

УДК 615.373:615.065

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Корнилова О.Г.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России,
Москва, e-mail: Kornilova@expmed.ru

Представлен литературный обзор по проблемам оценки специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека. Нежелательные эффекты, которые могут быть спровоцированы инфузиями препаратов крови человека, обусловлены спонтанной активацией системы комплемента с образованием анафилатоксинов, активацией калликреин-кининовой, плазминовой систем и системы свертывания крови, изменением реологических свойств крови, инициацией внутрисосудистого гемолиза. Проведен анализ современных аспектов изучения антикомплемментарной активности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения, содержания в них геммагглютининов, анти-D антител, активатора прекалликреина. Рассмотрены возможности изучения тромбогенного потенциала препаратов иммуноглобулинов на этапе фармацевтической разработки, показана необходимость анализа потенциального риска развития тромбогенных осложнений иммуноглобулинотерапии в совокупности с особенностями технологического процесса производства препаратов. Продемонстрированы особенности российских национальных стандартов качества препаратов иммуноглобулинов человека в отношении их специфической безопасности и сделан вывод о необходимости их дальнейшей гармонизации с международными требованиями.

Ключевые слова: препараты иммуноглобулинов человека для внутривенного введения, специфическая безопасность, антикомплемментарная активность, геммагглютинины, анти-D антитела, активатор прекалликреина, тромбогенный потенциал

MODERN ASPECTS OF STUDYING SPECIFIC SECURITY PREPARATIONS OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS

Kornilova O.G.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: Kornilova@expmed.ru

There is presented a literature review concerning specific security evaluation of preparations of human immunoglobulins. Adverse effects that can be provoked by infusions of human blood preparations are caused by spontaneous activation of the complement cascade forming anaphylatoxins, activation of kallikrein-kinin activation, plasmin system and blood coagulation system, blood rheology change, the initiation of intravascular hemolysis. The analysis of the current aspects study of anticomplementary activity of human immunoglobulin preparations for intravenous administration, content of hemagglutinins, anti-D antibodies, prekallikrein activator is conducted. The possibilities of preparations of human immunoglobulins thrombogenic potential studying at pharmaceutical development stage are considered, the necessity of the analysis of immunoglobulin therapy thrombogenic complications potential risk in conjunction with the features of the technological process of production of drugs is demonstrated. Special aspects of Russian national quality standards of preparations of human immunoglobulins in relation to their specific security are demonstrated and there is a conclusion about necessity of their further harmonization with international requirements.

Keywords: preparations of human immunoglobulins specific security, anticomplementary activity, hemagglutinins, anti-D antibodies, activator prekallikrein, thrombogenic potential

Препараты иммуноглобулинов человека для внутривенного введения (ИГЧВВ) являются неотъемлемой частью схем терапии иммунодефицитных состояний и аутоиммунных заболеваний, используются для профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций, а также при лечении неврологических, онкологических и гематологических заболеваний. Большинство схем лечения предусматривает неоднократное введение этих препаратов в больших объемах. Наряду с высокой терапевтической эффективностью и низкой аллергенностью, препараты ИГЧВВ обладают способностью к спонтанной активации системы компле-

мента с образованием анафилатоксинов, активации калликреин-кининовой, плазминовой систем и системы свертывания крови, изменению реологических свойств крови, инициации внутрисосудистого гемолиза [7, 13, 18-20, 26, 28]. Это влияние может быть обусловлено остаточным содержанием в готовом препарате таких компонентов плазмы крови, как анти-D антитела, геммагглютинины, активатор прекалликреина (АП), активированные факторы свертывания крови, связанным с невозможностью на этапах технологического процесса полностью исключить контаминацию готовой формы препарата «нецелевыми» белками плазмы крови.

Кроме того в процессе изготовления и/или хранения возможны конформационные изменения молекул иммуноглобулинов. Для минимизации риска развития осложнений к препаратам ИГЧВВ предъявляют высокие требования специфической безопасности, которую характеризуют такие показатели качества, как: «Антикомплементарная активность», «Анти-А и анти-В гемагглютинины», «Анти-Д антитела», «Активатор прекалликреина».

