субстанции, невозможностью на этапах технологического процесса полностью исключить контаминацию готовой формы препарата остаточными количествами «нецелевых» белков плазмы крови, возможностью конформационных изменений «целевых» белков в процессе производства и/или хранения, а также нецелесообразностью в отношении некоторых свойств белков, например, иммуноглобулинов G, полностью исключать влияние на систему комплемента.

2. Принцип комплексности экспертной оценки.

В ходе экспертизы должны оцениваться как технологические аспекты разработки, так и качество готовой формы с точки зрения обеспечения специфической безопасности препарата.

3. Принцип адекватности контроля специфической безопасности в соответствии с группировочной принадлежностью препарата.

В ходе экспертизы должна оцениваться обоснованность выбранных факторов потенциальной опасности, связанной с негативным влиянием на системы гемостаза, комплемента и калликреин-кининовую, и наличие соответствующих показателей качества в спецификации на препарат.

4. Принцип научной обоснованности и объективности оценки специфической безопасности препаратов крови.

Экспертная оценка должна учитывать:

- обоснованность регламентированного в нормативной документации предельного содержания «нецелевых» белков плазмы крови (например, гемагглютининов, анти-D антител, активатора прекалликреина и т.д.) или конформационно измененных «целевых» белков (например, полимеров и агрегатов). Нормативные требования должны соответствовать российским (при наличии) или международным стандартам качества на соответствующие препараты;

- обоснованность использования методики определения. При использовании производителем для контроля качества препарата фармакопейной методики определения обязательно наличие материалов по её верификации. При использовании производителем собственной методики, в ходе экспертизы должна быть установлена обоснованность замены фармакопейной методики и адекватность предложенной методики на основании материалов по валидации;

- стандартизованность использованной методики определения, которая должна быть достигнута применением СО различной квалификации (международные, ЕФ, национальные (отраслевые) или стандартные образцы предприятия). В ходе экспертизы должна быть установлена обоснованность применения стандартных образцов.

5. Принцип соблюдения баланса между уровнем специфической безопасности препаратов крови человека с их терапевтической эффективностью.

Экспертная оценка должна учитывать взаимосвязь между значениями критериев специфической безопасности препаратов и эффективностью препарата при клиническом применении.

6. Принцип законности заключения о специфической безопасности препарата.

Экспертная оценка должна учитывать современные законодательные акты, государственные стандарты, научные разработки и международный опыт в области производства, контроля качества и применения препаратов крови человека.

## **8.2. Обоснование критериев экспертной оценки специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека**

В качестве критериев экспертной оценки специфической безопасности препаратов крови человека установлены критерии, применимые при оценке материалов регистрационного досье в части описания фармацевтической разработки, технологического процесса, выбора показателей и методов контроля готовой формы препарата, а также оценки качества образцов по этим показателям:

1) технологические аспекты обеспечения специфической безопасности препаратов крови.

Значение критерия зависит от группировочной принадлежности препарата и его лекарственной формы:

- для препаратов альбумина выбор стабилизатора, обеспечивающего стабильность мономерной формы молекулы альбумина и т.д.

- для препаратов иммуноглобулинов человека технология может включать скрининг доноров по групповой и резус-принадлежности и формирование котловой загрузки с учетом максимального содержания гемагглютининов и анти-Дантител, отделение криопреципитата и коагулирующих факторов, обработку ферментами, хроматографическую очистку, обработку октановой кислотой,

выбор стабилизатора, обеспечивающего стабильность мономерной формы молекулы иммуноглобулина, и т.д.

2) показатели качества, характеризующие специфическую безопасность готовой формы препарата.

Значение критерия зависит от группировочной принадлежности препарата крови и его лекарственной формы:

- для препаратов альбумина человека – «Активатор прекалликреина», «Полимеры и агрегаты»;

- для препаратов иммуноглобулинов человека (раствор для внутривенного введения, раствор для инфузий) – «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Антикомплементарная активность», «Анти-D антитела», «Активатор прекалликреина», «Молекулярные параметры»;

- для препаратов иммуноглобулинов человека (раствор для подкожного введения) – «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-D антитела», «Молекулярные параметры»;

Для оценки тромбогенного потенциала препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения применимо на этапах фармацевтической разработки изучение готовой формы в тесте генерации тромбина, изучение содержания в препарате таких примесей, как факторы свертывания кровипротромбинового комплекса (II, VII, IX, X, XI) и их активированные формы, а также влияние препарата на изменение неактивированного частичного тромбопластинового времени стандартной (нормальной) плазмы человека.

3) методики определения показателей специфической безопасности препаратов крови, их валидация/верификация.

Значение критерия должно соответствовать российским (при наличии) и международным стандартам качества. Для определения содержания активатора прекалликреина допустимо применять хромогенный метод в соответствии с ОФС.1.8.2.0013.18 «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека». Определение содержания гемагглютининов и анти-D антител необходимо проводить в соответствии с

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-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека» а антикомплементарную активность в соответствии с ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения». Допустимо применение фармакопейных методов испытаний для зарубежных производителей. Учитывая сопоставимость результатов, установленную при разработке отечественных методик, целесообразно рекомендовать возможность применения методов, включенных в ГФ РФ, в качестве альтернативных для контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ зарубежного производства по показателям специфической безопасности.

Валидация методик определения показателей специфической безопасности, которые по типу аналитической процедуры относятся к количественным испытаниям на примеси, должна быть проведена по критериям правильности (точности), прецизионности (сходимость (повторяемость), внутрилабораторная прецизионность), специфичности, предела количественного определения, линейности и диапазона применения. Верификация должна подтверждать на основании экспериментальных данных, что фармакопейная методика применима для контроля качества препарата. Основанием для этого является отсутствие неприемлемого ухудшения правильности, линейности и прецизионности методики.

4) количественная оценка показателей специфической безопасности.

Значение критерия зависит от группировочной принадлежности препарата и его лекарственной формы.

Препараты альбумина человека:

- содержание активатора прекалликреина не более 35 МЕ/мл,
- содержание полимеров и агрегатов не более 5,0 %.

Препараты иммуноглобулинов человека:

- агглютинация А и В эритроцитов должна отсутствовать в разведении препарата 1:64,
- допустимый предел связывания комплемента должен быть не более 1  $CH_{50}$ /мг белка,
- содержание анти-D антител должно быть не более, чем в положительном стандартном образце,
- содержание активатора прекалликреина не более 35 МЕ/мл,
- содержание полимеров и агрегатов не более 3 % (для препаратов для внутривенного введения, для инфузий), не более 10 % (для препаратов для подкожного введения),
- максимальное количество тромбина в тесте генерации тромбина не более 350 нМоль, латентный период (лаг-фаза) генерации тромбина не менее 11 мин, период образования максимального количества тромбина не менее 19 мин;
- активность фактора XIa не более 10 мМЕ/мл, факторов II, VII, IX, X и калликреина менее 50 мМЕ/мл;
- неактивированное частичное тромбопластиновое время (значение критерия - время образования сгустка в стандартной (нормальной) плазме человека должно быть более 150 сек.

Таким образом, проведенные теоретические исследования позволили на основании обоснованных принципов и критериев разработать «Методические рекомендации по экспертной оценке специфической безопасности препаратов крови человека» (Приложение Г) [73], которые внедрены в деятельность ФГБУ «НЦЭСМП» и позволяют экспертам адекватно оценивать специфическую безопасность препаратов крови человека. Полученные результаты также использованы при разработке «Руководства по экспертизе лекарственных препаратов крови» (Приложение Д) [74].

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 8

1. Разработаны принципы и обоснованы критерии экспертной оценки специфической безопасности ЛП ИГЧ и АЧ. Установлена целесообразность рекомендовать возможность применения методов, включенных в ГФ РФ, в качестве альтернативных для контроля качества ЛП ИГЧ и АЧ зарубежного производства по показателям специфической безопасности.

2. 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.

3. Результаты исследований использованы при разработке «Руководства по экспертизе лекарственных препаратов крови», устанавливающего общую методологию экспертизы этой группы препаратов.

## 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 (плазмы для фракционирования) 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-Д 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-Д 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.

## ОБЩИЕ 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 СН<sub>50</sub>/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 сокращений и условных обозначений**

АКА	-	антикомплементарная активность
АПК	-	активатор прекалликреина
АТШ	-	антитромбин Ш
АЧ	-	альбумин человека
ГА	-	гемагглютинины
ГФ	-	Государственная фармакопея
ЕФ	-	Европейская фармакопея
ЕМА		Европейское медицинское агенство
ИГЧ	-	иммуноглобулины человека
ИЦЭК МИБП		Испытательный центр экспертизы качества МИБП
ЛП	-	лекарственные препараты
ЛС	-	лекарственные средства
МЕ	-	международные единицы
МИБП		медицинские иммунобиологические препараты
НАЧТВ	-	неактивированное частичное тромбопластиновое время
НГА	-	непрямая гемагглютинация
НД	-	нормативная документация
НПО	-	научно-производственное объединение
НР	-	нежелательные реакции
ОСО		отраслевой стандартный образец
ОФС	-	общая фармакопейная статья
ПГА	-	прямая гемагглютинация
ПКЧ	-	плазма крови человека
СО	-	стандартный образец

СПК		станция переливания крови
ФГБУ «НЦЭСМП»		федеральное государственное 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
CBER		Центр оценки и исследования биологических препаратов (The Center for Biologics Evaluation and Research)
HLA	-	human leukocyte antigens
IgG	-	иммуноглобулины класса G
IgM	-	иммуноглобулины класса M
IgA	-	иммуноглобулины класса A
NIBSC	-	Национальный институт биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control)
WHO	-	Всемирная организация здравоохранения (World Health Organization)
A		оптическая плотность
Mo	-	мода
p	-	доверительная вероятность
Rh(+)	-	резус-положительный
Rh(-)	-	резус-отрицательный
$S_x$	-	стандартное отклонение от среднего значения
$\bar{x}$	-	среднее арифметическое значение
$\Delta A/\text{мин}$		скорость изменения оптической плотности в мин

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аверченков, В.М. Внутривенные иммуноглобулины: механизмы действия и возможности клинического применения / В.М. Аверченков, И.С. Палагин // Клин. микробиол. антимикроб. химиотерапия – 2004. – Т. 6. – № 3. – С. 273-281.
2. Алсынбаев, М.М. Социально-ориентированная система возмещения затрат на препарат внутривенного иммуноглобулина в США (литературный обзор) / М.М. Алсынбаев, А.Г. Исрафилов, Г.Б. Кудашева, и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. XIV. – № 1. – С. 159-163.
3. Анастасиев, В.В. Иммуноглобулин для внутривенного введения / В.В. Анастасиев. – Нижний Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2000. – 168 с.
4. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Государственное издательство медицинской литературы, 1962. – 180 с.
5. Бондарев, В.П. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов / В.П. Бондарев, И.В. Борисевич, Р.А. Волкова, и др. // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. – № 2 – С. 28-32.
6. Бочкарева, С.С. Оптимизация параметров иммунологической безопасности и специфической активности жидкой формы препарата «Габриглобин-IgG»: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.03.09, 03.01.06 / Бочкарева Светлана Сергеевна. – М., 2012. – 23 с.
7. 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.

8. Валидация аналитических методик: ОФС.1.1.0012.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
9. Валидация аналитических методик: пер.с англ.яз. 2-го изд. под ред. Г.Р. Нежиховского. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: пер.с англ.яз. 3-го изд.под ред. Р.Л. Кадиса. Руководства для лабораторий. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2016. – 312 с.
10. Волкова, Р.А. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, В.И. Климов [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.- 2016.- Т.16, 4. - С.229 - 36.
11. Волкова, Р.А. Опыт Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича по разработке и аттестации медицинских иммунобиологических препаратов / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, А.А. Мовсисянц, и др. // Стандартные образцы. – 2011. – № 4. – С. 17-21.
12. Воронкова, Г.М. Иммунотерапия клещевого энцефалита препаратами антител / Г.М. Воронкова, Т.А. Захарычева, С.П. Николаева, и др. – Хабаровск. – Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 2005. – 92 с.
13. Высокоэффективная жидкостная хроматография: ОФС.1.2.1.2.0005.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
14. Генералов, И.И. Получение высокоочищенных иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови человека / И.И. Генералов, А.М. Моисеева, С.В. Жерулик, и др. // Вестник фармации. – 2009. – Т. 46. – № 4. – С. 52-60.
15. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

- 16.ГОСТ 8.315-97 ГСИ. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. – М.: Изд-во стандартов, 2004. – 23 с.
- 17.ГОСТ Р 8.691-2010 (ISO Guide 31:2000, MOD) ГСИ. Стандартные образцы материалов (веществ). Общие требования к паспортам и этикеткам. – М.: Стандартиформ, 2012. – 15 с.
- 18.ГОСТ Р 8.753–2011 ГСИ. Стандартные образцы материалов (веществ). Основные положения. – М.: Стандартиформ, 2013. – 14 с.
- 19.Государственная фармакопея Республики Беларусь, 1-е изд. – Минск: УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», 2006. – 1345 с.
- 20.Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] URL: <http://grls.rosminzdrav.ru>.
- 21.Евченко, Т.А. Комплексная оценка комплементсвязывающей способности внутривенных иммуноглобулинов: дис. ... канд. биол. наук: 14.00.36 / Евченко Татьяна Анатольевна. – Уфа, М., 2000. – 117 с.
- 22.Жибурт, Е.Б. Трансфузиология: учебник. - СПб: Питер, 2002.
- 23.Жибурт, Е.Б, Особенности национального определения антител к эритроцитам / Е.Б. Жибурт, А.В. Караваев, С.Р. Мадзаев, М.Н. Губанова // Вестник Росздравнадзора -2012. - № 4. - С. 61-63.
- 24.Иммуноглобулин для внутривенного введения в терапии инфекционных и аутоиммунных заболеваний / под ред. В.В. Анастасиева. – Нижний Новгород, 1998. – 40 с.
- 25.Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения: ФС.3.3.2.0008.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
- 26.Иммуноглобулин человека нормальный: ФС.3.3.2.0007.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>.

