

На правах рукописи

КОРМЩИКОВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА
ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

1.5.6 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России).

Научный руководитель:

Парамонов Игорь Владимирович, доктор медицинских наук (3.1.28 – Гематология и переливание крови), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», директор.

Официальные оппоненты:

Абрамова Елена Геннадьевна, доктор биологических наук (1.5.6 – Биотехнология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория профилактических иммуноглобулинов, главный научный сотрудник.

Игнатьев Георгий Михайлович, доктор медицинских наук (1.5.10 – Вирусология), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», лаборатория молекулярной биотехнологии, старший научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь.

Защита состоится «07» октября 2022 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г. о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан « _____ » _____ 202__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Клещевой энцефалит (КЭ) является природно-очаговой вирусной инфекцией, которая может вызывать тяжелые поражения центральной нервной системы, приводящие к инвалидности и летальным исходам. Помимо Российской Федерации (РФ) КЭ эндемичен на территории 27 европейских и 4 азиатских стран [Ruzek D. et al., 2019; Андаев Е.И. и др., 2021].

Для экстренной профилактики и этиотропной терапии этого инфекционного заболевания применяют иммуноглобулин человека против КЭ [Олефир Ю.В. и др., 2015], введение которого в ранние сроки после заражения нейтрализует вирус и формирует пассивный иммунитет к инфекции. Указанное действие обусловлено содержанием в препарате специфических IgG, выделенных из плазмы крови доноров-реконвалесцентов и/или доноров, иммунизированных соответствующими вакцинами.

В настоящее время на фармацевтическом рынке отсутствует иммуноглобулин человека против КЭ зарубежного производства, выпускается только отечественный препарат, специфическую активность которого определяют согласно нормативной документации в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Метод достаточно трудоемкий, длительный и неудобен при тестировании большого количества образцов. Для выполнения исследования требуются эритроциты гуся, которые не производятся в виде готового стандартного реагента. Применение лабильных биологически активных компонентов, субъективность визуальной оценки титра антител могут являться причинами снижения достоверности результатов РТГА.

При проведении лабораторной диагностики КЭ и оценки поствакцинального иммунитета применяют иммуноферментный анализ (ИФА), который относится к инструментальным методам исследования. Продолжительность постановки составляет от 2,5 до 3,5 часов. Известен широкий спектр наборов реагентов отечественного и зарубежного производства для ИФА, однако они не верифицированы для тестирования препаратов крови и предусматривают разные способы оценки результатов. Отсутствие унифицированной методики ограничивает применение ИФА для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на биотехнологических производствах.

Решение задач унификации и повышения точности результатов контроля качества лекарственных средств неразрывно связано с использованием фармакопейных стандартных образцов (ФСО). Соотнесение результата анализа с общепризнанным стандартом позволяет получать сопоставимые данные при применении разных методик исследования в независимых лабораториях. Необходимость обязательного метрологического обеспечения, неотъемлемой частью которого служит разработка и применение ФСО, установлена на государственном уровне и определяет актуальность исследования [Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ

«Об обращении лекарственных средств»; приказ Минздрава России от 13.02.2013 N 66 «Об утверждении стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации»; приказ Министерства здравоохранения РФ от 20.03.2020 N 202 «О метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»].

Степень разработанности темы исследования. Проблема стандартизации методов контроля препаратов плазмы крови человека и других биотехнологических лекарственных средств освещена в научных работах ведущих специалистов отрасли [Борисевич И.В. и др., 2015; Меркулов В.А. и др., 2016; Абрамова Е.Г., 2018; Яковлев А.К., 2019; Волкова Р.А. и др., 2020; Кудашева Э.Ю., 2020; Корнилова О.Г., 2020]. В последние годы в реестр ФСО внесены стандарты для контроля фракционного состава, антикомплементарной активности, количества анти-А, анти-В, анти-Д антител, активатора прекалликреина и другие. Однако исследований по созданию ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ в нашей стране и за рубежом до настоящего времени не проводилось.

В этой связи разработка стандарта для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ является актуальной научной задачей, решение которой имеет существенное значение для повышения качества и эффективности рассматриваемой группы лекарственных средств.

Цель исследования – разработать фармакопейный стандартный образец для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита.

Задачи исследования:

1. Разработать способ получения фармакопейного стандартного образца для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита.
2. Определить аттестуемые характеристики фармакопейного стандартного образца в реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментном анализе.
3. Усовершенствовать методику определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе реакции торможения гемагглютинации.
4. Разработать методику определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа.
5. Изучить специфическую активность лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием фармакопейного стандартного образца.

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что впервые:

- разработан способ получения ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ, который обеспечивает внутрисерийную однородность и стабильность аттестованного значения ФСО в течение 3 лет;
- разработан и аттестован ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ. Аттестуемые характеристики составили не ниже титра антител 1:80 с неопределенностью, не превышающей шаг титрования, в РТГА, не менее 200 ЕД/мл с неопределенностью, не превышающей 21 %, в ИФА;
- усовершенствована методика определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на основе РТГА с использованием разработанного ФСО, что позволяет повысить точность определения титра антител за счет снижения вариабельности результатов;
- разработана методика оценки специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на основе ИФА, обеспечивающая унификацию данных, полученных с применением разных наборов реагентов.

Приоритет исследований подтвержден патентом на изобретение № 2735782 «Способ получения стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита» от 09.11.2020 г.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в обосновании технологических подходов к получению ФСО, обеспечивающих стабильность аттестуемых характеристик в процессе хранения, близость состава и свойств исследуемым иммуноглобулинам человека против КЭ, внутрисерийную однородность. Предложенные методики аттестации могут рассматриваться в качестве основы для получения аттестуемых характеристик ФСО. Разработанный способ расчета концентрации IgG к вирусу КЭ позволяет получать результаты, сопоставимые с данными метода параллельных линий, оптимизировать процедуру подбора разведений и способ обработки данных ИФА.

Практическое значение результатов исследования заключается в применении ФСО для повышения точности и унификации определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ, а также при аттестации вторичных стандартов и валидации методик контроля качества указанных лекарственных препаратов. Материалы работы использованы при разработке инструкции по изготовлению, контролю и аттестации ФСО, проектов паспорта и инструкции по применению, что дает возможность осуществлять серийный выпуск продукта.

Методология и методы исследования. Теоретической основой работы стал анализ научных работ отечественных и зарубежных исследователей, а также нормативной базы в области контроля качества и метрологического обеспечения в сфере обращения лекарственных средств. При разработке ФСО руководствовались ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы» Государственной фармакопеи РФ 14 издания, WHO Technical Report Series № 932, 2006. Межлабораторная аттестация проведена согласно ГОСТ 8.532–2002. Внутрисерийная однородность оценена в соответствии с ГОСТ 8.531–2002. Неопределенность аттестованного значения в РТГА установлена с учетом положений ГОСТ Р ИСО 16269-7–2004, адекватность функций калибровок при аттестации первичного ФСО методом ИФА проверена согласно ГОСТ Р ИСО 11095–2007.

Материал для исследования – 4 кандидата в ФСО (480 флаконов), 3 экспериментальные серии ФСО (750 флаконов), 83 серии иммуноглобулина человека против КЭ производства АО НПО «Микроген», ГБУЗ «ЧОСПК», ГБУЗ СО «ОСПК».