В соответствии с фармакопейными требованиями, антикомплементарная активность (АКА) выражается как расход комплемента в испытуемом образце по отношению к контрольному комплементу, принятому за 100% (норма не более 50%), что соответствует допустимому пределу АКА – не более 1 СН₅₀ на 1 мг белка иммуноглобулина [2, 12]. Этот уровень АКА позволяет минимизировать риск спонтанной активации комплемента, которая клинически может проявляться одышкой, дрожью, в редких случаях реакциями анафилактического типа [7]. Определение антикомплементарной активности ИГЧВВ основано на способности иммуноглобулинов человека связывать комплемент, препятствуя лизису сенсibilизированных эритроцитов барана. Методика впервые утверждена в составе Европейской Фармакопеи (ЕФ) в 1994 г., в настоящее время используется в качестве стандартного унифицированного метода испытаний ИГЧВВ всеми мировыми производителями. В Российской Федерации (РФ) до 2016 г. существовали методики, отличные от признанной в мире. С введением в действие Государственной фармакопеи РФ XIII выпуска (ГФ XIII), в состав которой вошла гармонизированная с ЕФ и оптимизированная методика, изучение антикомплементарной активности ИГЧВВ российскими производителями соответствует мировым стандартам [3, 4]. К спонтанному связыванию комплемента способны агрегированные и/или конформационно измененные в процессе производства или хранения молекулы иммуноглобулинов [26]. В связи с этим препараты ИГЧВВ подлежат испытанию методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на содержание полимеров и агрегатов, суммарное количество которых не должно превышать 3% [2, 12].

В соответствии с международными и российскими требованиями препараты ИГЧВВ получают из объединенной плазмы более 1000 доноров [2, 12, 37], что обуславливает высокую вероятность содержания в них анти-А и анти-В гемагглютининов, а также анти-Д антител. Количество гемагглютининов и их принадлежность к им-

муноглобулинам классов М (IgM) или G (IgG) зависит от превалирования в производственном пуле плазмы доноров с группой крови I(0), II(A) и/или III(B). Инфузии пациентам (не I группы крови) больших объемов препаратов ИГЧВВ, содержащих гемагглютенины, могут вызвать интраваскулярный гемолиз с резким снижением гемоглобина, гематокрита, ретикулоцитозом, гипербилирубинемией, гемоглобинурией и другими симптомами, вплоть до почечной и полиорганной недостаточности, а также внесосудистые нежелательные эффекты, связанные с активацией макрофагов [6, 8, 9]. Для исключения подобных осложнений в препаратах ИГЧВВ нормируется содержание анти-А и анти-В гемагглютининов. Международные требования устанавливают допустимый предел содержания гемагглютининов, соответствующий разведению ИГЧВВ 1:64, в котором отсутствует агглютинация тестовых эритроцитов. До 2012 г. в ЕФ был регламентирован один метод определения содержания анти-А и анти-В антител – непрямой гемагглютинации. Актуальная версия ЕФ предусматривает использование методов непрямой и прямой гемагглютинации, причем для количественного определения рекомендована реакция прямой гемагглютинации [12]. Следует отметить, что изменение метода контроля препаратов ИГЧВВ не привело к снижению числа случаев гемолитических осложнений иммуноглобулинотерапии, связанных с содержанием гемагглютининов [31]. Более того, применение современных технологий, позволяющих сохранить максимально полный спектр антител в препаратах ИГЧВВ, обуславливает увеличение содержания в них гемагглютининов [30]. Допустимость использования двух методов изучения содержания гемагглютининов при высокой вариабельности результатов не позволяет в полной мере достоверно оценить уровень безопасности применения конкретного препарата ИГЧВВ, в том числе в сравнении с аналогами. В РФ порядок определения анти-А и анти-В гемагглютининов в препаратах ИГЧВВ регламентирует общая фармакопейная статья в составе ГФ XIII, предусматривающая проведение испытаний методом непрямой гемагглютинации «на плоскости» или в геле, нормы содержания соответствуют международным требованиям [2].