27. Иммуноглобулины человека: ОФС.1.8.1.0003.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
28. Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека: ОФС.1.8.2.0004.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
29. Исрафилов, А.Г. Изучение условий предупреждения агрегации и снижения димеризации иммуноглобулина при температурной обработке / А.Г. Исрафилов, А.Г. Лютов, И.А. Корнилова, и др. // Клиническая фармакология и терапия. – 1994. – № 4. – С. 171-173.
30. Исрафилов, А.Г. Различные точки зрения на безопасный уровень антикомплементарной активности внутривенных иммуноглобулинов / А.Г. Исрафилов, Л.К. Лаптева, Э.Ю. Кудашева // Материалы Всероссийской научной конференции «Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение». – 2005. – Ч. 2. – С. 172-178.
31. Казмирчук, В.Е. Иммуноглобулинотерапия: эффективность и безопасность / В.Е. Казмирчук, Д.В. Мальцев // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2009. – Т. 29. – № 10. – С. 30-38.
32. Карякин, А.В. Препараты крови человека / А.В. Карякин, Т.М. Каргина, Е.И. Саканян и др. // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2015. - № 3. - С. 47 - 52.
33. Киселева, И.А. Метод определения антикомплементарной активности в препаратах иммуноглобулина / И.А. Киселева, Г.В. Тимофеева // Гематология и трансфузиология. – 1986. – №4. – С. 54-57.
34. Киселева, И.А. Определение антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов: Методические рекомендации МЗ РСФСР / И.А. Киселева, А.А. Анастасиев, В.В. Немов, и др. – Горький. 1988. – 12 с.

35. Кондратенко, И.В. Внутривенные иммуноглобулины, что и когда? (Лекция) / И.В. Кондратенко, А.Л. Заплатников, А.А. Бологов // Детская больница. – 2010. – № 4. – С. 56-60.
36. 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. – № 2. – С. 43-46.
37. 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.
38. 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.
39. 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. – 19. - №5. – С. 513-520.
40. 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, А.К. Яковлев, Ю.В. Олефир // Химико-фармацевтический журнал. - 2020. – 54 (3). - С. 61-64
41. 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 др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53. - № 3. – С. 53-57.
42. 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.
43. Корнилова, О.Г. Стандартизация метода определения содержания гемагглютининов в препаратах иммуноглобулинов человека в России / О.Г. Корнилова, А.В. Нечаев, И.В. Борисевич, и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 55. - № 11. – С. 57-60.
44. 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.
45. Корнилова, О.Г. Технологические особенности обеспечения специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека / О.Г. Корнилова, Э.Ю. Кудашева, М.А. Кривых, и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. - № 5. – С. 56-59.
46. Корнилова, О.Г. Изучение возможности увеличения срока годности стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплемментарной активности / О.Г. Корнилова, М.А. Кривых, Е.А. Хуснатдинова [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – 17(2). – С.110-115
47. 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.

48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.

- 54.Кривых, М.А. Достоверность значений антикомплементарной активности – гарантия специфической безопасности иммуноглобулинотерапии / М.А. Кривых, О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян // Материалы Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Достижения современной фармакологической науки». – 2015. – С.166-169.
- 55.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, Н.Д. Бунятян, Ю.В. Олефир // Фармация. 2020. 69(3). С.36-44
- 56.Кривых, М.А. Разработка стандартного образца для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.02 / Кривых Максим Андреевич. – М., 2016. – 133 с.
- 57.Кривых, М.А. Разработка фармакопейной методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека / М.А. Кривых, О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян, и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. - Т. 50 – № 5. – С. 47-49.
- 58.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
- 59.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
- 60.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

- 61.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.
- 62.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.
- 63.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.
- 64.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.
- 65.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.
- 66.Кудашева Э.Ю., Олефир Ю.В., Иванов В.Б., Борисевич И.В., Бондарев В.П. Современный профиль качества, эффективности и безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения // Российский иммунологический журнал. - 2016. - Т. 10 (19), № 2 (1). - С. 341 - 343.
- 67.Кузнецова, И.В. Экспериментальные модели венозного тромбоза и возможность применения клеточных технологий для коррекции тромбических состояний / И.В Кузнецова, А.И. Шевела, В.В. Морозов, и др. // Флебология – 2012. – Т. 1. – С. 43-47.

68. Латышева, Т.В. Принципы заместительной терапии внутривенными иммуноглобулинами / Т.В. Латышева // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 3. – С. 58-62.
69. Лютов, А.Г. О безопасности и клинической эффективности Габриглобина – отечественного иммуноглобулина для внутривенного введения / А.Г. Лютов, Е.В. Мостовская, А.К. Денисов, и др. // Педиатрия. – 2008. – Т. 87. – № 3. – С. 73-78.
70. Методические рекомендации по определению групповых веществ крови в препаратах и полуфабрикатах иммуноглобулинов и альбумина. – М.: Главное управление по производству бактериальных и вирусных препаратов министерства здравоохранения СССР, 1981. – 18 с.
71. Мигунов, В.Н. Антикомплементарная активность мономерных форм иммуноглобулина для внутривенного введения / В.Н. Мигунов, В.А. Кузьмичев, Л.Н. Сарафанова, и др. // Актуальные вопросы медицинской биотехнологии: труды Томского НИИВ. – Томск, 1992. – С. 49.
72. Миронов А.Н., Меркулов В.А., Бондарев В. П., Борисевич И.В., Иванов В.Б., Кудашева Э.Ю., Яворский А.Н., Кошечкин К.А. Современный арсенал препаратов крови в России // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Специальный выпуск. - 2015. - Т. 13. - С. 106 - 107.
73. Научное обоснование и разработка методологии экспертизы качества, эффективности и безопасности препаратов крови : отчет о НИР (промежуточ.) / ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России ; рук. Бондарев В.П., Борисевич И.В. ; исполн.: Иванов В.Б., Кудашева Э.Ю. [и др.]. М., 2015. 823 с. Библиогр.: с. 568 – 620. № ГР 115111740010. Деп. в ЦИТИС 16.02.2016. № ИКРБС 216021650029.
74. Научное обоснование и разработка методологии экспертизы качества, эффективности и безопасности препаратов крови: отчет о НИР (заключ.) / ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; рук. Бондарев В.П., Борисевич И.В.; исполн.: Иванов В.Б., Кудашева Э.Ю. [и др.]. М., 2017. - 1260 с. - Библиогр.:

с. 434 - 473. № ГР 115111740010. Деп. в ЦИТИС 18.01.2018. № ИКРБС АААА-Б18-218011890074-9.

75. Определение активности факторов свертывания крови: ОФС.1.8.2.0003.15// Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
76. Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека: ОФС 1.8.2.0005.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
77. Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека: ОФС.1.8.2.0007.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
78. Определение антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения: Методические указания. МУК 3.3.2.1063-01. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001. – 16 с.
79. Определение белка: ОФС.1.2.3.0012.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: <http://pharmacopoeia.ru/russian-pharmacopoeia/>
80. Определение ЕТР – компонент рутинного протокола? [Электронный ресурс] URL: [www.siemens.com/diagnostics](http://www.siemens.com/diagnostics)
81. Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека: ОФС.1.8.2.0013.18 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. [Электронный ресурс] URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopoea.php/>
82. Оприщенко, С.А. Лечебные препараты крови в современной медицине / С.А. Оприщенко, В.В. Захаров, В.М. Русанов – М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2011. – 328/

83. Патент 2682714, Российская Федерация, МПК А61К 39/395 (2006.01) Стандартный образец содержания анти-D антител в препаратах иммуноглобулинов человека [текст] / Корнилова О.Г., Кудашева Э.Ю., Нечаев А.В., Стручкова И.Н., Борисевич И.В.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. № 2017144239; заявл. 18.12.2017; опубл. 21.03.2019, Бюл. № 9. 18 с.
84. 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 / Кривых М.А., Корнилова О.Г., Кудашева Э.Ю.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. № 2015104120/15; заявл. 09.02.2015, опубл. 20.03.2016, Бюл. № 8. 12 с.
85. Патент № 2671415, Российская Федерация, МПК G01N 33/53 (2006.01). Стандартный образец содержания анти-A и анти-B гемагглютининов в препаратах крови человека / Корнилова О.Г., Кудашева Э.Ю., Нечаев А.В., Борисевич И.В.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. № 2017119536; заявл. 05.06.2017; опубл. 31.10.2018, Бюл. № 31. 32 с.
86. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 13 февраля 2013 г. № 66 «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации» [Электронный ресурс]  
URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70217532/#ixzz6B7yxMzJD>
87. Приказ Министерства промышленности и торговли РФ от 23 октября 2009 г. № 965 «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года». [Электронный ресурс] URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/4089282/>

88. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 N 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» [Электронный ресурс] URL: <http://www.consultant.ru/>
89. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации. М.: — Издательство «Спорт и Культура - 2000», 2007. - 192 с.
90. Румянцев, А.Г. Основные свойства внутривенных иммуноглобулинов и показания к их применению / А.Г. Румянцев // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2011. – Т. 10. – № 2. – С. 39-50.
91. Соловьев, С.К. Внутривенный иммуноглобулин в ревматологической практике / С.К. Соловьев // Специальный выпуск. Доктор.Ру. – 2012. – № 2(70). – С. 63-66. [Электронный ресурс] URL: [http://www.pharmapf.ru/downloads/Doctor\\_ru\\_chel\\_i\\_lek\\_2012.pdf](http://www.pharmapf.ru/downloads/Doctor_ru_chel_i_lek_2012.pdf).
92. Сонин, Д.Л. Экспериментальные модели венозного тромбоза на мелких лабораторных животных / Д.Л. Сонин, Н.Н. Петришев, А.И. Тюкавкин, и др // Региональное кровообращение и микроциркуляция. - 2014. - Т 13. - №2 (50). - С. 11-20.
93. Справочник по лабораторной диагностике. Гемостаз. Справочное пособие для врачей. - Ростов-на-Дону: ООО «АстроМЕД», 2014. – 100 с.
94. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения: ОСТ 91500.05.001-00 // Бюллетень нормативных актов Федеральных органов исполнительной власти от 2001 г., N 49.
95. Стригин, В.А. Неспецифические свойства препаратов иммуноглобулинов / В.А. Стригин, А.П. Тернова. – М.: «Медицина», 1979. – С. 16-23.
96. Супотницкий, М.В. Стандартные образцы иммунобиологических лекарственных препаратов как объекты интеллектуальной собственности / М.В. Супотницкий, А.Н. Миронов, А.А. Елапов, и др. // Ведомости

Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. – № 3. – С. 36-39.