Для решения поставленных задач использованы следующие основные методы: **биотехнологические** – фракционирование по Кону, ультрафильтрация, высушивание методом сублимации; **иммунологические** – определение содержания антител к вирусу КЭ методом РТГА с использованием набора реагентов «Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ» (АО «НПО «Микроген», Россия) и ИФА с применением тест-систем: ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG (НПО «Диагностические системы», Россия), ВектоВКЭ-IgG (АО «Вектор-Бест», Россия), Anti-TBE Virus ELISA (Euroimmun AG, Германия), TBEV/FSME IgG ELISA (IBL International GmbH, Германия), FSME/TBE Virus IgG (Institute Virion\Serion GmbH, Германия), NovaLisа FSME / TBE IgG (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Германия), а также оценка вирусной безопасности методом иммунохемилюминесценции; **физико-химические, биохимические и микробиологический** – определение остаточной влажности по ОФС.1.2.1.0010.15 и точности розлива гравиметрическим методом, цветности и прозрачности спектрофотометрическим методом по ОФС.1.2.1.0006.15, содержания белка колориметрическим методом по ОФС.1.8.2.0010.18, электрофоретической однородности методом электрофореза на плёнках из ацетата целлюлозы по ОФС.1.8.2.0009.15, фракционного состава методом иммуноэлектрофореза в агаровом геле по ОФС.1.8.2.0002.15, молекулярных параметров методом гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также определение стерильности методом прямого посева по ОФС.1.2.4.0003.15; **статистические** – описательный, корреляционный, линейный регрессионный и дисперсионный анализ данных при уровне значимости 0,05 с использованием программ MS Excel (Microsoft, США), Statistica 10.0 (StatSoft Inc, США), ПАРАЛАЙН (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, авторское свидетельство 2006612065).

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения концентрата IgG, заключающийся в стабилизации раствора иммуноглобулина человека против КЭ *I*-пролином и глицином в количестве по 12,5 г/л, корректировке рН до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе при непрерывном перемешивании и лиофилизации, позволяет получать ФСО, соответствующий спецификационным нормам, и осуществлять его серийный выпуск.

2. ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ с установленными аттестуемыми характеристиками: титром антител не ниже 1:80 и неопределенностью, не превышающей шаг титрования, в РТГА и концентрацией IgG не менее 200 ЕД/мл с неопределенностью, не превышающей 21 %, в ИФА, и сроком годности не менее 3 лет.

3. Усовершенствованная методика на основе РТГА и разработанная методика на основе ИФА, обеспеченные ФСО, позволяют повысить точность и унифицировать результаты определения специфической активности лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против КЭ.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ. Результаты диссертационной работы получены при выполнении государственных заданий на осуществление прикладных научных исследований и разработок ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России: «Совершенствование методов контроля качества препаратов иммуноглобулина человека», № госрегистрации 01201150082; «Совершенствование методов контроля качества крови донорской, ее компонентов и препаратов», № госрегистрации 01201451641, и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России: «Научное обоснование и разработка методологии экспертизы качества, эффективности и безопасности препаратов крови», № госрегистрации 115111740010, «Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств», № госрегистрации 115111740007.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований, использованием средств измерений, прошедших метрологическую поверку, обоснованным применением статистических методов обработки полученных результатов.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Вопросы трансфизиологии и клинической медицины» (Киров, 2012), VII молодежном научно-инновационном конкурсе по программе УМНИК (Киров, 2015), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 55-летию КНИИГиПК

«Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины» (Киров, 2015), I Калининградском научном иммунологическом форуме (Калининград, 2016).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 12 научных публикациях, из них 3 в научных изданиях, рекомендованных ВАК, 1 патенте РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 133 страницах машинописного текста, содержит 32 таблицы, 11 рисунков и состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего в себя 152 источника, в том числе 53 зарубежных, и 4 приложений.

Личный вклад автора. Все результаты, представленные в диссертации, получены при личном участии автора, которым обосновано направление работы, проведены экспериментальные исследования по разработке ФСО, осуществлен анализ и интерпретация полученных данных, их статистическая обработка. Исследования по аттестации ФСО, разработке и стандартизации методик определения специфической активности выполнены совместно с сотрудниками лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России: ведущим микробиологом И.Л. Арефьевой при содействии начальника лаборатории д.м.н. Э.Ю. Кудашевой.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка способа получения фармакопейного стандартного образца для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита

На основе международных технических докладов и положений отечественных нормативных документов определены ключевые критерии для разработки ФСО: близость по составу и свойствам иммуноглобулину человека против КЭ; стабильность; внутрисерийная однородность. В качестве основы для стандарта использован полупродукт иммуноглобулина человека против КЭ, из которого получены 4 кандидата в ФСО, различающиеся по содержанию белка, стабилизированные смесью глицина и *l*-пролина по 12,5 г/л либо глицином в концентрации 25,0 г/л. После корректировки показателя рН до $5,0 \pm 0,5$ растворы стерильно разлиты во флаконы пенициллиновые по 1,6 мл при постоянном перемешивании и контроле точности дозирования. Сублимационное высушивание проведено согласно способу лиофилизации, разработанному для внутривенного иммуноглобулина человека против КЭ: замораживание материала до минус $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$, охлаждение конденсора до минус $(55 \pm 5) ^\circ\text{C}$, рабочий вакуум $(0,15 \pm 0,05)$ Торр, конечная температура материала $30 \pm 3 ^\circ\text{C}$, общее время сублимации – (28 ± 1) ч. Изменены тип флаконов и объем наполнения.

Результаты оценки свойств полученных лиофилизатов (таблица 1) свидетельствовали о достижении требуемой величины остаточной влажности, не превышающей 1 %, при этом образцы представляли собой аморфную массу белого цвета, равномерным слоем

прилегающую к стенкам флакона, с растворимостью в пределах 9 минут. Показатели цветности и прозрачности соответствовали установленным нормам для иммуноглобулинов человека. Снижения специфической активности не наблюдалось. Различия в объеме наполнения флаконов не превышали 1 %, что указывало на воспроизводимость процесса дозирования.

Таблица 1 – Основные свойства кандидатов в ФСО

Наименование характеристики (количество исследований)	Кандидат в ФСО, состав стабилизатора			
	1	2	3	4
	<i>l</i> -пролин и глицин – по 12,5 г/л		глицин – 25,0 г/л	
Белок, г/л (n = 5)	47,4 ± 1,2	93,0 ± 2,2	51,0 ± 0,9	95,0 ± 2,3
Остаточная влажность, % (n = 5)	0,85 ± 0,06	0,79 ± 0,06	0,87 ± 0,05	0,73 ± 0,04
Описание (n = 120)	Аморфная масса белого цвета			
Время растворения, минут (n = 5)	7,5 ± 0,5	9,0 ± 0,8	5,5 ± 0,3	6,0 ± 0,5
Цветность, ед. ОП (n = 5)	0,059 ± 0,003	0,127 ± 0,010	0,083 ± 0,008	0,140 ± 0,018
Прозрачность, ед. ОП (n = 5)	0,024 ± 0,002	0,048 ± 0,007	0,038 ± 0,003	0,046 ± 0,010
Специфическая активность до/после лиофилизации (n = 3)	1:80/1:80	1:160/1:160	1:160/1:160	1:160/1:160
Точность розлива, CV % (n = 8)	0,67	0,71	0,67	1,00

С целью выбора состава защитной среды проведены ускоренные испытания стабильности, которые моделировали выдерживанием образцов при повышенных температурах (30 °С, 45 °С и 56 °С), срок наблюдения составил 210 суток. С учетом данных динамики специфической активности кандидатов в ФСО построены зависимости логарифма константы инактивации от обратной температуры (кривые Аррениуса) (рисунок 1).

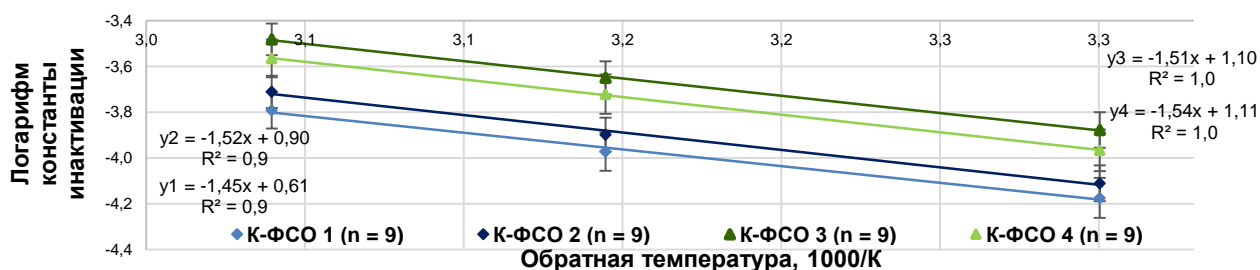


Рисунок 1 – Зависимости логарифма константы инактивации от обратной температуры в условиях ускоренных испытаний кандидатов в ФСО (К-ФСО)

С использованием полученных зависимостей рассчитаны прогнозируемые сроки годности (таблица 2). Для кандидатов в ФСО 1 и 2 с двухкомпонентным стабилизатором снижение специфической активности происходило менее выражено, чем для вариантов 3 и 4 ($p = 0,032$). При этом между вариантами с одним составом наполнителя, но разным содержанием белка, различия отсутствовали ($p > 0,05$). Это указывало на возможность не нормировать данный показатель при разработке спецификации на ФСО. По итогам ускоренных испытаний стабильности выбран двухкомпонентный наполнитель в составе глицин и *l*-пролин в количестве по 12,5 г/л.