До введения международных требований около 6% коммерческих препаратов ИГЧВВ содержали анти-Д антитела в количестве, превышающем 0,0475 МЕ/мл (агглютинация в разведении 1:16 – 1:32) [23, 33]. Инфузии больших объемов таких пре-

паратов приводили к развитию интраваскулярного гемолиза у резус-положительных пациентов [9, 15, 24]. Для исключения подобных осложнений иммуноглобулинотерапии в международную практику производства препаратов ИГЧВВ с 2006 г. введено нормирование содержания анти-D антител: не более титра положительного стандарта в модифицированной реакции Кумбса [12, 23]. Положительный стандарт содержит анти-D антитела в количестве, соответствующем антирезусной активности 0,0475 МЕ/мл (агглютинация в разведении 1:8). Для препаратов ИГЧВВ российского производства до настоящего времени отсутствовали требования по содержанию анти-D антител. Однако с введением в действие ГФ XIII этот пробел в нормировании специфической безопасности отечественных иммуноглобулинов устранен: изучение содержания в них анти-D антител соответствует мировым стандартам [2].

Присутствие в ИГЧВВ АП, являющегося биологически активным фрагментом фактора свертывания крови XII (фактора Хагемана), обуславливает возможность гипотензивного эффекта. АП активизирует прекалликреин, переводя его в калликреин, который, в свою очередь, вызывает активацию кининового пути по принципу положительной обратной связи и приводит к вазодилатации и гипотензии [6, 21, 29]. Нормирование содержания АП в препаратах ИГЧВВ в количестве не более 35 МЕ/мл было установлено ЕФ в 1998 г. и является актуальным в настоящее время [12]. Метод определения основан на превращении прекалликреина в калликреин в присутствии АП, а образовавшийся калликреин способен отщеплять хромофор (п-нитроанилина) от синтетического хромогенного субстрата, что позволяет определять скорость протеолиза спектрофотометрическим методом. Российские производители не изучают содержание АП в ИГЧВВ, что не позволяет в полной мере оценить безопасность их применения [5].

Возможность возникновения тромбоэмболических осложнений при внутривенном применении иммуноглобулинов, включая инсульт, инфаркт миокарда, тромбоэмболию легочной артерии и тромбоз глубоких вен/артерий, указана в инструкциях по применению всех ИГЧВВ зарубежных производителей и одного — отечественного [1]. Ранее эти осложнения связывали исключительно с повышением вязкости крови при введении препарата, а возможным способом их исключения являлось соблюдение режима дозирования и скорости инфузии [8]. Инцидент значи-

тельного повышения частоты возникновения тромбоэмболических осложнений, произошедший в 2010 г. при применении серий препарата Октагам, раствор для инфузий 50 мг/мл, обусловил необходимость тщательного выяснения причин [34]. Проведенные исследования позволили выявить, что переносимость ИГЧВВ 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 [10, 22]. Так, тромбогенный потенциал серий препарата Октагам был связан с контаминацией готовой формы фактором свертывания крови XI (XIa) [11, 14]. В связи с этим, Комиссия Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранения (EDQM) пересмотрела требования к производству и качеству препаратов ИГЧВВ и утвердила новую редакцию монографии «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения», в соответствии с которой ужесточаются требования к производству препаратов в части доказательства элиминации тромбообразующих агентов и отсутствия тромбогенного потенциала готовой формы препарата [12]. За тромбогенные осложнения ответственны, главным образом, активированный фактор XI, факторы протромбинового комплекса, калликреин. Важно не столько их содержание, оцененное по количеству антигена, сколько проявляемая активность, а также влияние на эффекторное звено каскада свертывания крови — синтез тромбина. [16, 28, 35, 38]. Для оценки тромбогенного потенциала препаратов такими производителями, как Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес, Биотест Фарма, Институт Грифолз, выбраны три основных параметра: изменение кинетики образования тромбина стандартной (нормальной) плазмы крови человека в тесте генерации тромбина; активность прокоагулянтных факторов свертывания крови (II, VII, IX, X, XI); а так же изменение неактивированного частичного тромбопластинового времени стандартной (нормальной) плазмы крови человека [17, 27, 35]. При определении активности прокоагулянтных факторов свертывания крови в препаратах иммуноглобулинов человека особое внимание уделяют их активированным формам, применяя как клоттинговые методы, так и хромогенные. Кроме того, при интерпретации полученных результатов учитывают наличие контаминантов, обладающих антикоагулянтным действием, например, антитромбина III. Тромбо-

генный потенциал препаратов ИГЧВВ также изучают *in vivo* методом S. Wessler, моделируя у кроликов сочетание венозного застоя и гиперкоагуляции при введении препарата иммуноглобулина [25, 32, 36].