97. Томилин, М.В. Валидация метода определения содержания активатора прекалликреина в препарате Альбумин человека / М.В. Томилин, Е.В. Филатова, М.М. Кузнецова, и др. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017 - 17(1). – С. 59–64.
98. Фармконтракт. Производство препаратов плазмы донорской крови человека [Электронный ресурс] URL:<http://phct-biotechnology.ru/bytask/frakcionirovanie-plazmy/>
99. Федеральный закон «О стандартизации в Российской Федерации» от 29.06.2015 N 162-ФЗ [Электронный ресурс] URL: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_181810/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_181810/)
100. Фесенко, И.Д. Рациональное использование иммуноглобулина человеческого нормального для внутривенного введения / И.Д. Фесенко // Педиатрическая фармакология. – 2007. – Т. 4. – № 1. – С. 51-55.
101. Яровая, Г.А. Контактная активация протеолитических систем плазмы крови. Новые концепции о механизмах активации и биорегулирующих функциях / Г.А. Яровая, Т.Б. Блохина, Е.А. Нешкова // Лабораторная медицина. – 2008. - № 9. – С. 19- 26.
102. A report from the first Plasma Products Biotechnology meeting. Daydream Island Queensland Australia, March 27-30, 1999 [Электронный ресурс] URL:<https://www.gelifesciences.co.jp/newsletter/downstream/pdf/downstream31.pdf>
103. Alving, B.M. Hypotenzion associated with prekallikrein activator (Hageman-factor fragments) in plasma protein fraction / B.M. Alving, Y. Hojima, J.J. Pizano, et al // The New England Journal of Medicine. – 1978. – 299. – P. 66-70.
104. Ammann, E.M. Intravenous immune globulin and thromboembolic adverse events in patients with hematologic malignancy / E.M. Ammann, M.P. Jones, B.K. Link, et al.// Blood. – 2016. - 127(2). - P. 200-207.

105. Barandun, S. Clinical tolerance and catabolism of plasmin-treated gamma-globulin for intravenous application/ S. Barandun, V. Castel, M.F. Makula, et al. // *Vox Sanguinis*. – 1975. – V. 28. – N 3. – P. 157-175.
106. Barandun, S. Development of Immunoglobulin Preparations for Intravenous Use / S. Barandun, H. Isliker // *Vox Sanguinis*. – 1986. – N 51. – P. 157-160.
107. Basta, M. Mechanism of therapeutic effect of high-dose intravenous immunoglobulin. Attenuation of acute, complement-dependent immune damage in a guinea pig model / M. Basta, P. Kirshbom, M.M. Frank, et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 1989. – V. 84. – N 6. – P. 1974-1981.
108. Bellac, C.L. Anti-A and anti-B haemagglutinin levels in intravenous immunoglobulins: Are they on the rise? A comparison of four different analysis methods and six products // C.L. Bellac D. Polatti, T. Hottiger, et al. // *Biologicals*. – 2014. - V. 42. - P. 57-64.
109. Bellac C.L., Thomas The role of isoagglutinins in intravenous immunoglobulin-related hemolysis // C.L. Bellac, C. Hottiger, M.P. Jutzi, et al. // *Transfusion*. – 2015. – V.55. - S13–S22
110. Berard, R. Hemolytic anemia following intravenous immunoglobulin therapy in patients treated for Kawasaki disease: a report of 4 cases. / B. Wittemore, R. Scuccimarri // *Pediatric Rheumatology*. – 2012. - V. 10(1). - P. 10.
111. Berg R, Hemolytic events associated with intravenous immune globulin therapy: a qualitative analysis of 263 cases reported to four manufacturers between 2003 and 2012 // R. Berg, A. Shebl, M.C. Kimber, et al. // *Transfusion*. – 2015. - 55(Suppl 2). - S36–S46.
112. Berntorp, E. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays // E. Berntorp, G. L. Salvagno // *Seminars in thrombosis and haemostasis*. - 2008. - V. 34. - N 7. – P. 670-682.
113. Bonilla F.A. Adverse effects of immunoglobulin G therapy: thromboembolism and haemolysis / Bonilla F. A. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2014.- 178. – P. 72–74.

114. Borg, A.-L. Investigation of method for determination of Anticomplementary activity (ACA) in Octagam®: master's thesis / A.-L. Borg. // Stockholm, 2009. – P. 1-52. [Электронный ресурс] URL: <http://liu.diva-portal.org/smash/get/diva2:241409/fulltext01.pdf>
115. Branch, D. R. ABO zygosity, but not secretor or Fc receptor status, is a significant risk factor for IVIG-associated hemolysis / D.R. Branch, A. Hellberg, C.W. Bruggeman, et al // Blood. – 2018. – 131. – P. 830-835.
116. Branch, D.R. Serologic problems associated with administration of intravenous immune globulin (IVIg) / D.R. Branch // Immunohematology. - 2019, - 35(1). - P. 13–15.
117. Breitner-Ruddock, S. Laborayori investigations of intravenous immunoglobulin (IVIG) products assotiated with tromboembolic events // S. Breitner-Ruddock, J. Dodt, M. Etscheid et al. [Электронный ресурс] URL: [www.pet.de](http://www.pet.de)
118. British Pharmacopoeia. Normal Immunoglobulin for Intravenous Use // British Pharmacopoeia Commission. Volume IV. 2013.,
119. Buchacher, A. Anticomplementary activity of IVIG concentrates – important assay parameters and impact of IgG polymers / A. Buchacher, P. Schluga, J. Mullner, M. Schreiner // Vox Sanguinis. - 2010. - V. 98. - P. 209-218.
120. Certificate PREKALLIKREIN ACTIVATOR USP Catalog No. 1559709: USP Lot No.: F034G0 [Электронный ресурс]. URL: <https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1559709-F034G0.pdf>.
121. Che Y. Impact of manufacturing improvements on clinical safety of albumin: Australian pharmacovigilance data for 1988–2005 / Y Che, F.J. Wilson, J. Bertolini, et al // Critical Care and Resuscitation - 2006. - V. 8. - N 4. – P. 334-338.
122. Chinese Pharmacopoeia. [Электронный ресурс]. URL: <http://wp.chp.org.cn/front/chpint/en/>
123. Cohn, E.J. Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. i. the characterization of the protein fractions of

- human plasma / E.J. Cohn, J. L. Oncley, L.L. Strong, et al // Journal of Clinical Investigation. – 1944. - 23(4). – P. 417-432
- 124.Curling, J. Integrating new technology into blood plasma fractionation / J. Curling // BioPharm. – 2002. – V. 15. – N 9. – P. 16-26.
- 125.Dantal, J. Intravenous immunoglobulins: in-depth review of excipients and acute kidney injury risk / J. Dantal // American Journal of Nephrology. – 2013. - 38(4). – P. 275–284.
- 126.Davis, B.D. The anticomplementary activity of serum gamma globulin / B.D. Davis, E.A. Kabat, A. Harris, et al // The Journal of Immunology. – 1944. – V. 49. – N 4. – P. 223-233
- 127.Daw, Z. Hemolytic transfusion reactions after administration of intravenous immune (gamma) globulin: a case series analysis. / Z. Daw, R. Padmore, D. Neurath, et al // Transfusion. – 2008.- V. 48. - P. 1598-1601.
- 128.Debes, A. Tolerability and safety of the intravenous immunoglobulin Octagam®: a 10-year prospective observational study / A. Debes, M. Bauer, S. Kremer // Pharmacoepidemiology and Drug Safety. – 2007. – V. 16. – N 9. – P. 1038-1047.
- 129.Denizli, A. Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification / A. Denizli // Hacettepe J. Biol. & Chem. - 2011. - 39(4). - 315–341.
- 130.Dhainaut, F. In vitro and in vivo properties differ among liquid intravenous immunoglobulin preparations / F. Dhainaut, P.-O. Guillaumat, H. Dib, et al. // Vox Sanguinis. – 2013. – V. 104. – N 2. – P. 115-126.
- 131.Diapharma. [Электронный ресурс]  
URL: [http://chromogenicsubstrates.com/methods/chromogenic\\_substrates\\_methods\\_pka.htm](http://chromogenicsubstrates.com/methods/chromogenic_substrates_methods_pka.htm).
- 132.Emerson, G.G. Trombotic complications after intravenous immunoglobulin therapy in tow patients / G.G. Emerson, C.H. Herndon, A.G. Sreih // Pharmacotherapy.- 2002. – 22(12). – P. 1638 – 1641.

133. European Commission adopts European Medicines Agency's (EMA) recommendation to lift the suspension of the marketing authorization of octagam® and octagam®10%. 31.05.2011 [Электронный ресурс]  
URL: <http://www.octapharma.com/en/about/newsroom/press-releases/>
134. European Pharmacopoeia [Электронный ресурс]: EDQM. 8th Ed. Доступ по подписке. [Электронный ресурс] URL: <http://online6.edqm.eu/ep801/#>
135. Farrugia, A. Manufacture of immunoglobulin therapies. Relationship to thrombogenicity. Rockville, Maryland. May 17-18, 2011 [Электронный ресурс]  
URL: <http://www.pptaglobal.org>
136. FDA Approves U.S. Market Return for octagam® Following Octapharma's Implementation of Enhanced Safety Measures. 04.11.2011. Product Expected to Be Available for Distribution in a Few Weeks [Электронный ресурс]  
URL: <http://www.octapharma.com/en/about/newsroom/press-releases/>
137. Flegel, W.A. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis / W.A. Flegel // Transfusion. - 2015.- 55(0). - S47–S58.
138. Food and Drug Administration, FDA [Электронный ресурс]  
URL: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm127589.htm>
139. Fox B., International collaborative study to calibrate proposed 3rd WHO international standard and ph. eur. biological reference preparation batch 7 for prekallikrein activator WHO/BS/2019.2357. Expert committee on biological standardization / E. Ezeajughi, G. Roberts, C. Longstaff, , et al. // [Электронный ресурс]  
URL: [https://www.who.int/biologicals/expert\\_committee/BS.2019.2357\\_3rd\\_IS\\_PKA.pdf](https://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS.2019.2357_3rd_IS_PKA.pdf)
140. Frank, M.M. Immunoglobulin in the Control of Complement Action // M.M. Frank, V.D. Miletic, H. // Immunologic Research. – 2000.- 22(2-3).- P. 137-146.

141. Friesen, A.D. Column ion exchange chromatographic production of human immune serum globulin for intravenous use / A.D. Friesen, J.M. Bowman, W.C.H. Bees // *Vox Sanguinis*. – 1985. – V. 48. – N 4. – P. 201-212.
142. Geha, R.S. Therapeutic Immunology / R.S. Geha, F.S. Rosen // II RSG Chapter. – 1994. – V. 11. – P. 1-31.
143. Gelfand, E. W. Intravenous Immune Globulin in Autoimmune and Inflammatory Diseases / E. W. Gelfand // *The New England Journal of Medicine*. – 2012. – 367(21). – P. 2015-2025.
144. Germishuizen, W.A. Quantifying the thrombogenic potential of human plasma-derived immunoglobulin products / W.A. Germishuizen, D.C. Gyure, D. Stubbings, T. Burnouf // *Biologicals*. - 2014. - V. 42. - P. 260-270.
145. Gnesh, G.M. Effect of Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> on anticomplementary sera in complement fixation tests / G.M. Gnesh // *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1957. – V. 95. – N 4. – P. 713-715.
146. Grudmann, C Modified thrombin generation assay: application to the analysis of immunoglobulin concentrates / C. Grudmann, M. Kusch, S. Keitel, et al. // [Электронный ресурс]  
URL: [https://www.researchgate.net/publication/48408320\\_Modified\\_Thrombin\\_Generation\\_Assay\\_Application\\_To\\_The\\_Analysis\\_Of\\_Immunoglobulin\\_Concentrates](https://www.researchgate.net/publication/48408320_Modified_Thrombin_Generation_Assay_Application_To_The_Analysis_Of_Immunoglobulin_Concentrates)
147. Guideline on core SmPC for human albumin solution 26 July 2018 (EMA/CHMP/BPWP/494462/2011/Rev.3) [Электронный ресурс]  
URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-core-summary-product-characteristics-human-albumin-solution-revision-3\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-core-summary-product-characteristics-human-albumin-solution-revision-3_en.pdf)
148. Guideline on core SmPC for human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg) 28 June 2018 (EMA/CHMP/BPWP/94038/2007 Rev. 5) [Электронный ресурс]  
URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-core-smpc-human-normal-immunoglobulin-intravenous-administration-ivig-rev-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-core-smpc-human-normal-immunoglobulin-intravenous-administration-ivig-rev-5_en.pdf)

149. Guideline on core SmPC for human normal immunoglobulin for subcutaneous and intramuscular administration 26 February 2015 (EMA/CHMP/BPWP/143744/2011 rev. 1) [Электронный ресурс] URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-core-smpc-human-normal-immunoglobulin-subcutaneous-intramuscular-administration\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-core-smpc-human-normal-immunoglobulin-subcutaneous-intramuscular-administration_en.pdf)
150. Heitsch H. The therapeutic potential of bradykinin B2 receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease. / H. Heitsch // *Expert Opinion on Investigational Drugs* - 2003. - 2(5). – P. 759-70.
151. Hekker, A.C. A Papain slide test for rh mass typing / W. Klomp-Magnee, H.W. Krijnen, J.J. van Loghem // *Vox Sanguinis*. – 1957. - V. 2(2) - P. 128–133.
152. Hoefferer, L. Isoagglutinin reduction by a dedicated immunoaffinity chromatography step in the manufacturing process of human immunoglobulin products / L. Hoefferer, I. Glauser, A. Gaida, et al. // *Transfusion*. – 2015. - 55(Suppl 2). - S117–S121.
153. Hofstaetter, T. S-Sulfonation: a Reversible Chemical Modification of Human Immunoglobulins Permitting Intravenous Application / T. Hofstaetter, P. Gronski, E.J. Kanzy, et al. // *Vox Sanguinis*. – 1983. - 45(2). – P. 155-65.
154. Imbach, P. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood // P. Imbach, S. Barandun, V. d'Apuzzo, et al. // *Lancet*. - 1981. - V. 317(823). – P. 1228-1231.
155. Immune Deficiency Foundation. Characteristics of Immune Globulin Products Used to Treat Primary Immunodeficiency Diseases [Электронный ресурс] URL: <https://primaryimmune.org/wp-content/uploads/2016/01/IDF-Ig-Product-Chart-01-20-2016.pdf>
156. Indian Pharmacopoeia. Human Normal Immunoglobulin for Intravenous Use. Volume III. 2010. – P. 2579-2586.
157. Johnston, A. The use of chromatography to manufacture purer and safer plasma products / A. Johnston, W. Adcock // *Biotechnology and Engineering Reviews* – 2000. – 17. – P. 37- 70.