Таблица 2 – Константы инактивации при температуре хранения 4 °С и прогнозируемые сроки годности кандидатов в ФСО

Кандидат в ФСО	Значение константы инактивации при 4°С, ($K_T \pm s$) $\times 10^{-5}$, сутки ⁻¹	Прогнозируемый срок годности, месяцев
1	1,96 ± 0,33	50
2	2,15 ± 0,30	46
3	3,74 ± 0,51	26
4	3,00 ± 0,39	33

Тест термодеградациии также позволил оценить стабильность стандарта при отклонении температурного режима хранения от регламентированного. Снижение концентрации IgG к вирусу КЭ кандидатов в ФСО с выбранным составом наполнителя происходило только на 210 сутки и составило 3,3 % при 56 °С, 2,2 % при 45 °С, 1,3 % при 30 °С, что позволило предусмотреть возможность транспортировки стандарта при температуре окружающей среды.

Согласно вышеизложенному способу получены три экспериментальные серии ФСО с выбранным составом стабилизатора. Объем каждой партии составил примерно 250 флаконов. Экспериментальные серии ФСО исследованы согласно общепринятой практике по основным критериям качества иммуноглобулинов человека, за исключением характеристик, которые определяют безопасность лекарственной формы препарата при его клиническом применении, а также по показателю «внутрисерийная однородность» (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты определения показателей качества ФСО

Наименование показателя качества	Экспериментальная серия			Нормативное значение показателя качества	
	01	02	03		
Описание	Аморфная масса белого цвета			Аморфная масса белого цвета	
Остаточная влажность, %	0,85	0,79	0,77	Не более 1 %	
Время растворения, минут	5,0	5,0	4,5	Не более 15 минут	
Прозрачность, ед. ОП	0,014	0,015	0,015	Не более 0,050	
Цветность, ед. ОП	0,034	0,032	0,031	Не более 0,150	
pH	5,04	5,02	5,02	5,0 ± 0,5	
Белок, г/л	64	73	76	Не нормируется	
Электрофоретическая однородность, относительное содержание фракции γ -глобулинов, % от общего белка	95,3	95,2	97,5	Не менее 95 %	
Молекулярные параметры, %:	ди- и мономеры	97,8	97,4	97,0	Не менее 85 %
	полимеры и агрегаты	0,5	0,5	0,8	Не более 10 %
	фрагменты	1,7	2,1	2,2	Не нормируется
Фракционный состав	Интенсивная линия преципитации IgG			Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более 4 дополнительных линий	
Стерильность	Стерилен			Должен быть стерильным	
Поверхностный антиген вируса гепатита В, антитела к вирусу гепатита С, к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) 1 и 2 типов и антиген р24 ВИЧ-1 (вирусная безопасность)	Отсутствуют			Должны отсутствовать поверхностный антиген вируса гепатита В, антитела к вирусу гепатита С, к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) 1 и 2 типов и антиген р24 ВИЧ-1	
Специфическая активность (содержание антител к вирусу КЭ)	1:80	1:160	1:320	Содержание антител к вирусу КЭ должно быть не менее 1:80	
Внутрисерийная однородность (относительная неопределенность от неоднородности u_h), %	2,107	2,437	2,447	Не выше 3 %	

По результатам испытаний установлены требования к остаточной влажности, рН и внутрисерийной однородности. По остальным показателям экспериментальные серии соответствовали нормам качества иммуноглобулиновых препаратов. Минимально допустимое значение специфической активности составило 1:80, исходя из нормативной документации производителей.

Таким образом, по итогам проведенных исследований разработан способ получения ФСО, заключающийся в стабилизации раствора иммуноглобулина человека против КЭ /-пролином и глицином в количестве по 12,5 г/л, корректировке рН до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе при непрерывном перемешивании и лиофилизации. Результаты оценки свойств лиофилизатов антител трех экспериментальных серий явились основой для разработки нормативных требований к ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ.

Аттестация фармакопейного стандартного образца для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита

Аттестация ФСО проведена специалистами двух независимых лабораторий ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России и ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в регламентированных условиях с применением средств измерения сопоставимого уровня точности. Аттестуемые характеристики ФСО – аттестованное значение содержания антител и его неопределенность – получены методами РТГА и ИФА в трех сериях аттестационных испытаний.

В РТГА одной лабораторией протестировано по 8 образцов стандарта, другой – по 7. Результаты аттестационных испытаний представлены на рисунке 2.

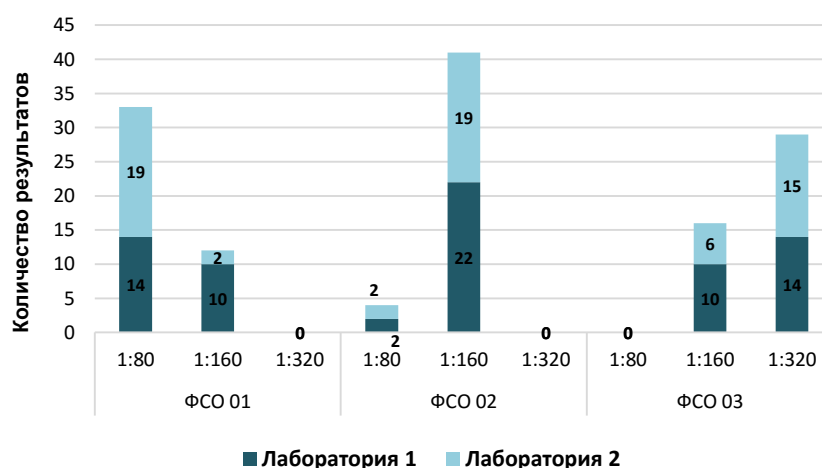


Рисунок 2 – Результаты определения титра антител к вирусу клещевого энцефалита в ФСО

За аттестованное значение принята медиана титра антител к вирусу КЭ, вычисленная по результатам трех серий аттестационных испытаний, выполненных каждой лабораторией, за неопределенность аттестованного значения – доверительный интервал медианы при $P=95\%$. Результаты статистической обработки данных приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты статистической обработки данных аттестационных испытаний ФСО методом реакции торможения гемагглютинации