Таким образом, современные аспекты изучения специфической безопасности препаратов ИГЧВВ охватывают все известные на сегодняшний день потенциальные риски иммуноглобулинотерапии, связанные с негативным влиянием на системы гемостаза, комплемента и калликреин-кининовую. Биологическая природа исходного сырья в сочетании с технологическими особенностями производства ИГЧВВ обуславливает наличие в этих препаратах остаточного количества «нецелевых» белков плазмы крови или конформационно измененных молекул иммуноглобулинов. Соответствие нормативным требованиям по АКА, содержанию полимеров и агрегатов, гемоглобину, анти-D антител и АП в сочетании с доказанным отсутствием тромбогенного потенциала обеспечивает безопасность их применения. Разработка в РФ национальных стандартов качества, гармонизированных с международными требованиями, обуславливает конкурентоспособность отечественных препаратов ИГЧВВ на фармацевтическом рынке. Нормирование содержания АП и анализ тромбогенного потенциала являясь перспективными направлениями повышения их качества.

Список литературы

1. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]: URL: <http://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 01.10.2015 г.).
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс] URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/ (дата обращения: 17.06.2016).
3. Кривых М.А. Оптимизация условий определения антикомплемментарной активности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения / М.А. Кривых, О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян, Э.Ю. Кудашева // Химико-фармацевтический журнал. – 20015. – Т. 49, № 7. – С. 39-42.
4. Кривых М.А. Разработка фармакопейной методики определения антикомплемментарной активности препаратов иммуноглобулинов человека / М.А. Кривых, О.Г. Корнилова, Н.Д. Бунятян, Э.Ю. Кудашева // Химико-фармацевтический журнал. – 20016. – Т. 50, № 5. – С. 47-49.
5. Кривых М.А. Методология оценки содержания активатора прекалликреина в препаратах крови человека / М.А. Кривых, О.Г. Корнилова // Российский иммунологический журнал. – 20016. – Т. 10 (19), № 2 (1). – С. 447-449.
6. Berard R. Hemolytic anemia following intravenous immunoglobulin therapy in patients treated for Kawasaki disease: a report of 4 cases / R. Berard, B. Wittemore, R. Scuccimarrì // *Pediatric Rheumatology*. – 2012. – V. 10 [Электронный ресурс] URL: <http://www.ped-rheum.com/> (дата обращения: 12.12.2015 г.).
7. Buchacher A. Anticomplementary activity of IVIG concentrates – important assay parameters and impact of IgG polymers / A. Buchacher, P. Schluga, J. Mullner, M. Schreiner // *Vox Sang.* – 2010. – V. 98. – P. 209-218.
8. Comenzo R. Immune hemolysis, disseminated intravascular coagulation, and serum sickness after large doses of immune globulin given intravenously for Kawasaki disease / R. Comenzo, M.E. Malachowski, H.C. Meissner et al. // *J. Pediatr.* – 1992. – V. 20. – P. 926-928.
9. Copelan E.A. Hemolysis following intravenous immune globulin therapy / E.A. Copelan, P.L. Strohm, M.S. Kennedy et al. // *Transfusion*. – 1986. – V. 26. – P. 410-412.
10. Dhainaut F. In vitro and in vivo properties differ among liquid intravenous immunoglobulin preparations / F. Dhainaut, P.O. Guillaumat, H. Dib et al. // *Vox Sang.* – 2013. – V. 104(2). P. 115-126.
11. 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/> (дата обращения: 01.10.2015 г.).
12. European Pharmacopoeia [Электронный ресурс]: EDQM. 8th Ed. Доступ по подписке. Электронный ресурс] URL: <http://online6.edqm.eu/ep801/#> (дата обращения: 01.09.2015 г.).
13. Farrugia A. Manufacture of immunoglobulin products for patients with primary antibody deficiencies – the effect of processing conditions on product safety and efficacy / A. Farrugia, I. Quinti // *Front. Immunol.* – 2014. – V. 5. [Электронный ресурс] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/> (дата обращения: 12.10.2015 г.).
14. 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/> (дата обращения: 01.10.2015 г.).
15. Friedman D.F. Clinical impact of anti-D in intravenous immunoglobulin [Letter] / D.F. Friedman, M.B. Lukas, P.J. Larson, S.D. Douglas // *Transfusion*. – 1997. – V. 37. – P. 450-451.
16. 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. – Vol. 42. – P. 260-270.
17. Jose M. Pasteurization inactivates clotting enzymes during Flebogamma and Flebogamma DIF production / M. Jose, N. Marzo, M. Bono et al. // [Электронный ресурс] URL: <http://www.webmedcentral.com/> (дата обращения: 01.09.2015).
18. Kahwaji J. Acute hemolysis after high-dose intravenous immunoglobulin therapy in highly HLA sensitized patients / J. Kahwaji, E. Barker, S. Pepkowitz et al. // *Clin.J.Am.Soc. Nephrol.* – 2009. – V.4(12). – P. 1993-1997.
19. Katz U. Safety of intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy / U. Katz, A. Achiron, Y. Sherer et al. // *Autoimmunity Reviews*. – 2007. – Vol. 6. – P. 257-259.
20. Knezevic-Maramica. I. Intravenous immune globulins: an update for clinicians / I. Knezevic-Maramica, M.S. Kruskal // *Transfusion*. – 2003. – V.43. – P. 1460-1480.
21. 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. Sang.* – 2005. – V. 88. – P. 143-151.
22. Marzo N. Quantitative determination of relevant amounts of blood coagulation factor XI activity in a specific brand of intravenous immunoglobulin / N. Marzo, M. Jose, L. Lopez et al. // [Электронный ресурс] URL: <http://www.webmedcentral.com/> (дата обращения: 01.09.2015).
23. NIBSC. Therapeutic immunoglobulins. [Электронный ресурс] URL: <http://www.nibsc.org/> (дата обращения: 20.06.2016 г.).
24. Pisani G. Anti-D testing in intravenous immunoglobulins: shouldn't it be considered? [Letter] / G. Pisani, M. Wirz, G. Gentili // *Vox. Sang.* – 1996. – V. 71. – P. 132.
25. Public workshop: risk mitigation strategies to address procoagulant activity in immune globulin products [Электронный ресурс] URL: <http://www.fda.gov/> (дата обращения 15.06.2016 г.).