158. Jolles, S. Clinical uses of intravenous immunoglobulin / S. Jolles, W.A. Sewell, S.A. Misbah // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2005. – V. 142. – N 1. – P. 1-11.
159. Jordan, S Assessment of Anti-A and Anti-B Antibody Titers in Different IVIG Preparations: Correlation with Risk for Hemolysis [abstract] // S. Jordan, R. Hsi, I. Abumuhor, et al. // *American Journal of Transplantation*. – 2013. - 13 (suppl 5). [Электронный ресурс] URL:<http://www.atcmeetingabstracts.com/abstract/assessment-of-anti-a-and-anti-b-antibody-titers-in-different-ivig-preparations-correlation-with-risk-for-hemolysis/>
160. Jose, M. Plasma Product Biotechnology Meeting, May 19-13, 2011 / M. Jose, N. Marzo, M. Bono, et al. // [Электронный ресурс] URL: <http://www.bo-conf.com/ppb11/present/papers/202.pdf>.
161. Jose, M. Pasteurization inactivates clotting enzymes during Flebogamma and Flebogamma DIF production / M. Jose // [Электронный ресурс]: <http://www.webmedcentral.com/>.
162. Kabat, E.A. Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry. With Chapters on Complement and Complement Fixation, and Kjeldahl Nitrogen Determination by M.M. Mayer. - Springfield, 1961. –90 p.
163. Kahwaji, J. Acute hemolysis after high-dose intravenous immunoglobulin therapy in highly HLA sensitized patients / J. Kahwaji, E. Barker, S. Pepkowitz, et al // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. - 2009.- 4(12). – P. 1993–1997.
164. Kakoki, M. The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney / M. Kakoki, O. Smithies // *Kidney International*. – 2009. - 75 (10). – P. 1019–1030.
165. Kerry, P.J. Standardization of prekallikrein activator (PKA): the 1st International Standard for PKA / P.J. Kerry, A.D. Curtis, D.P. Thomas // *British Journal of Haematology*. - 1985. - V. 60. - P. 345-352.

166. Kimber M.C. PPTA Publishes Qualitative Analyses of IVIG-Associated Hemolysis Case Series. Fall 2015/ The Source [Электронный ресурс] URL: [http://www.pptaglobal.org/images/source/2015/FALL/7.\\_PPTA\\_Publishes\\_Qualitative\\_Analyses\\_of\\_IVIG-Associated\\_Hemolysis\\_Case\\_Series.pdf](http://www.pptaglobal.org/images/source/2015/FALL/7._PPTA_Publishes_Qualitative_Analyses_of_IVIG-Associated_Hemolysis_Case_Series.pdf)
167. Kistler, P. Large Scale Production of Human Plasma Fractions Eight Years Experience with the Alcohol Fractionation Procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier / P. Kistler, H. Nitschmann // *Vox Sanguinis*. – 1962. - 7(4). – P. 414–424.
168. Kuwahara, S. Prekallikrein activator (hageman factor fragment) in human plasma fractions / S. Kuwahara // *Transfusion*. – 1980. - 20(4). – P. 433-439.
169. Lackner, F. Collaborative study for the calibration of the Ph. Eur. prekallikrein activator in albumin BRP batches 4, 5 and 6 / F. Lackner, A. Daas, E. Terao // *Pharmeuropa Bio&SN*. - 2015. - V. 1. - P. 1-10.
170. Lackner, F. Establishment of replacement batches for prekallikrein activator in albumin biological reference preparation / F. Lackner, A. Daas, E. Terao, et al. // *Pharmeuropa Bio*. - 2008. - V. 1. - P. 1-6.
171. Liunbruno, G. Recommendations for the transfusion of albumin and immunoglobulin's / G. Liunbruno, F. Bennardello, A. Lattanzio et al. // *Blood Transfus.* – 2009. – V. 7. – N 3. – P. 216-234.
172. Longstaff, C. An international collaborative study to replace the 1st International Standard for prekallikrein activator / C. Longstaff, M.E. Behr-Gross, A. Daas, et al. // *Vox Sanguinis* - 2005. - V. 88. - P. 143-151.
173. Longstaff, C. Collaborative study to establish a new biological reference preparation for prekallikrein activator / C. Longstaff, M.E. Behr-Gross, A. Daas, et al. // *Pharmeuropa Bio*. 2005. - V. 1. - P. 1-11.
174. Marcus, D.M. A study of the mechanism of the anticomplementary activity of gamma-globulin / D.M. Marcus // *The Journal of Immunology*. – 1960. – N 84. – P. 273-284.

175. Marie, I. Intravenous immunoglobulin-associated arterial and venous thrombosis; report of a series and review of the literature / I. Marie, G. Maurey, F. Herve, et al // *British Journal of Dermatology*. – 2006. – 155. – P. 714–721.
176. Marley, P.B. Temperature sensitivity within the pasteurization temperature range of prekallikrein activator in stable plasma protein solution (SPPS) / P.B. Marley, C.M. Gilbo // *Transfusion*. – 1981. – 21(3). – P. 320–324.
177. Matejtschuk, P. Production of human albumin solution: a continually developing colloid / P. Matejtschuk, C.H. Dash, E.W. Gascoigne // *British Journal of Anaesthesia*. – 2000. – 85(6). – P. 887–895.
178. Mayer, M.M. Complement and complement fixation / M.M. Mayer, C.C. Thomas // *Experimental Immunochimistry*, Illinois, Springfield. 1961.
179. Mayer, M.M. The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement / M.M. Mayer, A.G. Osler, O.G. Bier, et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 1946. – V. 84. – N 6. – P. 535–548.
180. Messadi-Laribi, E. Cardioprotection and kallikrein-kinin system in acute myocardial ischaemia in mice / E. Messadi-Laribi, V. Griol-Charhbili, E. Gaies, et al. // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. – 2008. – 35(4). – P. 489–493.
181. Michelis, F.V. Acute hemolysis after intravenous immunoglobulin amid host factors of ABO-mismatched bone marrow transplantation, inflammation, and activated mononuclear phagocytes / F.V. Michelis, D.R. Branch, I. Scovell, et al. // *Transfusion*. – 2014. – 54. – P. 681–690.
182. Miekka, S.I. Anticomplementary activity of human Immunoglobulin G: I. Mechanism of the artifactual increase in anticomplementary activity of IgG during assay / S.I. Miekka, I. Gozze // *Vox Sanguinis*. – 1975. – V. 29. – P. 101–123.
183. Mielke O. Hemolysis related to intravenous immunoglobulins is independent on the presence of anti-blood group A and B antibodies and individual susceptibility / Orell Mielke, S. Fontana, V. Goranova-Marinova, et al. // *Transfusion*. – 2017. V. 1(10). – P. 2629–2638.

- 184.Montanari, V. Early decrease in total hemolytic complement activity (CH100) after fasting or intestinal bypass in the rat / V. Montanari // European Surgical Research. – 1986. – V. 18 (1). – P. 36-40.
- 185.Moscow, JA Positive direct antiglobulin test results after intravenous immune globulin administration / J.A. Moscow, A.J. Casper, C. Kodis, W.A. Fricke // Transfusion. – 1987. – 27. – P. 248-249.
- 186.Mousavi Hosseini, K. Implementation of Plasma Fractionation in Biological Medicines Production / K. Mousavi Hosseini, M. Ghasemzadeh // Iran J Biotech. - 2016. - 14(4). – P. 213-220.
- 187.Muhajir Mohamed, C. Intravenous immunoglobulin-associated hemolysis: risk factors, challenges, and solutions / C. Muhajir Mohamed // International Journal of Clinical Transfusion Medicine. – 2016. – 4. – P. 121–131.
- 188.Nguyen, T.P. Occurrence of hemolytic anemia in patients with GBS treated with high-dose IVIg. / T.P. Nguyen, S. Biliciler, A. Wahed, K. Sheikh // Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. – 2014. - V. 1 [Электронный ресурс] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4268039/>
- 189.NIBSC. Red cell immunohaematology [Электронный ресурс] URL: [http://www.nibsc.org/science\\_and\\_research/biotherapeutics/red\\_cell\\_immunohaematology.aspx](http://www.nibsc.org/science_and_research/biotherapeutics/red_cell_immunohaematology.aspx). (дата обращения 10.12.2016)]
- 190.Niosi, Ph. Blood-Group Antibodies in Human Immune Serum Globulin [letter] / Ph. Niosi, J. Lundberg., B.H. Park, D.W. Biggar // The New England Journal of Medicine. – 1971. – 12. – P. 1435-1436.
- 191.Non WHO Reference Material 1st British Reference Preparation for Prekallikrein Activator (PKA) NIBSC code: 79/572 Instructions for use (Version 5.0, Dated 23/05/2012) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/79-572.pdf> (дата обращения: 12.12.2017).
- 192.Nürnbergger, W. Preventive long-term intravenous immunoglobulin infusion in children with acute lymphatic leukemia. I. Anticomplementary activity of gamma globulin preparations is a function of the preparation and IgG concentration prior

- to infusions / W. Nürnberger, R. Willers, D. Körholz, et al. // *Monatsschrift Kinderheilkunde*. – 1988. –V. 136 (3). – P. 116-120.
193. Oberman, H.A. Red blood cell sensitization due to unexpected Rh antibodies in immune serum globulin / H.A. Oberman, M.L. Beck // *Transfusion*. – 1971. – 11. – P. 382-384.
194. Ovanesov, M.V. Association of immune globulin intravenous and thromboembolic adverse events / M.V. Ovanesov, M.D. Menis, D.E. Scott, et al // *American Journal of Hematology*. – 2017. - 92(4) - E44.
195. Oviedo, S.A. Optimization and Validation of a Flow Cytometry Assay for Quantitation of IgG-Anti-D (Rho) in the Industrial Process Control of the Anti Rho-Gammaglobulin Production / S.A. Oviedo, S. Vitali, Z.J. Desing // *Global Journal of Biology, Agriculture, Health Sciences*. – 2018. - V7(3).- P 1-11.
196. Padmore, R. Possible mechanisms for intravenous immunoglobulin-associated hemolysis: clues obtained from review of clinical case reports. / R. Padmore // *Transfusion*. – 2015. - 55(Suppl 2). - S59–S64.
197. Patent US: 4251510 A (1979). Intravenously injectable solution of plasma protein fraction free from bradykinin, kininogen and prekallikrein activators and processes for its production / D.L Tankersley.
198. Patent US: 4608254 A (1986). Method for the production of therapeutically administrable plasma derivatives filled in final containers / A. Philapitsch, Y.Linnau.
199. Patent US: 5094949 A (1988). Use of chymotrypsin for the inactivation of prekallikrein activator / Y. Linnau.
200. Patent US: 9023994 B2 (2011). Immunoglobulin reduced in thrombogenic agents and preparation thereof / R. Mintz, O. Belyaev, I. Nur, et al,
201. Patent: US 8084580 B2 (2011). Therapeutic human albumin (56) references cited solutions with low prekallikrein activator (PKA) activity and process for obtaining them / J.I. Jorquera Nieto, Ametlla del Valles, N. H. Mateu, et al.
202. Patent: WO 2010072381 A1 (2008). Immunoglobulin purification / M. Pompiati, A. Schaubmar.