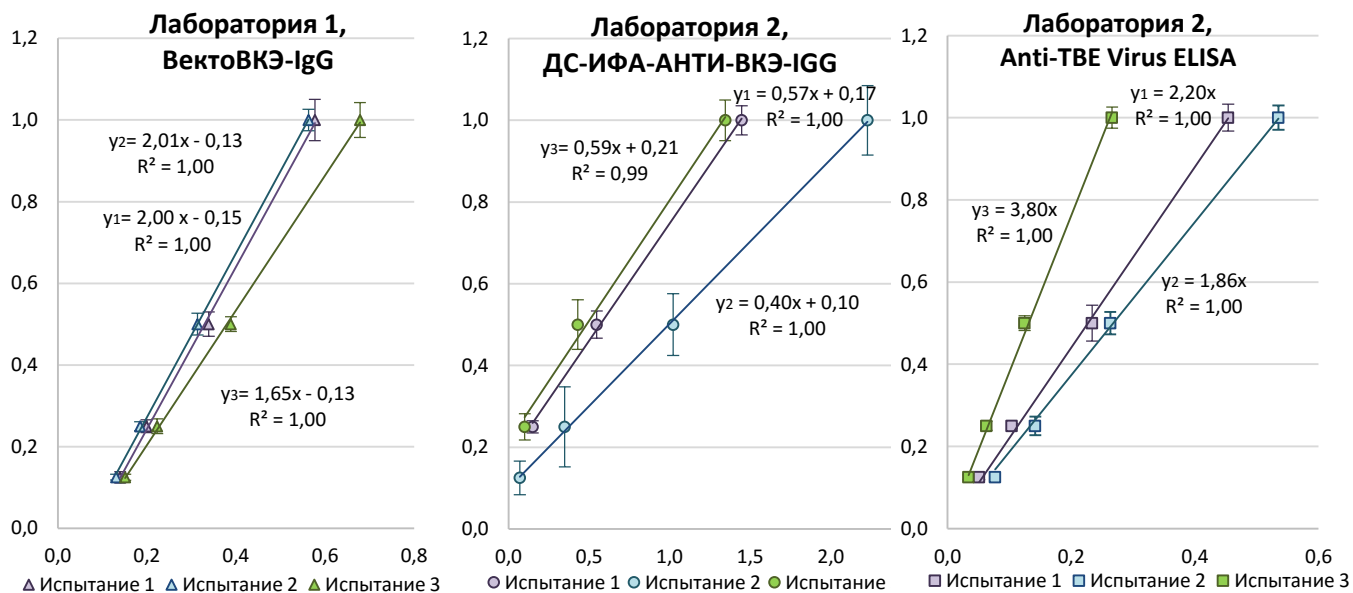
Статистический параметр	Титр антител к вирусу КЭ в ФСО экспериментальной серии		
	01	02	03
Медиана Me	1:80	1:160	1:320
Границы доверительного интервала ($k = 16, n = 45, P = 95 \%$)	от 1:80 до 1:160	совпадают со значением Me	от 1:160 до 1:320

Для серии 02 границы доверительного интервала совпали с аттестованным значением, поэтому неопределенность установили по минимальной и максимальной величине титра антител. В результате аттестуемые характеристики ФСО экспериментальных серий 01, 02 и 03 составили 1:80 (1:80 – 1:160), 1:160 (1:80 – 1:160), 1:320 (1:160 – 1:320).

В ИФА специалистами каждой лаборатории протестировано по 8 образцов стандарта. В одной лаборатории ФСО исследовали в разведениях 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000 с использованием набора реагентов ВектоВКЭ-IgG, в другой – в разведениях 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 и 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 с применением тест-систем ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG и Anti-TBE Virus ELISA (IgG) соответственно.

При аттестации ФСО первого выпуска аттестуемая характеристика установлена исходя из титра вируснейтрализующих антител, который составил 1:200 (результаты биологической стандартизации ФСО методом реакции нейтрализации на культуре клеток почки эмбрионов свиньи были предоставлены начальником лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, д.м.н. Э.Ю. Кудашевой). Неопределенность аттестованного значения оценена по разработанному алгоритму, включавшему в себя: построение калибровочных кривых по средним значениям оптической плотности (ОП), полученным для четырех последовательных разведений ФСО; проверку линейности (условия $R^2 > 0,95$) и адекватности функций калибровки; расчет коэффициентов активности и их стандартного отклонения.

По итогам проверки адекватности функций калибровки из уравнений, полученных при использовании тест-системы Anti-TBE Virus ELISA (IgG), исключены свободные члены уравнения a , поскольку они являлись незначимыми ($p > 0,05$). Помимо этого, функции калибровки, полученные в аттестационных испытаниях 1 и 3 с применением тест-системы ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG, не отвечали условию $F_{\text{калибр.}} \leq F_{\text{табл.}}$. По-видимому, значения ОП в разведении 1:3200 были крайне низкими и находились вне области прямой пропорциональности кривой ИФА. Поэтому указанные величины исключены, графики функции калибровки построены по трем координатам и пересчитаны параметры дисперсионного анализа. Скорректированные зависимости, представленные на рисунке 3, являлись линейными и удовлетворяли условию $F_{\text{калибр.}} \leq F_{\text{табл.}}$.



По оси Y – коэффициент разведения ФСО, по оси X – соответствующее значение ОП.

Рисунок 3 – Функции калибровки, полученные для ФСО первого выпуска

С использованием полученных уравнений рассчитаны коэффициенты активности k_a (рисунок 4). В результате сравнения выборок доказана статистическая эквивалентность значений показателя, полученных в двух лабораториях с применением разных диагностических наборов ($p = 0,7$). Среднее значение \bar{k}_a объединенных данных ($n = 272$), равное 1,0, свидетельствовало о правильности выбранной математической модели определения аттестуемой характеристики ФСО. Стандартное отклонение s составило 0,12.

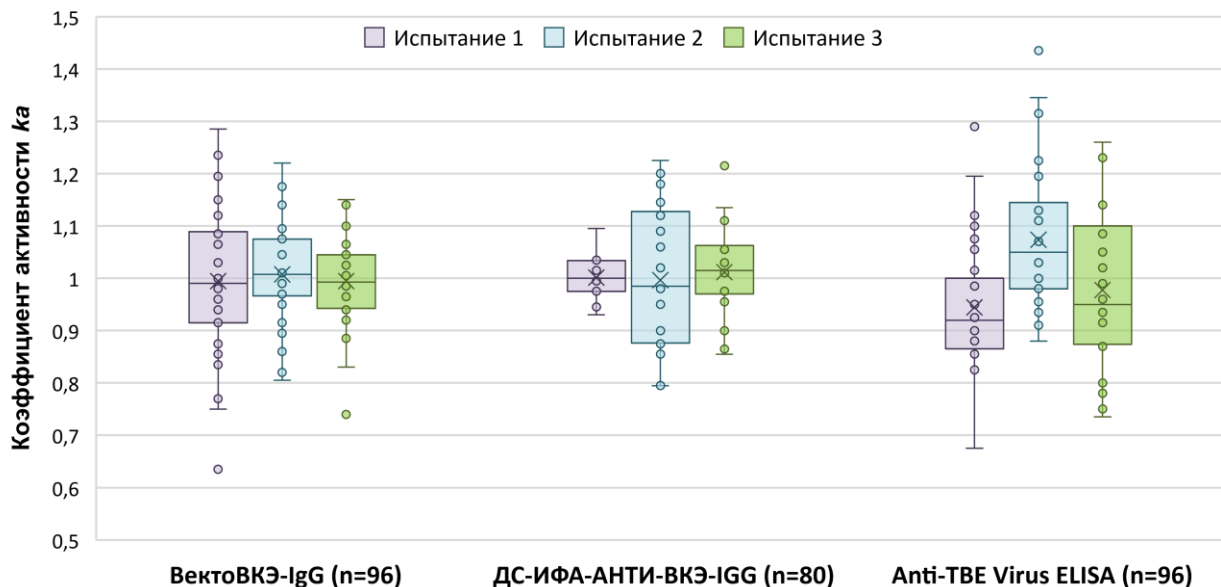


Рисунок 4 – Коэффициенты активности, полученные для ФСО первого выпуска

За нижнюю границу неопределенности принято обратное значение титра, полученное при биологической стандартизации ФСО, аттестованное значение и верхняя граница неопределенности рассчитаны с учетом $\pm 2s$ (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты определения аттестуемой характеристики ФСО первого выпуска методом иммуноферментного анализа

Аттестуемая характеристика	Относительное значение	Абсолютное значение, ЕД/мл
Нижняя граница неопределенности	0,76	200
Аттестованное значение	1,00	248
Верхняя граница неопределенности	1,24	296

Аттестация повторных выпусков ФСО (экспериментальные серии 02 и 03) проведена относительно ФСО первого выпуска (экспериментальная серия 01) методом параллельных линий (рисунок 5). Результаты ИФА, полученные с использованием разных наборов реагентов, были статистически эквивалентны ($p > 0,05$). Это позволило рассчитать аттестуемые характеристики ФСО экспериментальных серий 01 и 02, которые составили (297 ± 61) ЕД/мл и (360 ± 75) ЕД/мл.