26. 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.
27. 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. Zoeching, K. Pock [Электронный ресурс] URL: <http://www.webmedcentral.com/> (дата обращения: 01.09.2015).
28. 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/> (дата обращения: 01.09.2015).
29. Shin I.S. An improved, reliable and practical kinetic assay for the detection of prekallikrein activator in blood products / I.S. Shin, Y.B. Shim, C.M. Hong et al. // *Arch. Pharm. Res.* – 2002. – V. 25. № 4. – P. 505-510.
30. Siani B. Isoagglutinin reduction in human immunoglobulin products by donor screening / B. Siani, K. Willmann, S. Wymann et al. // *Biol. Ther.* – 2014. – Vol. 4(1-2). – P. 15-26 [Электронный ресурс] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 12.10.2015 г.).
31. Späth P.J. On the dark side of therapies with immunoglobulin concentrates: the adverse events / P.J. Späth, G. Granata, F. La Marra et al. // *Front. Immunol.* – 2015. – V. 6. [Электронный ресурс] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/> (дата обращения: 12.10.2015 г.).
32. Turecek P.L. Minimizing procoagulant impurities in IVIG products Baxter's approach [Электронный ресурс] URL: <http://www.fda.gov/> (дата обращения: 15.06.2016 г.).
33. Turner C.E. Anti-Rh Activity of Commercial Intravenous Immunoglobulin Preparations / C.E. Turner, S. Thorpe, M. Brasher // *Vox Sang.* – 1999. – V. 76. – P. 55-58.
34. Urgent: Voluntary market withdrawal – September 24, 2010 octagam (Immune Globuline Intravenous (human) 5% Liquid Preparation) [Электронный ресурс] URL: <http://www.octapharma.com/> (дата обращения: 01.10.2015 г.).
35. 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/> (дата обращения: 01.09.2015).
36. Wessler S. Biological assay of a thrombosis inducing activity in human serum / S. Wessler, S.M. Reimer, M.C. Sheps // *J Appl Physiol.* – 1959. – Vol. 14. – P. 943-46.
37. WHO. Technical Report Series. – 1994. – No 840.
38. Wolberg A.S. Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations / A.S. Wolberg, R.H. Kon, D.M. Monroe, M. Hoffman // *Am.J.Hematol.* – 2000. – V.65. – P. 30-34.