203. Pintova, S. IVIG — A Hemolytic Culprit / S. Pintova, A. S. Bhardwaj, L. M. Aledort / *The New England Journal of Medicine* – 2012. – 10. – P. 974-976
204. Pisani, G. Anti-D testing in intravenous immunoglobulins: shouldn't it be considered? [Letter] / G. Pisani, M. Wirz, G. Gentili // *Vox Sanguinis*. - 1996. - V. 71.- P. 132.
205. Plasma Economics: Concept of Plasma Market Driver. [Электронный ресурс] URL: <http://marketingresearchbureau.com/plasma-industry/plasma-economics-concept-of-plasma-market-driver/>
206. PreKallikrein Activator Assay Kit, Pathway Diagnostics Ltd, PW301EP-01/2017.
207. Puga Yung, G. IgG subclasses determined from eluates of DAT positive patients after high-dose IVIg therapy do not predict hemolysis and are primarily of the IgG2 subclass / G. Puga Yung, J.D. Seebach, N. Baerenzung, et al. // *Transfusion*.- 2019. - 59(5). – P. 1882-1883
208. Radosevich, M. Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance / M. Radosevich, T. Burnouf // *Vox. Sang.* - 2010. -V. 98.- P. 12-28.
209. Ramasamy, I. Measurement of anticomplementary activity in therapeutic intravenous immunoglobulin preparations / I. Ramasamy, E. Tran, A. Farrugia // *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*. – 1997. – V. 25 (1). – P. 87-92
210. Ramirez, E. Symptomatic Tromboembolic events in patients treated with intravenous – immunoglobulins: Results from a retrospective cohort study / E. Ramirez, J.A. Romero-Garrido, E. Lopez-Granados et al. // *Trombosis Research*. – 2014. – 133. – P. 1045-1051.
211. Roemisch, J.R. Comparison of thrombin generation assay (TGA) and non-activated partial thromboplastin time (NAPTT) for the assessment of enhanced procoagulant activity in immunoglobulin solutions / J.R. Roemisch, C. Zapfi, A. Zoehning, K. Pock [Электронный ресурс] URL: <http://www.webmedcentral.com/>

212. Roemisch, J.R. Identification of Activated FXI as the major biochemical root cause in IVIG batches associated with thromboembolic events. Analytical and experimental approaches resulting in corrective and preventive measures implemented into the Octagam® manufacturing process [Электронный ресурс] URL:<http://www.webmedcentral.com/>
213. Romer, J. Characterization of various immunoglobulin preparations for intravenous application. I. Protein composition and antibody content / J. Romer, J.J. Morgenthaler, R. Scherz, F. Skvaril // *Vox Sanguinis*. – 1982. – 42. – P. 62–73.
214. Sandberg, E. Calibration of the human immunoglobulin BRPs for ACA and molecular size (batch 1) and for Fc function and molecular size (batches 1&2) / E. Sandberg, A. Costanzo, A. Daas, K.-H. Buchheit // *Pharmeuropa Bio&SN*. – 2012. – P. 1-15.
215. Sandberg, E. Collaborative study for establishment of human immunoglobulin biological reference preparation (BRP) / E. Sandberg // *Pharmeuropa Special Issue Bio*. – 1996(1). – P. 49-69.
216. Sandberg, E. Collaborative study for establishment of human immunoglobulin European pharmacopoeia biological reference preparation batch 2 / E. Sandberg, A. Daas, M.E. Esposito-Farese // *Pharmeuropa Special Issue Bio*. – 2001(1). – P. 27- 42.
217. Sandberg, E. Collaborative study to establish human immunoglobulin BRP batch 3 and human immunoglobulin (molecular size) BRP Batch 1 / E. Sandberg, M.-E. BehrGross, A. Daas // *Pharmeuropa Bio*. – 2006(1). – P. 37-48.
218. Scott, D.E. Safeguarding immune globulin recipients against hemolysis: what do we know and where do we go? / D.E. Scott, J.S. Epstein // *Transfusion*. - 2015. - 55 Suppl 2. - S122-126.
219. Sharma, A. Hemolysis induced cross-matching difficulty with intravenous immunoglobulin: a case report *Journal of Medical Case Reports* / A. Sharma, D. Aryal // *Journal of Medical Case Reports*. – 2018. – 12:245.

220. Shin, I.S. Validation of kinetic method for the PKA assay in plasma-derived products / I.S. Shin, C.M. Hong, H.C. Koh, S.H. Hong // *Biomolecules and Therapeutics*. – 2005. - 13(1). – P. 59-63.
221. Shin, I.S. An improved, reliable and practical kinetic assay for the detection of prekallikrein activator of blood products / I.S. Shin, Y.B. Shim, C.M. Hong, et al. // *Archives of Pharmacal Research*. – 2002. - 25 (4). – P. 505-510.
222. Shin, I.S. A collaborative study to establish the 1st national standard of Prekallikrein activator in Korea/I.S. Shin, C.M. Hong, S.J. Ban, et al. // *Biologicals*. - 2012. - V. 40. - P. 79-83.
223. Shirley, I. Anticomplementary activity of human immunoglobulin G / I. Shirley, Miekka, I. Gozze // *Vox Sanguinis*. – 1975. – V. 29 (2). – P. 101-123.
224. Shoham-Kessary, H, Isoantibodies in immunoglobulin for intravenous use may cause erythrocyte sequestration // H. Shoham-Kessary, H. Gershon // *Vox Sanguinis*.- 1999. – V.77. - P 33-39.
225. Shoham-Kessary, H. Immune complex-like moieties in immunoglobulin for intravenous use (IVIg) bind complement and enhance phagocytosis of human erythrocytes // H. Shoham-Kessary, Y. Naot, H. Gershon // *Clinical and Experimental Immunology*. – 1998. - V. 113.- P.77-84.
226. Siani, B. Isoagglutinin reduction in human immunoglobulin products by donor screening / B. Siani, K. Willmann, S. Wymann, et al. // *Biologics in Therapy*. – 2014. - V. 4(1-2). - P. 15-26.
227. Soltis, R.D. The effect of heat inactivation of serum on aggregation of immunoglobulin's / R.D. Soltis, D. Hasz, M.J. Morris, et al. // *Immunology*. – 1979. – V. 36. – N 1. – P. 37-45.
228. Stefanski, V. A new quantitative assay for the determination of complement activity / V. Stefanski, H.G. Ruppel // *Immunology Letters* – 1991. – V. 30. – N 1. – P. 1-5.
229. Steiner, EA Passive anti-D from intravenous immune serum globulin (letter) / E.A. Steiner, S.H. Butch, J.L. Carey, H.A. Oberman // *Transfusion*. – 1983. – 23. - 363.

230. Stephan, W. Beta-propiolactone as a sterilizing agent in the manufacture of intravenous immunoglobulin preparations / W. Stephan, H. Dichtelmüller // *Arzneimittel-Forschung*. – 1983. – V. 33. – N 9. – P. 1230-1231.
231. Stephan, W. Undegraded human immunoglobulin for intravenous use/W. Stephan// *Vox Sanguinis*. – 1975. – V. 28. – N 6. – P. 422-437.
232. Summary of opinion1 (post authorisation) Flebogamma DIF [Электронный ресурс] URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop/chmp-post-authorisation-summary-positive-opinion-flebogamma-dif-ii-59-g\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop/chmp-post-authorisation-summary-positive-opinion-flebogamma-dif-ii-59-g_en.pdf)
233. Tanaka, K. A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use / K. Tanaka, E. Sawatani, E.M. Shigueoka, et al. // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 1998. – V. 31. – N 11. – P. 1375-1381.
234. Thedsawad, A. Significances of red cell bound immunoglobulin G as detected by flow cytometry in patients with Coombs-negative immune hemolysis / A. Thedsawad, O. Taka, W. Wanachiwanawin // *Transfusion Medicine* – 2016 – V. 26. - N 2. - P. 130-137.
235. Thorpe, S.J. Competitive enzyme-linked immunoassay of monoclonal immunoglobulin G anti-D preparations // S.J. Thorpe, B. Fox, C. Turner, M. Scotty // *Transfusion Medicine*. - 2003. – 13. – P. 153–159.
236. Thorpe, S. J. Specifications for anti-A and anti-B in intravenous immunoglobulin: history and rationale / S.J. Thorpe // *Transfusion*. – 2015. - V. 55. – P. S80-S85.
237. Thorpe, S.J. Anti-A and anti-B activity in batches of different intravenous immunoglobulin products determined using a direct haemagglutination method / S.J. Thorpe, B.J. Fox, C.D. Dolman, R. Thorpe // *Biologicals*. – 2005. - V. 33. – P. 111-116.
238. Thorpe, S.J. International collaborative study to establish immunoglobulin (anti-D test) BRP Batch 1. / S.J. Thorpe, B. Fox, A. Heath, et al. // *Pharmeuropa Bio*. – 2006. – 1. - P. 49-55.

- 239.Thorpe, S.J. International collaborative study to evaluate candidate reference reagents to standardize haemagglutination testing for anti-A and anti-B in normal intravenous immunoglobulin products // S.J. Thorpe, B. Fox, G. Sharp, et al. // *Vox Sanguinis*. – 2009. - V. 97. - P. 160-168.
- 240.Tölö, H. An optimized assay for prekallikein activator activity in human plasma products / H. Tölö, H. Suomela // *Thrombosis research*. – 1982. - 27(1). – P. 35-44.
- 241.Tsugikazu, T. A New Intact Immunoglobulin for Intravenous Use Stabilized by Chemically Modified Gelatin Derivatives / T. Tsugikazu, I. Kazuyo, S. Tohru // *Vox Sanguinis*. – 1986. – N 51. – P.81-86.
- 242.Turner, C.E. Anti–Rh D Activity of Commercial Intravenous Immunoglobulin Preparations / C.E. Turner, S. Thorpe, M. Brasher // *Vox Sanguinis*. - 1999. - V. 76. - P. 55-58.
- 243.Uemura, Y. Anticomplementary activity test for intravenous immunoglobulin preparation / Y. Uemura, Y. Hirao, K. Takechi, et al. // *Journal of the Japan Society of Blood Transfusion*. – 1990. – V. 36. – N 3. – P. 411-417.
- 244.Urgent: Voluntary market withdrawal – September 24, 2010 octagam (Immune Globuline Intravenous (human) 5% Liquid Preparation) [Электронный ресурс] URL: <http://www.octapharma.com/en/about/newsroom/press-releases>
- 245.USP-NF. [Электронный ресурс] URL: <http://www.uspnf.com/>
- 246.Vivanco-Martínez, F. Chemical modification of carboxyl groups in human Fc gamma fragments: structural role and effect on the complement fixation / F. Vivanco-Martínez, R. Bragado, J.P. Albar, et al. // *Molecular Immunology*. – 1980. – V. 17. – N 3. – P. 327-336.
- 247.Voges-Haas, R. Manufacturing process of Intratect efficaciously eliminates thrombogenic potential / R. Voges-Haas, V. Braun, R. Schmeidl, et al. [Электронный ресурс] URL: <http://www.webmedcentral.com/>
- 248.Wessler, S. Experimental thrombosis / S. Wessler // *Clinical Obstetrics and Gynecology*. – 1968, - V. 11 – N 1 – P. 197-206.

249. Wessler, S. Studies in intravascular coagulation. III. The Pathogenesis of serum-induced venous thrombosis / S. Wessler, W. Kathleen, H. Carol // *Journal of Clinical Investigation*. – 1955. - 34(4). – P. 647-651.
250. Wessler, S. Thrombosis in the presence of vascular stasis / S. Wessler // *The American Journal of Medicine*. – 1962. - 33(5). - P. 648-666.
251. Wessler, S. Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum / Reiner S. M., Sheps M.C. // *Journal of applied physiology*. – 1959. - V.14. - P. 943-946.
252. Wessler S., Serum Induced thrombosis studies of its induction and evolution under controlled conditions in vivo / S. Wessler, L. Reiner, D. Freiman, et al. // *Circulation*. - 1959. – 20. – P. 864-874.
253. WHO Reference Reagent IVIG + anti-D and Negative control IVIG to standardise haemagglutination tests for anti-D in IVIG NIBSC code: 02/228 & 02/226 Instructions for use (Version 7.0, Dated 01/04/2008) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/02-226.pdf>
254. Wienen, W. Antithrombotic and anticoagulant effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran, and its oral prodrug, dabigatran etexilate, in a rabbit model of venous thrombosis // W. Wienen, J.-M. Stassen, H. Priepke, et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. - 2007. - V.5(16). - P. 1237–1242.
255. Wilson, J.R. Hemolytic anemia associated with intravenous immunoglobulin. / J.R. Wilson, N. Bhoopalam, M. Fisher // *Muscle and Nerve*. - 1997. = V. 20. - P. 1142-1145.
256. Wolberg, A.S. Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations / A.S. Wolberg, R.H. Kon, D.M. Monroe, M. Hoffman // *American Journal of Hematology* – 2000. – 65. – P. 30–34.
257. Working Standard IVIG + anti-D and Negative control IVIG; panel NIBSC code: 04/132 & 04/140; panel; 05/242 Instructions for use (Version 8.0, Dated 04/04/2008) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/05-242.pdf>

258. World Health Organization Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards// WHO Technical Report Series 932, annex 2. – Geneva, 2004. – P. 73-131
259. Yu. Meiying Potency and safety standard for plasma derivatives/ W. Yu. Meiying // 90th Blood products advisory committee. 2007. [Электронный ресурс] URL: <http://www.slideserve.com/libitha/potency-and-safety-standards-for-plasma-derivatives-mei-ying-w-yu-phd-dh>
260. Yung, G.P. Eluates from DAT-positive patients with or without hemolysis after high-dose IVIG yield predominantly IgG isoagglutinins of IgG2 subclass/ G.P. Yung, J.D. Seebach, N. Baerenzung, et al. // Transfusion.- 2019. – V. 59. – P. 1882.