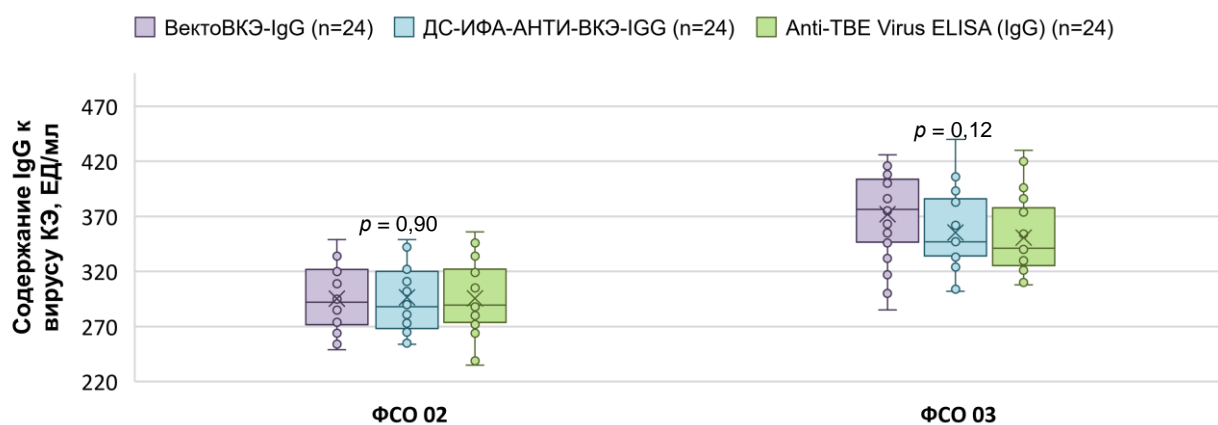


Рисунок 5 – Результаты аттестационных испытаний ФСО экспериментальных серий 02 и 03

Таким образом, по результатам аттестационных испытаний первичного и повторных выпусков ФСО установлены аттестуемые характеристики трех экспериментальных серий стандарта методами РТГА и ИФА (таблица 6).

Таблица 6 – Результаты аттестации ФСО

Экспериментальная серия ФСО	Аттестуемая характеристика в РТГА	Аттестуемая характеристика в ИФА, ЕД/мл
01	1:80 (1:80 – 1:160)	248 (200 – 296)
02	1:160 (1:80 – 1:160)	297 (236 – 358)
03	1:320 (1:160 – 1:320)	360 (285 – 435)

Анализ стабильности и установление срока годности фармакопейного стандартного образца

Срок годности ФСО определен по результатам долгосрочных испытаний стабильности при температуре от 2 до 8 °С. Продолжительность хранения ФСО серии 01 составила 48 месяцев, серии 02 – 42 месяца, серии 03 – 36 месяцев. Для анализа отбирали по 5 образцов стандарта каждые 6 месяцев, которые тестировали методами РТГА и ИФА.

Динамика титра антител к вирусу КЭ представлена на рисунке 6.

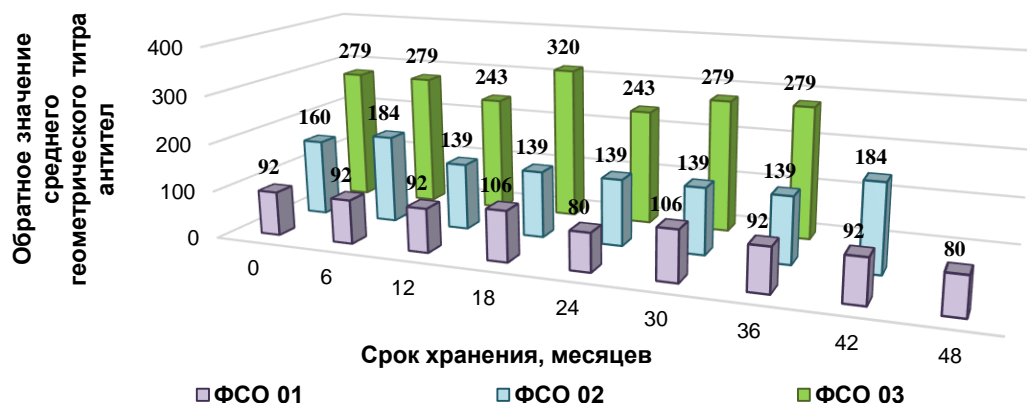


Рисунок 6 – Результаты анализа стабильности ФСО по данным реакции торможения гемагглютинации

Отсутствие изменения специфической активности по данным РТГА на протяжении срока хранения подтверждено статистически ($p > 0,05$ для критерия Краскела – Уоллиса).

В ИФА стабильность ФСО экспериментальной серии 01 оценена относительно образцов этой же серии, хранившихся при температуре минус 80 °С (базовая линия). Содержание IgG к вирусу КЭ в экспериментальных сериях 02 и 03 определено относительно ФСО экспериментальной серии 01. Специфическая активность выражена в % относительно соответствующего аттестованного значения. За минимальную величину принята нижняя граница неопределенности – 80 %. Результаты мониторинга стабильности по данным ИФА представлены на рисунке 7.

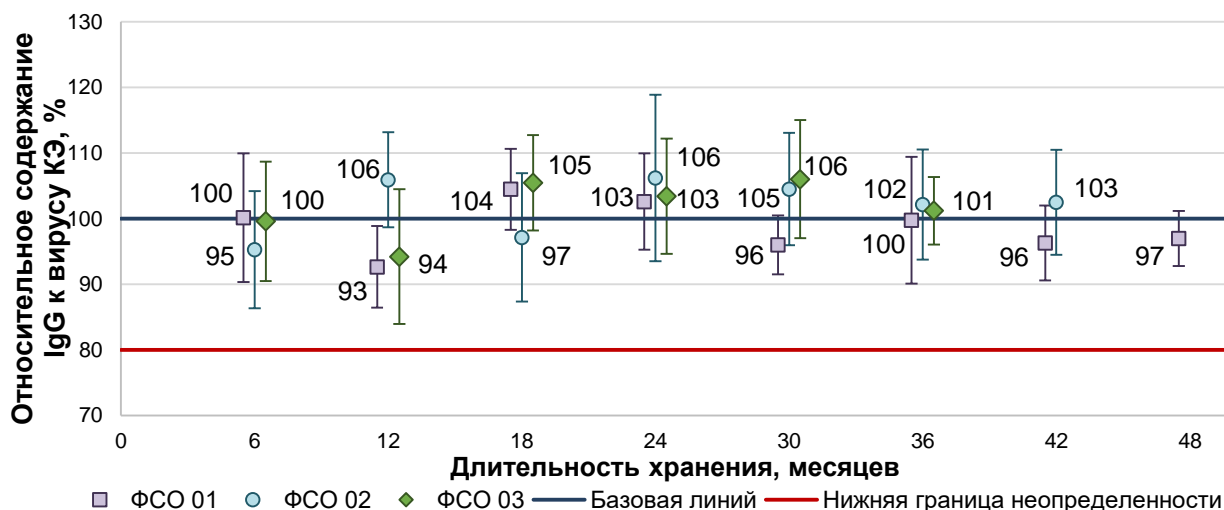


Рисунок 7 – Результаты анализа стабильности ФСО по данным иммуноферментного анализа

В результате анализа корреляции концентрации антител и продолжительности хранения ФСО показано отсутствие устойчивых трендов изменения содержания IgG к вирусу КЭ ($r_{s01} = -0,21$, $r_{s02} = 0,14$, $r_{s03} = 0,30$). Постоянство специфической активности подтверждено статистической эквивалентностью результатов, полученных в разные периоды наблюдения на протяжении хранения ($p_{01} = 0,27$, $p_{02} = 0,38$, $p_{03} = 0,34$).

Поскольку для установления срока годности ФСО необходимо доказать сохранность специфической активности по результатам исследования трех экспериментальных серий, сделан вывод о его стабильности в течение 3 лет при температуре хранения от 2 до 8 °С с возможностью продления срока годности по данным мониторинга стабильности.

Усовершенствование методики определения специфической активности на основе реакции торможения гемагглютинации

Методика на основе РТГА усовершенствована введением коэффициента пересчета k , учитывающего смещение фактического титра антител в ФСО относительно его аттестованного значения. Специфическую активность препарата (T) рассчитывали по отношению к ФСО по формуле:

$$T = k \cdot T_{\text{обр}} = \frac{A_{\text{ФСО}}}{T_{\text{ФСО}}} \cdot T_{\text{обр}}, \quad (1)$$

где k – коэффициент пересчета;
 $T_{\text{обр}}$ – фактическое значение титра антител к вирусу КЭ в исследуемом образце;
 $A_{\text{ФСО}}$ – аттестованное значение ФСО;
 $T_{\text{ФСО}}$ – фактическое значение титра антител к вирусу КЭ в ФСО.

Предложенная модификация методики проверена с использованием образцов 9 серий иммуноглобулина человека против КЭ трех производителей. Согласно паспортным данным специфическая активность препаратов двух серий составляла 1:320 (образцы № 8 и № 9), остальных – 1:160. Результаты трех испытаний с участием специалистов двух независимых лабораторий представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты определения специфической активности коммерческих серий иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием ФСО

№ образца препарата, критерий	Специфическая активность препарата	
	без использования ФСО	с использованием ФСО, вычисленная по формуле (1)
1 – 7	от 1:160 до 1:320	1:160
8, 9	от 1:320 до 1:640	1:320
Разница между результатами двух независимых лабораторий	шаг титрования	данные совпадают

Установлено, что размах варьирования фактических данных составил шаг титрования. После корректировки значений титра с учетом коэффициента k результаты определения специфической активности, полученные двумя специалистами, не различались. При оценке прецизионности методики показано отсутствие разброса значений титра антител ($n = 27$). Правильность подтверждена нахождением величины специфической активности ФСО в пределах неопределенности аттестованного значения – от 1:80 до 1:160 ($n = 6$). На основании полученных данных сделан вывод о пригодности усовершенствованной методики для оценки специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ.

Разработка методики определения специфической активности на основе иммуноферментного анализа

Исследования проведены с использованием тест-систем для ИФА двух отечественных и четырех зарубежных производителей, выбор которых основывался на коммерческой доступности и имеющейся регистрации в РФ. Препараты иммуноглобулина человека против КЭ и ФСО анализировали в серийных разведениях. По результатам анализа 528 кривых «доза-отклик» установлено, что в разведении со значением ОП 0,5 в 98 % случаев выполнялось условие их линейности и параллельности. Это позволило упростить вычисления и использовать обработку не кривой в целом, а области вблизи точки с ОП, равной 0,5. Разработанный алгоритм расчета состоял из 4 этапов: (1) логарифмирование по основанию 2 (\log_2) значений ОП и величин обратных разведений препарата и стандарта; (2) построение линий регрессии вида $y = b \times x + a$ (где $x = \log_2$ ОП; $y = \log_2$ обратного разведения) и проверка условия $R^2 > 0,95$; (3) расчет по уравнениям линий регрессии значений y при $x = \log_2 0,5 = -1$ для исследуемого препарата и ФСО; (4) вычисление концентрации IgG к вирусу КЭ в исследуемом препарате по формуле:

$$C = 2^{y_{\text{ИГ}} - y_{\text{ФСО}}} \times A_{\text{ФСО}} \quad (2)$$

где C – концентрация IgG к вирусу КЭ в исследуемом препарате, ЕД/мл;
 $y_{\text{ИГ}}$ – \log_2 обратного разведения исследуемого препарата при ОП=0,5;
 $y_{\text{ФСО}}$ – \log_2 обратного разведения ФСО при ОП=0,5;
 $A_{\text{ФСО}}$ – аттестованное значение ФСО, ЕД/мл

Разработанный способ расчета сравнили с референсным методом параллельных линий. Для этого в серийных разведениях исследованы ФСО и 4 препарата иммуноглобулина. В результате для одноименных образцов установлено отсутствие различий средних значений концентрации IgG к вирусу КЭ, полученных с использованием разных вычислительных приемов ($p > 0,05$). Помимо этого, доказана математическая тождественность данных (их взаимозаменяемость), так как коэффициенты b были близки 1, а свободные члены a являлись незначимыми ($p > 0,05$), уравнения регрессии преобразованы в равенство $y = x$ (рисунок 8).

Следующим этапом экспериментального обоснования методики явилась ее валидация. Образцами для проведения исследований служили иммуноглобулины человека против КЭ со специфической активностью 1:160 и 1:320 трех производителей; ФСО экспериментальной серии 01 со специфической активностью 1:80 и иммуноглобулин человека нормальный (плацебо). В качестве стандарта использован ФСО экспериментальной серии 03 с аттестуемой характеристикой (360 ± 75) ЕД/мл. Специфичность, линейность, правильность, повторяемость, промежуточная прецизионность оценены по результатам 10 определений IgG к вирусу КЭ с использованием каждой из тест-систем: ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG, ВектоВКЭ-IgG, Anti-TBE Virus ELISA, TBEV/FSME IgG ELISA.

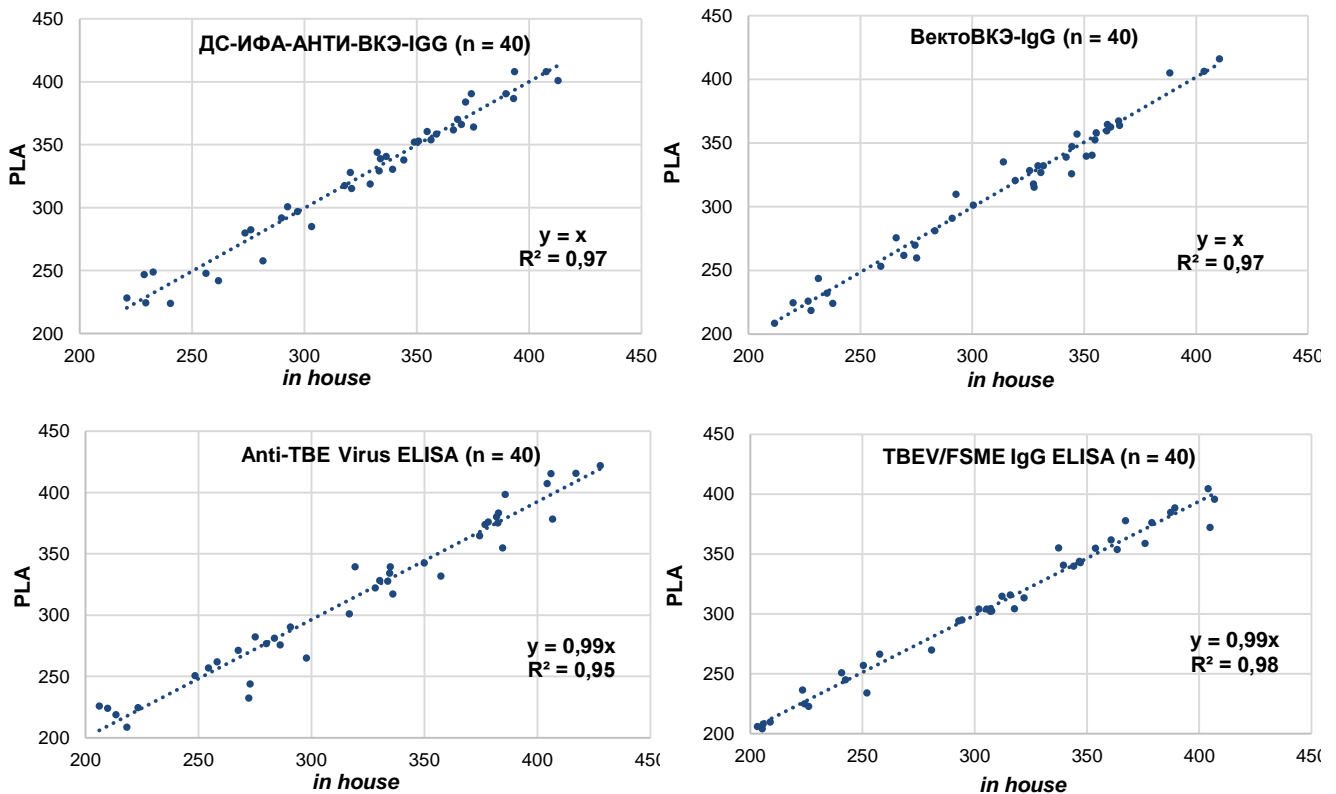


Рисунок 8 – Графики зависимости результатов определения содержания IgG к вирусу КЭ (ЕД/мл), полученные с использованием разработанной математической модели (*in house*) и метода параллельных линий (*PLA*)