**ПРИЛОЖЕНИЕ А**  
**Патенты на изобретения**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2577703

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ  
СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ  
ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА, И  
СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ  
ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА**

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015104120

Приоритет изобретения **09 февраля 2015 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **16 февраля 2016 г.**

Срок действия патента истекает **09 февраля 2035 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

 **Г.П. Ивлиев**



Автор(ы): *Кривых Максим Андреевич (RU), Корнилова Ольга Геннадьевна (RU), Кудашева Эльвира Юрьевна (RU)*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2671415

**Стандартный образец содержания анти-А и анти-В  
гемагглютининов в препаратах крови человека**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017119536

Приоритет изобретения 05 июня 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 31 октября 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 05 июня 2037 г.



*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Иванов* Г.П. Иванов

Авторы: *Корнилова Ольга Геннадьевна (RU), Кудашева Эльвира Юрьевна (RU), Нечаев Алексей Викторович (RU), Борисевич Игорь Владимирович (RU)*

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2682714

**Стандартный образец содержания анти-D антител в  
препаратах иммуноглобулинов человека**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017144239

Приоритет изобретения 18 декабря 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 21 марта 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 18 декабря 2037 г.



*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Г.П. Ивлиев*

Авторы: *Корнилова Ольга Геннадьевна (RU), Кудашева Эльвира Юрьевна (RU), Нечаев Алексей Викторович (RU), Стручкова Ирина Николаевна (RU), Борисевич Игорь Владимирович (RU)*

RU 2602714 C1

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

## Паспорта на стандартные образцы

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350  
 Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, тел. (499) 241-93-12

## ПАСПОРТ

на научно-техническую продукцию

**ОСО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА**  
**ОСО 42-28-430-2014**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** для использования в качестве фармакопейного стандартного образца в методике по ОФС «Определение антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения».

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** значения антикомплементарной активности: отрицательный контроль (41,5±3,6) %; положительный контроль (78,2±4,6) % со степенью достоверности 95 %.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** антикомплементарная активность отрицательного и положительного контролей установлена относительно стандартного образца Human Immunoglobulin (ACA and molecular size) BRP batch 1, Catalogue code: Y0001504 с аттестованным значением антикомплементарной активности отрицательного контроля 10-40% и положительного контроля 60-100%. Отрицательный контроль ОСО представляет собой коммерческую серию препарата «Имуноглобулин человека нормальный», положительный контроль получают из той же серии с помощью специальной обработки. ОСО представляет собой прозрачную бесцветную жидкость, в процессе хранения допускается появление осадка, исчезающего при встряхивании. ОСО разлит в ампулы по 1,5 мл и дополнительно аттестован по содержанию белка (биуретовым методом): 102±1,8 мг/мл со степенью достоверности 95 %.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** образец (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. ДАТА ВЫПУСКА:** 12.2013

**7. СРОК ГОДНОСТИ:** до 10.2014

**8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**9. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованных значений в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровской бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350  
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, тел. (499) 252-75-59

**ПАСПОРТ  
на научно-техническую продукцию  
ОСО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА  
ОСО 42-28-430-2016**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** использование в методике по ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения» (Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII издания) для оценки стабильности и приемлемости результатов испытаний.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** антикомплементарная активность отрицательного контроля (40,5±7,2) %; положительного контроля (76,6±6,2) % с доверительной вероятностью 0,95.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** антикомплементарная активность отрицательного и положительного контролей установлена в результате внутрилабораторной аттестации с использованием стандартного образца Human Immunoglobulin (ACA and molecular size) BRP batch 1, Catalogue code: Y0001504. ОСО состоит из положительного и отрицательного контролей, представляющих собой раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости, в процессе хранения допускается появление осадка, исчезающего при встряхивании. ОСО разлит в ампулы по 1,5 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с бигретовым реактивом): 103,1±3,6 мг/мл с доверительной вероятностью 0,95.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** образец (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ:** № 2

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 15.02.2016

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 15.02.2017

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350  
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 252-75-59

**ПАСПОРТ**

**на научно-техническую продукцию  
ОСО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА**

**ОСО 42-28-430-2017**

**(взамен ОСО 42-28-430-2016)**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** использованное в методике по ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомplementарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения» (Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII издания) для оценки стабильности и приемлемости результатов испытаний.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** антикомplementарная активность отрицательного контроля (41,6±7,2) %; положительного контроля (75,7±6,8) % с доверительной вероятностью 0,95.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** антикомplementарная активность отрицательного и положительного контролей установлена в результате внутривенной аттестации с использованием стандартного образца Human Immunoglobulin (ACA and molecular size) BRP batch 1, Catalogue code: Y0001504. ОСО состоит из положительного и отрицательного контролей, представляющих собой раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости, в процессе хранения допускается появление осадка, исчезающего при встряхивании. ОСО разлит в ампулы по 1,5 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом): 103,1±3,6 мг/мл с доверительной вероятностью 0,95.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** образец (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ:** № 2

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 15.02.2017

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 15.02.2018

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



*В.П. Бондарев*

В.П. Бондарев

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350

Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр.1,3 тел. (499) 252-75-59

**ПАСПОРТ**

**на научно-техническую продукцию  
ОСО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА  
ОСО 42-28-430-2018**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** использование в методике по ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомplementарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения» (Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII издания) для оценки стабильности и приемлемости результатов испытаний.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** антикомplementарная активность отрицательного контроля (38,7±9,0) %; положительного контроля (69,9 ± 9,6) % с доверительной вероятностью 0,95.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** антикомplementарная активность отрицательного и положительного контролей установлена в результате внутривенной аттестации с использованием стандартного образца Human Immunoglobulin (ACA and molecular size) BRP batch 1, Catalogue code: Y0001504. ОСО состоит из положительного и отрицательного контролей, представляющих собой раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости, в процессе хранения допускается появление осадка, исчезающего при встряхивании. ОСО разлит в ампулы по 1,5 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом): 98,4 ± 3,3 мг/мл с доверительной вероятностью 0,95.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** образец (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ:** № 3

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 10.07.2018

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 10.07.2019

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Заместитель директора Центра  
экспертизы и контроля МИБП  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



А.Р. Волгин

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42  
Фактический адрес: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, стр. 1,3, тел. 8 (499) 190-18-18, доб. 64-55,  
8 (499) 252-75-59

**ПАСПОРТ**  
**на научно-техническую продукцию**  
**ОСО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА**  
**(антикомплементарная активность)**  
**ОСО 42-28-430-2019**  
(взамен ОСО 42-28-430-2018)

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** использование в методике по ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения» (Государственная Фармакопея Российской Федерации) для оценки стабильности и приемлемости результатов испытаний.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** антикомплементарная активность: отрицательный контроль –  $(38,7 \pm 9,0) \%$ ; положительный контроль –  $(69,9 \pm 9,6) \%$ , доверительная вероятность 0,95.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** антикомплементарная активность отрицательного и положительного контролей установлена с использованием стандартного образца Human Immunglobulin (ACA and molecular size) BRP batch 1, Catalogue code: Y0001504. ОСО состоит из положительного и отрицательного контролей, представляющих собой раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости, в процессе хранения допускается появление осадка, исчезающего при встряхивании. ОСО разлит в ампулы по 1,5 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом):  $98,4 \pm 3,3$  мг/мл с доверительной вероятностью 0,95.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** образец (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ:** 3

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 11.07.2019 г.

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 11.07.2020 г.

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля качества  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**  
**«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»**  
 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр.2, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42  
 Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 190-18-18, доб. 64-57

**ПАСПОРТ**  
 на научно-техническую продукцию  
**ОСО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА**  
 (антикомплементарная активность)  
**ОСО 42-28-430-2019**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** оценка стабильности и приемлемости результатов испытаний при определении антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** антикомплементарная активность: отрицательный контроль – (30,3±12,2) %; положительный контроль – (72,6 ± 7,6) %, доверительная вероятность 0,95.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** антикомплементарная активность отрицательного и положительного контролей установлена с одновременным испытанием стандартного образца Human Immunoglobulin for Anticomplementary BRP batch 1, code: Y0001994. ОСО состоит из положительного и отрицательного контролей, представляющих собой раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости, в процессе хранения допускается появление осадка, исчезающего при встряхивании. ОСО разлит в ампулы по 1,5 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом): 96,0 ± 1,3 мг/мл с доверительной вероятностью 0,95.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** образец (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ:** 4

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 10.12.2019 г.

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 31.12.2021 г.

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350  
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 252-75-59

**ПАСПОРТ**  
**на научно-техническую продукцию**  
**ОСО Набор для определения содержания анти-А и анти-В**  
**гемагглютининов**  
**ОСО 42-28-439-2017**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** для использования в качестве стандартного образца при определении содержания анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека методом прямой гемагглютинации и методом непрямой гемагглютинации.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** содержание анти-А и анти-В гемагглютининов (титр):

- положительный компонент А – количество анти-А гемагглютининов, соответствующее разведению 1:32 (Ме) с размахом варьирования от 1:32 до 1:32 (в реакции непрямой гемагглютинации); 1:16 (Ме) с размахом варьирования от 1:16 до 1:32 (в реакции прямой гемагглютинации);

- положительный компонент В – количество анти-В гемагглютининов, соответствующее разведению 1:16 (Ме) с размахом варьирования от 1:16 до 1:32 (в реакции непрямой гемагглютинации); 1:16 (Ме) с размахом варьирования от 1:16 до 1:16 (в реакции прямой гемагглютинации);

- отрицательный компонент – содержание анти-А и анти-В гемагглютининов соответствует разведению менее 1:2;

- компонент лимит содержания анти-А гемагглютининов – количество анти-А гемагглютининов, соответствующее разведению 1:64 (Ме) с размахом варьирования от 1:64 до 1:64 (в реакции непрямой гемагглютинации); 1:64 (Ме) с размахом варьирования от 1:32 до 1:64 (в реакции прямой гемагглютинации)

- компонент лимит содержания анти-В – количество анти-В гемагглютининов, соответствующее разведению 1:64 (Ме) с размахом варьирования от 1:64 до 1:64 (в реакции непрямой гемагглютинации); 1:64 (Ме) с размахом варьирования от 1:32 до 1:64 (в реакции прямой гемагглютинации).