Специфичность методики подтверждена тем, что иммуноглобулины человека против КЭ и ФСО обладали специфической активностью ($n = 160$), в образце плацебо IgG к вирусу КЭ не выявлены ($n = 40$). Значение коэффициентов детерминации зависимости аналитического сигнала (\log_2 ОП) от содержания анализируемого вещества (\log_2 обратного разведения образца) были выше 0,95 ($n = 160$), что указывало на **линейность** методики в пределах диапазона применения. **Правильность** оценена с использованием ФСО экспериментальной серии 01. Методика соответствовала установленному критерию, поскольку вычисленные на основании экспериментальных данных доверительные интервалы среднего значения стандарта находились в пределах неопределенности аттестованного значения от 200 до 296 ЕД/мл ($n = 40$). Размах варьирования среднего значения относительно аттестованного соответствовал интервалу от минус 3,6 до 1,6 %. **Прецизионность** методики в условиях повторяемости характеризовалась коэффициентами вариации от 4 до 12 %, в условиях воспроизводимости (факторы: время и тест-система) – от 6 до 10 %, и не превышала 15 %. Различия дисперсий и средних результатов, полученных с использованием разных наборов реагентов, были незначимы ($p > 0,05$). По итогам проведенных исследований сделан вывод о том, что разработанная методика ИФА с использованием ФСО пригодна для контроля специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ.

Экспериментальное изучение специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием фармакопейного стандартного образца

Образцами для исследования явились 68 коммерческих серий иммуноглобулина человека против КЭ, выпущенных АО «НПО «Микроген» (n = 36) и ГБУЗ «ЧОСПК» (n = 32). Результаты определения специфической активности с использованием ФСО представлены на рисунке 9. Титр антител к вирусу КЭ в исследуемых препаратах составил 1:80, 1:160 и 1:320, концентрация IgG варьировала от 223 ЕД/мл до 649 ЕД/мл.

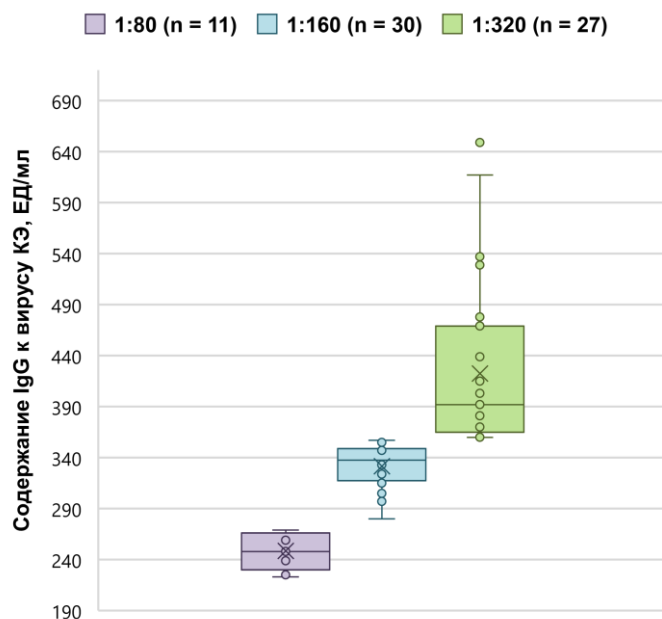


Рисунок 9 – Специфическая активность лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита

Различия в результатах ИФА между иммуноглобулинами со специфической активностью 1:80, 1:160 и 1:320 являлись значимыми ($p < 0,0001$). При этом коэффициент корреляции r_s , равный 0,89, свидетельствовал о высокой степени связи данных двух методов. Все это указывало на возможность нахождения соотношения между результатами ИФА и РТГА. На основании экспериментальных данных оценки специфической активности с использованием ФСО эмпирически установлено соответствие титра антител диапазону концентрации IgG к вирусу КЭ (таблица 8).

Таблица 8 – Результаты экспериментальной оценки соответствия титра антител диапазону концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита

Титр антител к вирусу КЭ по данным РТГА	Содержание IgG к вирусу КЭ по данным ИФА, ЕД/мл
1:80	200* – 269
1:160	270 – 359
1:320	360 – 650

* Нижняя граница установлена по результатам аттестации ФСО первого выпуска в ИФА.

В рамках обоснования экономической целесообразности применения ФСО показано, что затраты в размере 0,04 % от стоимости серии иммуноглобулина, связанные с применением стандарта, существенно ниже даже минимальных убытков, связанных с риском выбраковки серии препарата по показателю качества «специфическая активность», которые составляют 38 % от стоимости серии. Таким образом, применение ФСО для оценки основного показателя качества иммуноглобулина человека против КЭ представляется экономически эффективным.

По результатам выполненных исследований разработана нормативно-технологическая документация на ФСО ГФ РФ 3.1.00453: инструкция по изготовлению, контролю и аттестации, проекты паспорта и инструкции по применению ФСО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате научного анализа современного состояния проблемы оценки специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ показана необходимость совершенствования методики на основе РТГА и разработки унифицированной методики на основе ИФА с применением ФСО. На момент начала наших исследований стандарт содержания антител IgG человека к вирусу КЭ в РФ и за рубежом отсутствовал.

В результате проведенного исследования обоснован способ получения ФСО, заключающийся в стабилизации раствора иммуноглобулина, произведенного из иммунной плазмы крови доноров, *l*-пролином и глицином в количестве по 12,5 г/л, корректировке рН до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе при непрерывном перемешивании и лиофилизации, который обеспечивает близость состава и свойств ФСО контролируемым препаратам, внутрисерийную однородность и стабильность аттестованного значения на протяжении 3 лет (с возможностью продления срока годности по данным мониторинга стабильности).

Проведена межлабораторная аттестация ФСО методами РТГА и ИФА. За аттестованное значение в РТГА принята медиана результатов, за неопределенность – доверительный интервал медианы. Предложен алгоритм определения аттестуемой характеристики ФСО в ИФА, заключающийся в построении калибровочных кривых; проверке их линейности и адекватности; расчете коэффициентов активности и их стандартного отклонения *s*. За нижнюю границу неопределенности принята величина обратного титра вируснейтрализующих антител, установленного в результате биологической стандартизации ФСО. Аттестованное значение и верхняя граница неопределенности рассчитаны с учетом $2s$. Относительно первой экспериментальной серии аттестованы два повторных выпуска ФСО методом параллельных линий. В результате получены аттестуемые характеристики трех экспериментальных серий ФСО – 1:80 (1:80 – 1:160), 1:160 (1:80 – 1:160), 1:320 (1:160 – 1:320) по данным РТГА и (248 ± 48) ЕД/мл, (297 ± 61) ЕД/мл и (360 ± 75) ЕД/мл по данным ИФА.

Усовершенствована методика на основе РТГА и доказана ее пригодность для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ. Для расчета содержания антител введен коэффициент, учитывающий смещение фактического титра антител в стандарте относительно его аттестованного значения. Благодаря использованию ФСО достигнута статистическая эквивалентность результатов, полученных разными специалистами, и повышена точность определения специфической активности.

Разработана методика на основе ИФА и доказана ее пригодность для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ. Концентрация IgG к вирусу КЭ в препарате рассчитана по отношению к активности ФСО в точке со значением ОП 0,5, что позволяет унифицировать результаты, полученные с использованием разных наборов реагентов для ИФА, и упростить вычисления. Доказана эквивалентность данных разработанной математической модели и референсного метода параллельных линий. Установлена специфичность и линейность методики, прецизионность подтверждена коэффициентом вариации, не превышающим 15 %, правильность характеризуется смещением среднего значения относительно аттестованного – от минус 3,6 до 1,6 %.

С использованием разработанного ФСО определена специфическая активность 68 серий иммуноглобулина человека против КЭ. По данным РТГА преобладают препараты с титром антител 1:160 и 1:320. Впервые препараты охарактеризованы по концентрации IgG к вирусу КЭ в ИФА, которая составляет от 223 до 649 ЕД/мл. Установлено соответствие результатов ИФА данным РТГА для перевода концентрации IgG, выраженной в ЕД/мл, в титры антител. В результате экономического обоснования показано, что применение ФСО является эффективным, поскольку значительно снижает затраты на производство иммуноглобулина человека против КЭ, связанные с риском выбраковки серии по показателю качества «специфическая активность». По результатам выполненных исследований разработана нормативно-технологическая документация на ФСО, что дает возможность осуществлять его серийный выпуск.

Практические рекомендации. ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ создан для специалистов, занимающихся фармацевтической разработкой, промышленным производством, контролем, экспертизой качества и государственной регистрацией препаратов иммуноглобулина человека против КЭ, и рекомендован к использованию для оценки качества указанных лекарственных средств.

Перспективы дальнейшей разработки темы. ФСО может быть использован при разработке методики определения специфической активности донорской плазмы на основе ИФА. Это позволит осуществлять отбор иммунного сырья для производства иммуноглобулина человека против КЭ по концентрации IgG, выраженной в ЕД/мл.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный способ получения ФСО, заключающийся в стабилизации раствора иммуноглобулина человека против КЭ *I*-пролином и глицином в количестве по 12,5 г/л, корректировке рН до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе при непрерывном перемешивании и лиофилизации, позволяет осуществлять выпуск целевого продукта, характеризующегося внутрисерийной однородностью (погрешность от неоднородности не выше 3 %) и постоянством аттестованного значения в течение 3 лет.

2. Аттестуемые характеристики ФСО трех экспериментальных серий составили 1:80, 1:160 и 1:320 с неопределенностью не более шага двукратного разведения в РТГА, а также (248 ± 48) ЕД/мл, (297 ± 61) ЕД/мл и (360 ± 75) ЕД/мл в ИФА.

3. Усовершенствованная методика определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на основе РТГА, предусматривающая модификацию способа обработки данных и использование ФСО, позволяет повысить точность определения титра антител к вирусу КЭ за счет снижения вариабельности результатов.

4. Разработанная методика определения специфической активности на основе метода ИФА, предусматривающая обработку линий регрессии стандарта и исследуемого препарата вблизи точки с оптической плотностью 0,5, обеспечивает унификацию результатов определения содержания IgG к вирусу КЭ, полученных с использованием разных тест-систем.

5. Полученные с применением разработанного ФСО результаты оценки специфической активности свидетельствуют о том, что на территории РФ преобладают лекарственные препараты иммуноглобулина человека против КЭ с титром антител 1:160 и 1:320, что соответствует концентрации IgG к вирусу КЭ от 270 до 650 ЕД/мл по данным ИФА.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. **Кормщикова, Е.С.** Разработка математической модели оценки результатов определения антител человека к вирусу клещевого энцефалита / Е.С. Кормщикова, Е.В. Хлыбова, А.В. Дробкова // Биофармацевтический журнал. – 2016. - № 3 (8). – С.35-43. Scopus, IF РИНЦ 0,243.

2. **Кормщикова, Е.С.** Проблема оценки специфической активности препаратов иммуноглобулинов человека против клещевого энцефалита / Е.С. Кормщикова, Е.В. Росина, И.В. Парамонов, А.В. Рылов, Э.Ю. Кудашева // Российский иммунологический журнал. – 2016. - № 1-2 (10(19)). – С.475-477. ВАК, IF РИНЦ 0,253.

3. **Кормщикова, Е.С.** Биотехнологические подходы к получению стабильной формы стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита / Е.С.

Кормщикова, Е.В. Росина, К.А. Воробьев, И.В. Парамонов, Э.Ю. Кудашева // Биотехнология. – 2021. – Т.37. – № 3. С. 42 – 52. Scopus, IF РИНЦ 0,706.

Патент РФ на изобретение

Способ получения стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита: № 2735782, C12N 15/00 / **Е.С. Кормщикова**, Е.В. Росина, К.А. Воробьев, И.В. Парамонов, Э.Ю. Кудашева; заявитель и патентообладатель ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России (RU). Заявл. 03.04.2020, опубл. 09.11.2020, бюл. № 31.

Публикации в сборниках научно-практических конференций и других изданиях

1. **Савельева (Кормщикова), Е.С.** Влияние стабилизаторов на сохранность антител в препаратах лиофилизированного иммуноглобулина / Е.С. Савельева, Е.В. Хлыбова, Е.Ю. Савиных, А.В. Дробкова // Вестник гематологии. – 2011. - № 1 (8). – С.102-103.

2. Дробкова, А.В. Валидация методики определения специфической активности препаратов иммуноглобулина / А.В. Дробкова, Е.Н. Калинина, Е.В. Хлыбова, **Е.С. Савельева (Кормщикова)**, Е.Ю. Савиных // Трансфузиология. – 2011. - № 2 (12). – С.58.

3. **Савельева (Кормщикова), Е.С.** Определение антител к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках и плазме крови доноров / Е.С. Савельева, Е.В. Хлыбова, А.В. Дробкова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Вопросы трансфузиологии и клинической медицины (Епифановские чтения)». – Киров. – 2012. – С.29-30.

4. **Савельева (Кормщикова), Е.С.** Оценка содержания антител к вирусу клещевого энцефалита методами реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментного анализа / Е.С. Савельева, Е.В. Хлыбова, А.В. Дробкова // Материалы VII съезда гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии». – Минск: РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий. – 2012. – С.145-148.

5. **Савельева (Кормщикова), Е.С.** Использование уравнения Аррениуса для изучения стабильности иммуноглобулиновых препаратов / Е.С. Савельева, Е.В. Хлыбова, А.В. Дробкова // Материалы 81-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины». – Иркутск: ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет». – 2014. – С.357.

6. **Кормщикова, Е.С.** Выбор композиции стандартного образца антител человека к вирусу клещевого энцефалита / Е.С. Кормщикова, Е.В. Хлыбова, А.В. Дробкова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные

вопросы трансфузиологии и клинической медицины». – Киров: ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. – 2015. – С.82-84.

7. **Кормщикова, Е.С.** Оценка возможности применения метода «ускоренного старения» для изучения стабильности концентратов антител человека / Е.С. Кормщикова, Е.В. Хлыбова, А.В. Дробкова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины». – Киров: ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. – 2015. – С.85-88.

8. **Кормщикова, Е.С.** Сравнительный анализ количественного определения содержания антител IgG к вирусу клещевого энцефалита с использованием различных иммуноферментных тест-систем / Е.С. Кормщикова, И.В. Парамонов, А.В. Рылов, Э.Ю. Кудашева // Медицинская иммунология. – 2017. - № S (19). – 255-256.

9. **Кормщикова, Е.С.** Анализ специфической активности препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита / Е.С. Кормщикова, К.А. Воробьев, И.В. Парамонов, Э.Ю. Кудашева // Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии: сб. материалов междунар. научн.-практ. конф. / [редкол.: И.В. Парамонов (отв. ред.) и др.] – Киров: ООО «Флат-Принт», 2021. – с. 37 – 39.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ИФА	иммуноферментный анализ
КЭ	клещевой энцефалит
ОП	оптическая плотность
ОФС	общая фармакопейная статья
РТГА	реакция торможения гемагглютинации
РФ	Российская Федерация
ФСО	фармакопейный стандартный образец
IgG	иммуноглобулин класса G
in house метод	разработанный способ определения концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита в иммуноферментном анализе
PLA	(англ. Parallel-line assay) метод параллельных линий
ГБУЗ СО «ОСПК»	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная станция переливания крови»
ГБУЗ «ЧОСПК»	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Челябинская областная станция переливания крови»
ИЦЭК МИБП	Испытательный центр экспертизы качества медицинских
ФГБУ «НЦЭСМП»	иммунобиологических препаратов Федерального государственного
Минздрава России	бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»