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** содержание анти-А и анти-В гемагглютининов в компонентах стандартного образца установлено в результате внутрिलाбораторной аттестации. ОСО представляет собой набор из пяти компонентов, каждый компонент – это раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости. ОСО разлит в ампулы по 3 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом):

- в положительном компоненте А –  $51 \pm 3$  мг/мл;

- в положительном компоненте В –  $52 \pm 2$  мг/мл;

- в отрицательном компоненте –  $56 \pm 1$  мг/мл;
- в компоненте лимит содержания анти-А гемагглютининов –  $52 \pm 3$  мг/мл
- в компоненте лимит содержания анти-В гемагглютининов –  $51 \pm 4$  мг/мл при доверительной вероятности 0,95.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** набор (пять ампул), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ:** № 1

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 01.12.2017

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 01.06.2019

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр.2, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42  
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 190-18-18, доб. 64-57

**ПАСПОРТ**  
на научно-техническую продукцию  
**ОСО Набор для определения содержания**  
**анти-А и анти-В гемагглютининов**  
**ОСО 42-28-439-2019**  
(взамен ОСО 42-28-439-2017)

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** оценка стабильности и приемлемости результатов определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека методом прямой гемагглютинации и методом непрямой гемагглютинации.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** содержание анти-А и анти-В гемагглютининов (титр):

- положительный компонент А: титр анти-А гемагглютининов соответствует разведению:
  - в реакции непрямой гемагглютинации: 1:32;
  - в реакции прямой гемагглютинации 1:16;
- положительный компонент В: титр анти-В гемагглютининов соответствует разведению:
  - в реакциях прямой и непрямой гемагглютинации: 1:16;
- отрицательный компонент - анти-А и анти-В гемагглютинины в реакциях непрямой и прямой гемагглютинации в разведении 1:2 не выявляются;
- компонент лимит содержания анти-А гемагглютининов: титр анти-А гемагглютининов в реакциях непрямой и прямой гемагглютинации соответствует разведению 1:64;
- компонент лимит содержания анти-В гемагглютининов: титр анти-В гемагглютининов в реакциях непрямой и прямой гемагглютинации соответствует разведению 1:64.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** содержание анти-А и анти-В гемагглютининов в компонентах стандартного образца установлено с одновременным испытанием Biological Reference Preparation Immunoglobulin (anti-A, anti-B antibodies test) positive control, batch 1, Y0001688; Biological Reference Preparation Immunoglobulin (anti-A, anti-B antibodies test) negative control, batch 1, Y0001689; Biological Reference Preparation Immunoglobulin for anti-A, anti-B antibodies Limit test, batch 1, Y0001153. ОСО представляет собой набор из пяти компонентов, каждый компонент – это раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости. ОСО разлит в ампулы по 3 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом):

- положительный компонент А – 51 мг/мл;
- положительный компонент В – 52 мг/мл;
- отрицательный компонент – 53 мг/мл;
- компонент лимит содержания анти-А гемагглютининов – 52 мг/мл
- компонент лимит содержания анти-В гемагглютининов – 51 мг/мл.



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**  
**«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»**  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр.2, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42  
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 190-18-18, доб. 64-57

**ПАСПОРТ**  
**на научно-техническую продукцию**  
**ОСО Набор для определения содержания**  
**анти-А и анти-В гемагглютининов**  
**ОСО 42-28-439А-2019**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** оценка стабильности и приемлемости результатов определения содержания анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека методом прямой гемагглютинации и методом непрямой гемагглютинации.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** содержание анти-А и анти-В гемагглютининов (титр):

- положительный компонент А: титр анти-А гемагглютининов соответствует разведению:
  - в реакции непрямой гемагглютинации: 1:32;
  - в реакции прямой гемагглютинации 1:16;з
- положительный компонент В: титр анти-В гемагглютининов соответствует разведению:
  - в реакциях прямой и непрямой гемагглютинации: 1:16;
- отрицательный компонент - анти-А и анти-В гемагглютинины в реакциях непрямой и прямой гемагглютинации в разведении 1:2 не выявляются.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** содержание анти-А и анти-В гемагглютининов в компонентах стандартного образца установлено с одновременным испытанием Biological Reference Preparation Immunoglobulin (anti-A, anti-B antibodies test) positive control, batch 1, Y0001688; Biological Reference Preparation Immunoglobulin (anti-A, anti-B antibodies test) negative control, batch 1, Y0001689; Biological Reference Preparation Immunoglobulin for anti-A, anti-B antibodies Limit test, batch 1, Y0001153. ОСО представляет собой набор из пяти компонентов, каждый компонент – это раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости. ОСО разлит в ампулы по 3 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом):

- положительный компонент А – 51 мг/мл;
- положительный компонент В – 52 мг/мл;
- отрицательный компонент – 53 мг/мл при доверительной вероятности 0,95.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** набор (три ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ:** № 1

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 01.12.2019

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 31.12.2020

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБУ  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350  
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 252-75-59

**ПАСПОРТ  
на научно-техническую продукцию  
ОСО Набор для определения содержания анти-D антител  
ОСО 42-28-440-2017**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** для использования в качестве стандартного образца в реакции гемагглютинации при определении содержания анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** содержание анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека:

- в положительном компоненте количество анти-D антител, соответствующее разведению 1:8 (Ме) с размахом варьирования от 1:4 до 1:8;

- в отрицательном компоненте содержание анти-D антител соответствует разведению менее 1:2.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** содержание анти-D антител в компонентах ОСО установлено в результате внутрилабораторной аттестации. ОСО представляет собой раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости. ОСО разлит в ампулы по 3 мл и дополнительно охарактеризован по антирезусной активности методом проточной цитофлуориметрии, которая для положительного компонента составила  $0,23 \pm 0,44$  МЕ/мл и по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом):

- в положительном компоненте –  $50 \pm 1$  мг/мл;

- в отрицательном компоненте –  $54 \pm 3$  мг/мл при доверительной вероятности 0,95.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** набор (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ: № 1**

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 01.12.2017 г.

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 01.06.2019 г.

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** Гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр.2, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42  
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 190-18-18, доб. 64-57

**ПАСПОРТ**  
на научно-техническую продукцию  
**ОСО Набор для определения содержания анти-D антител**  
**ОСО 42-28-440-2019**  
(взамен ОСО 42-28-440-2017)

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** оценка стабильности и приемлемости результатов определения содержания анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека методом гемагглютинации.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** содержание анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека:

- в положительном компоненте количество анти-D антител, соответствует разведению 1:8;

- в отрицательном компоненте содержание анти-D антител в разведении 1:2 не выявляется.

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** содержание анти-D антител в компонентах ОСО установлено с одновременным испытанием WHO Reference Reagent, Anti-D antibodies in intravenous immunoglobulin: Positive control and Negative control for haemagglutination tests, NIBSC 02/228 & 02/226. ОСО представляет собой раствор иммуноглобулина человека в виде прозрачной бесцветной жидкости. ОСО разлит в ампулы по 3 мл и дополнительно охарактеризован по содержанию белка (колориметрическим методом с биуретовым реактивом):

- в положительном компоненте – 50 мг/мл;

- в отрицательном компоненте – 54 мг/мл.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** набор (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ: № 1**

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 01.12.2019 г.

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 31.12.2020 г.

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте, замораживание не допускается. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний *in vitro* и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

В.П. Бондарев



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**  
**«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»**  
**(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр.2, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42  
 Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 190-18-18, доб. 64-57

**ПАСПОРТ**  
**на научно-техническую продукцию**  
**ОСО Набор для определения содержания активатора прекалликреина**  
**ОСО 42-28-445-2020**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** для использования в качестве стандартного образца при определении содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека и альбумина человека. Компонент для оценки содержания активатора прекалликреина – построение калибровочной кривой, компонент контроля – оценка стабильности и приемлемости результатов определения.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** содержание активатора прекалликреина:

- компонент для оценки содержания активатора прекалликреина – 51 МЕ;
- компонент контроля: при восстановлении в 1,0 мл воды очищенной 8,3 – 11,9 МЕ/мл  
 при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной 5,4 - 6,6 МЕ/мл  
 (с доверительной вероятностью 0,95).

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** содержание активатора прекалликреина в компонентах ОСО установлено относительно WHO International Standard 2nd International Standard For Prekallikrein Activator, NIBSC, 02/168. ОСО представляет собой лиофильно высушенный раствор альбумина человека (200 мг/мл) в виде твердой массы светло-желтого цвета, после восстановления в воде очищенной – слегка опалесцирующую жидкость светло-желтого цвета. ОСО разлит в ампулы по 1 мл.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** набор (две ампулы), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ: № 1**

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 30.01.2020 г.

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 30.12.2020 г.

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре не выше минус 20 °С. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал компонентов ОСО предназначен для лабораторных испытаний и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**  
**«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»**  
**(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр.2, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42  
 Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 190-18-18, доб. 64-57

**ПАСПОРТ**  
**на научно-техническую продукцию**  
**ОСО Набор для определения содержания активатора прекалликреина**  
**(в комплекте с прекалликреином)**  
**ОСО 42-28-446-2020**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ:** для использования в качестве стандартного образца при определении содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека и альбумина человека с прекалликреином человека, входящим в состав комплекта. Компонент для оценки содержания активатора прекалликреина – построение калибровочной кривой, компонент контроля - оценка стабильности и приемлемости результатов определения.

**2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** содержание активатора прекалликреина:

- компонент для оценки содержания активатора прекалликреина – 51 МЕ/ампула;
- компонент контроля: при восстановлении в 1,0 мл воды очищенной 9,1–11,1 МЕ/мл при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной 5,6-6,4 МЕ/мл (с доверительной вероятностью 0,95).

**3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** содержание активатора прекалликреина в компонентах ОСО установлено относительно WHO International Standard 2nd International Standard For Prekallikrein Activator, NIBSC, 02/168. ОСО представляет собой лиофильно высушенный раствор альбумина человека (200 мг/мл) в виде твердой массы светло-желтого цвета, после восстановления в воде очищенной - слегка опалесцирующую жидкость светло-желтого цвета. ОСО разлит в ампулы по 1 мл. Прекалликреин человека представляет собой лиофильно высушенную хроматографически очищенную фракцию прекалликреина в виде рыхлой массы белого цвета, после восстановления в воде очищенной – прозрачную бесцветную жидкость. Реагент прекалликреина человека розлит по 1,0 мл.

**4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** ОСО применяют в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

**5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** набор (две ампулы, флакон с реагентом прекалликреина человека), паспорт, инструкция по применению ОСО.

**6. СЕРИЯ: № 1**

**7. ДАТА ВЫПУСКА:** 30.01.2020 г.

**8. СРОК ГОДНОСТИ:** 30.12.2020 г.

**9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ОСО должен храниться при температуре не выше минус 20 °С. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре хранения.

**10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал компонентов ОСО предназначен для лабораторных испытаний in vitro и не предназначен для введения людям.

**11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА:** Гарантируется стабильность аттестованной характеристики в течение срока годности экземпляра ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБП  
 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

### Акты о внедрении

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Утверждаю  
 Заместитель генерального директора  
 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России  
 по экспертизе лекарственных средств  
 д-р мед. наук, проф.  
 В.А. Меркулов  
 «14» 10 2019 г.



#### АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Корниловой Ольги Геннадьевны на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование подходов к обеспечению специфической безопасности и стандартизации лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека»

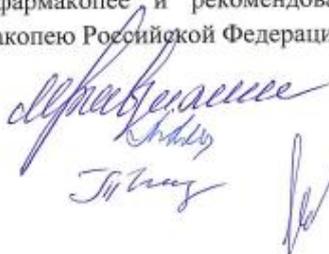
14.10. 2019 г.

г. Москва

Комиссия ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в составе: председатель – заместитель директора Центра фармакопеи и международного сотрудничества д-р фарм.наук, проф. М.В. Гаврилин, члены комиссии – заместитель директора Центра фармакопеи и международного сотрудничества д-р фарм.наук М.Н. Лякина, начальник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа канд. фарм.наук Т.Б. Шемерякина, начальник Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов д-р мед. наук, проф. А.А. Мовсесянц составила настоящий акт о том, что экспериментальные материалы диссертационной работы Корниловой Ольги Геннадьевны на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование подходов к обеспечению специфической безопасности и стандартизации лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека» были использованы при разработке 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-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека»;

ОФС.1.8.2.0013.18 «Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека», включенных в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания и проекта ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека», рассмотренного 02.07.2019 на 63 заседании Совета Министерства здравоохранения Российской Федерации по государственной фармакопее и рекомендованного к включению в государственную фармакопею Российской Федерации.

Председатель  
Члены комиссии



М.В. Гаврилин  
М.Н. Лякина  
Т.Б. Шемерянкина  
А.А. Мовсесянц



АО «НПО «Микроген»  
 Директор по науке АО «НПО «Микроген»

*Е.И. Сакания* / Е.И. Сакания /  
 М.П. \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ 2020 года

### АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования Корниловой Ольги Геннадьевны в деятельность АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»

**Наименование разработки.** Методики определения антиэритроцитарных антител, антикомплемментарной активности, включенные в ОФС 1.8.2.0005.15 «Определение анти-А и анти-В гематглотининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека», ОФС.1.8.2.0004.15 «Испытание на анти-Д антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека», ОФС.1.8.2.0007.15 «Определение антикомплемментарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения».

Результаты диссертационной работы Корниловой Ольги Геннадьевны на тему «Разработка методологии обеспечения специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека и альбумина человека» были включены в проекты указанных ОФС Государственной Фармакопеи (акт внедрения ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России от 17.10.2019 года).

**Место разработки.** федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Место внедрения.** Филиалы АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» в г. Нижний Новгород (Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио»), в г. Уфа (предприятие «Иммунопрепарат»), в г. Пермь (Пермское НПО «Биомед»).

**Форма внедрения.** Результаты исследования включены в нормативную документацию на лекарственные препараты Имбиоглобулин, раствор для инфузий (ЛС-000177-100418, изменение 1), Иммуновенин®, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (PN000296/01-310117, изменения 1,2), Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий (PN001594/01-120118, изменение 1) и используются при контроле качества на этапах производства и при выпускающем контроле качества по показателям «Антикомплемментарная активность», «Анти-А и анти-В гематглотинины», «Анти-Д антитела».

Подписи членов комиссии

Директор по производству

Заместитель начальника управления  
 регистрации, медицинских исследований

Начальник отдела систем контроля качества

*И.В. Загидуллин* / И.В. Загидуллин

*Д.М. Трофимов* / Д.М. Трофимов

*И.М. Тимонин* / И.М. Тимонин



АО «НПО «Микроген»  
 Директор по науке АО «НПО  
 «Микроген»

*[Signature]* / Е.И. Сакания /  
 2020 года

### АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования Корниловой Ольги Геннадьевны в деятельность АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»

**Наименование разработки.** Методология применения стандартного образца «Иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность)» (ОСО 42-28-430).

**Место разработки.** федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Автор** эксперт лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ИЦЭК МИБП Корнилова О.Г.

**Место внедрения.** Филиалы АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» в г. Нижний Новгород (Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио»), в г. Уфа (предприятие «Иммунопрепарат»), в г. Пермь (Пермское НПО «Биомед»).

**Форма внедрения** Использование при контроле качества на этапах производства и при выпускающем контроле качества по показателю «Антикомплементарная активность» лекарственных препаратов Имбиглобулин, раствор для инфузий (ЛС-000177-100418, изменение 1), Иммуновенин®, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (PN000296/01-310117, изменения 1,2), Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий (PN001594/01-120118, изменение 1).

Подписи членов комиссии

Директор по производству

Заместитель начальника управления  
 регистрации, медицинских исследований

Начальник отдела систем контроля качества

*[Signature]*

Н.В. Загидуллин

Д.М. Трофимов

И.М. Тимонин

*[Signatures]*

Форма Приложения № 8 к «Регламенту о порядке взаимодействия структурных подразделений ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в связи с созданием, оформлением и использованием изобретений, полезных моделей, промышленных образцов, программ для ЭВМ, баз данных, созданных работником при выполнении своих трудовых обязанностей»

УТВЕРЖДАЮ  
 Генеральный директор  
 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России  
 Ю.В. Олефир  
 «12» апреля 2016 г.



### Акт № 6/ИЗ-2577703

#### о внедрении результата интеллектуальной деятельности

- патент на служебное изобретение № 2577703 «Способ получения положительного контроля стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека, и стандартный образец иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека», дата приоритета 09.02.2015 г.  
(реквизиты патента, описание изобретения)
- патент на служебную полезную модель \_\_\_\_\_  
(реквизиты патента, описание полезной модели)
- патент на служебный промышленный образец \_\_\_\_\_  
(реквизиты патента, описание промышленного образца)
- свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ \_\_\_\_\_  
(реквизиты свидетельства, описание программы для ЭВМ)
- свидетельство о государственной регистрации базы данных \_\_\_\_\_  
(реквизиты свидетельства, описание базы данных)

ФИО	Название структурного подразделения	Должность
Кривых Максим Андреевич	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Эксперт 1 категории
Корнилова Ольга Геннадьевна	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Ведущий эксперт
Кудашева Эльвира	Лаборатория иммуноглобулинов и	Начальник лаборатории

Юрьевна	препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	
---------	---	--

Настоящий Акт составлен в том, что вышеуказанный результат интеллектуальной деятельности внедрен в деятельность ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при осуществлении приносящей доход деятельности с «20» апреля 2016 г. в следующих подразделениях:

№ п/п	Наименование подразделения
1	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП

в соответствии с:

- формулой патента
- описанием свидетельства о регистрации

1. Способ получения положительного контроля стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека, включающий следующие стадии:

- термическая обработка на водяной бане образца иммуноглобулина человека при температуре  $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$ ;
- охлаждение термически обработанного образца иммуноглобулина человека при температуре  $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$ ;
- определение антикомплементарной активности образца положительного контроля, при этом значения определяемой активности должны находиться в диапазоне от 60 до 95%.

2. Стандартный образец иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека, содержащий положительный контроль, полученный способом по п. 1, и отрицательный контроль с антикомплементарной активностью, находящейся в диапазоне 10-45%.

Возможное использование результата интеллектуальной деятельности

подтверждается наличием его признаков в отчете о НИР по теме «Научное обоснование и разработка методологии экспертизы качества, эффективности и безопасности препаратов крови» в рамках государственного задания 2015-2017 гг.

(указываются обозначения проектов, номера чертежей, другой технической документации, в которой реализованы признаки изобретения, полезной модели, промышленного образца, ноу-хау или содержатся указания по применению программы для ЭВМ, базы данных)

Наименование подразделения	Руководитель или лицо его заменяющее / исполняющее обязанности	ФИО	Подпись
Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Начальник лаборатории	Кудашева Эльвира Юрьевна	
Отдел редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации НИР	Начальник отдела	Корсун Лилия Владимировна	
Финансово-экономическое управление	Начальник управления	Игнатова Елена Валерьевна	
Управление бухгалтерского учета и аудита	Начальник управления	Мурадян Регина Рафиковна	

Форма Приложения № 8 к «Регламенту о порядке взаимодействия структурных подразделений ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в связи с созданием, оформлением и использованием изобретений, полезных моделей, промышленных образцов, программ для ЭВМ, баз данных, созданных работником при выполнении своих трудовых обязанностей»

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор  
ФГБУ «НЦЭСМП»  
Минздрава России

 Ю.В. Олефир  
«03» декабря 2018 г.

**Акт №12/ИЗ-2671415**

**о внедрении результата интеллектуальной деятельности**

■ патент на служебное изобретение № 2671415 «Стандартный образец содержания анти-А и анти-В гемагглютининов в препаратах крови человека», дата приоритета 05.06.2017 г.

(реквизиты патента, описание изобретения)

Авторы:

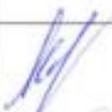
ФИО	Название структурного подразделения	Должность
Корнилова Ольга Геннадьевна	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Главный эксперт
Кудашева Эльвира Юрьевна	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Начальник лаборатории
Нечаев Алексей Викторович	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Ведущий эксперт
Борисевич Игорь Владимирович	Центр планирования и координации НИР	Директор Центра

Настоящий Акт составлен в том, что вышеуказанный результат интеллектуальной деятельности внедрен в деятельность ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при осуществлении научной деятельности, выполняемой за счет средств федерального бюджета, и приносящей доходы деятельности с «30» ноября 2018 г. в следующих подразделениях:

№ п/п	Наименование подразделения
1	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП

в соответствии с формулой патента.

Использование результата интеллектуальной деятельности подтверждается наличием его признаков в отчетах о НИР по теме « Научное обоснование перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов, предназначенных для иммунопрофилактики инфекционных болезней» в рамках государственного задания 2018-2020 гг., а также в Приложении № 1 (Прейскурант на научно-техническую продукцию) к приказу ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 252 от 15.11.2018 г.

Наименование подразделения	Руководитель или лицо его заменяющее / исполняющее обязанности	ФИО	Подпись
Испытательный центр экспертизы качества МИБП	Начальник Центра	Мовсисянц Аргашес Авакович	
Отдел редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации НИР	Начальник отдела	Корсун Лилия Владимировна	
Финансово-экономическое управление	Начальник управления	Игнатова Елена Валерьевна	
Управление бухгалтерского учета и аудита	Начальник управления	Мурадян Регина Рафиковна	

Форма Приложения № 8 к «Регламенту о порядке взаимодействия структурных подразделений ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в связи с созданием, оформлением и использованием изобретений, полезных моделей, промышленных образцов, программ для ЭВМ, баз данных, созданных работником при выполнении своих трудовых обязанностей»

УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России  
Ю.В. Олефир

«16» мая 2019 г.



### Акт №13/ИЗ-2682714

#### о внедрении результата интеллектуальной деятельности

■ патент на служебное изобретение № 2682714 «Стандартный образец содержания анти-D антител в препаратах иммуноглобулинов человека», дата приоритета 18.12.2017 г.

(реквизиты патента, описание изобретения)

Авторы:

ФИО	Название структурного подразделения	Должность
Корнилова Ольга Геннадьевна	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Главный эксперт
Кудашева Эльвира Юрьевна	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Начальник лаборатории
Нечаев Алексей Викторович	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Ведущий эксперт
Стручкова Ирина Николаевна	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП	Инженер-лаборант
Борисевич Игорь Владимирович	Центр планирования и координации НИР	Директор Центра

Настоящий Акт составлен в том, что вышеуказанный результат интеллектуальной деятельности внедрен в деятельность ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при осуществлении научной деятельности, выполняемой за счет средств федерального бюджета, и приносящей доходы деятельности с «16» мая 2019 г. в следующих подразделениях:

№ п/п	Наименование подразделения
1	Лаборатория иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП

в соответствии с формулой патента.

Использование результата интеллектуальной деятельности подтверждается наличием его признаков в отчетах о НИР по теме « Научное обоснование перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов, предназначенных для иммунопрофилактики инфекционных болезней» в рамках государственного задания 2018–2020 гг., а также в Приложении № 1 (Прейскурант на научно-техническую продукцию) к приказу ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 30 от 12.02.2019 г.

Наименование подразделения	Руководитель или лицо его заменяющее / исполняющее обязанности	ФИО	Подпись
Испытательный центр экспертизы качества МИБП	Начальник Центра	Мовсесянц Арташес Авакович	
Отдел редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации НИР	Начальник отдела	Корсун Лилия Владимировна	
Финансово-экономическое управление	Начальник управления	Игнатова Елена Валерьевна	
Управление бухгалтерского учета и аудита	Начальник управления	Мурадян Регина Рафиковна	

**ПРИЛОЖЕНИЕ Г****Методические рекомендации по экспертной оценке специфической безопасности препаратов крови**

(Титульный лист)

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ФГБУ «НЦЭСМП»  
Минздрава России  
д-р мед. наук, ст. науч. сотр.



Ю.В. Олефир

«29» декабря 2015 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ  
ПРЕПАРАТОВ КРОВИ

Рассмотрены и рекомендованы к  
утверждению на заседании Ученого совета  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России  
(протокол № от 29 декабря 2015 г.)

*Москва 2015*

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

## Руководство по экспертизе лекарственных препаратов крови

(Титульный лист)

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ФГБУ «НЦЭСМП»  
Минздрава России  
д-р мед. наук, ст. науч. сотр.



Ю.В. Олефир  
«29» декабря 2017г.

РУКОВОДСТВО  
ПО ЭКСПЕРТИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ КРОВИ

Рекомендовано Ученым советом  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава  
России (протокол № 4 от 28  
декабря 2017 г.)

Москва 2017

804

## СОСТАВИТЕЛИ

Д.м.н., профессор Борисевич И.В., д.м.н., профессор Бондарев В.П., д.м.н., профессор Иванов В.Б., к.м.н. Кудашева Э.Ю., к.м.н. Корнилова О.Г., к.м.н. Устинникова О.Б., к.м.н. Перелыгина О.В., д.м.н. Горячев Д.В., к.м.н. Добровольский А.В., д.м.н., профессор Мосягин В.Д., Обухов Ю.И., к.м.н. Шевцов В.А., к.б.н. Рукавишников А.В., к.м.н. Никитина Т.Н., д.м.н., профессор Никитюк Н.Ф., д.м.н. Саяпина Л.В., к.ф.н. Кривых М.А., к.б.н. Гаврилова Н.А., к.б.н. Вдовиченко М.В., к.м.н. Волгин А.Р.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность кандидату фармацевтических наук Кривых М.А., кандидату биологических наук Хуснатдиновой Е.А., Парамоновой Е.В., Коноваловой Е.А., Стручковой И.Н., Нечаеву А.В., кандидату медицинских наук Кудашевой Э.Ю., доктору биологических наук Волковой Р.А., доктору медицинских наук Сяпиной Л.В., доктору медицинских наук, профессору Бондареву В.П., доктору медицинских наук, профессору Мовсесянцу А.А., доктору медицинских наук, профессору Борисевичу И.В., кандидату биологических наук Устинниковой О.Б., кандидату химических наук Руновой О.Б., кандидату биологических наук Фадейкиной О.В., кандидату биологических наук Яковлеву А.К., Воропаеву А.А. и др. за активное участие в выполнении исследований, участие в обсуждении полученных результатов, ценные рекомендации.