

ЯКОВЛЕВ АЛЕКСЕЙ КОНСТАНТИНОВИЧ

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Меркулов Вадим Анатольевич

Официальные оппоненты:

Шмаров Максим Михайлович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной биотехнологии, заведующий

Мирошников Константин Анатольевич – доктор химических наук, главный научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория молекулярной биоинженерии, заведующий

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита состоится «___» _____ 2019 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10., <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Ольга Юрьевна Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Эритропоэтин – это цитокин, который стимулирует эритропоэз при взаимодействии с рецепторами на клетках-предшественниках костного мозга (Krantz S.B., 1991). Лекарственные препараты рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) служат неотъемлемой частью патогенетической терапии заболеваний (Ермоленко В.М., Иващенко М.А., 2000; Шило В.Ю., Денисов А.Ю., 2005; Stauder R. et al., 2018) и патологических состояний, сопровождающихся снижением количества эритроцитов и развитием симптоматической анемии (Милованов Ю.С. и др., 2005; Бабичева Л.Г., Поддубная И.В., 2007). У больных с анемией при хронической болезни почек лекарственные препараты эритропоэтина применяются практически пожизненно. В связи с этим качество препаратов данной группы особенно важно. Одним из основных показателей качества, отражающим эффективность и безопасность лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека, служит специфическая активность. Объективная информация о величине специфической активности, точность ее оценки позволяет гарантировать терапевтические возможности данных лекарственных средств, поскольку ошибка в сторону ее завышения влияет на эффективность, а в сторону занижения – может привести к развитию нежелательных осложнений: гипертонии и тромбоцитозу с ишемией и инфарктом миокарда, инсульту, тромбозу вен и артерий (Casati, S. et al. 1987; Henry D.H. et al., 2012). Следовательно, точное определение специфической активности с включением критериев приемлемости результатов важно для обеспечения безопасности применения лекарственных препаратов эритропоэтина. Методики контроля данного показателя у отечественных производителей различаются.

Специфическую активность лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека, согласно ведущим Фармакопеям мира, определяют биологическим методом по влиянию на стимуляцию гемопоэза у полицитемических и нормоцитемических мышей в сравнении со стандартным образцом и выражают в международных единицах (МЕ). Точность результатов определения специфической активности зависит от стандартных образцов, а именно от правильности и прецизионности результатов, полученных при их разработке. Эталон международных единиц активности эритропоэтина служит международный стандартный образец (эпоэтин альфа) (Storring P.L., Gaines Das R.E., 1992).

Значимость лекарственных препаратов эритропоэтина в клинической практике, необходимость разработки отечественного стандартного образца и отсутствие единых требований к методике определения специфической активности в Российской Федерации обуславливает актуальность стандартизации методики определения специфической активности.

Степень разработанности темы исследования

Срок действия ФС 42-0111-06 на стандартный образец эпоэтин альфа истек в 2009 г. (<http://grls.rosminzdrav.ru>) и к началу наших исследований отечественный стандартный образец эритропоэтина отсутствовал. Российские производители

вынуждены использовать зарубежные стандартные образцы или откалиброванные по ним стандартные образцы предприятия, процедура аттестации которых не регламентирована. В связи с отсутствием в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ XIII, 2015) общей фармакопейной статьи (ОФС), которая регламентирует определение специфической активности эритропоэтина методики определения специфической активности эритропоэтина российских производителей различаются между собой (по используемой линии мышей, количеству исследуемых доз, количеству параллельных испытаний, способу регистрации и учета результатов, а также требованиями к диапазону рассчитанной активности) и отличаются от зарубежных производителей (<124> USP 40-NF 35 2 S., 2017; 01/2008:1316 Ph. Eur. 8.0., 2013) лекарственных препаратов эритропоэтина, зарегистрированных в Российской Федерации, отсутствием требований к прецизионности полученных результатов (требования к границам доверительного интервала не включены в методику).

В связи с этим, стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина составляет большую научную и практическую ценность для суверенитета страны, значимость которой постоянно растет в условиях роста санкций и необходимости импортозамещения как препаратов, так и стандартных образцов. Разработка общей фармакопейной статьи и ее гармонизация с Европейской фармакопеей (ЕФ) позволит контролировать основное качество препаратов в соответствии с международными требованиями, обеспечит эффективность и повысит их безопасность при клиническом применении.

Цель исследования – стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина.

Задачи исследования:

1. Разработать технологию изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина.
2. Совершенствовать и стандартизовать методику определения специфической активности эритропоэтина, используемую отечественными производителями, с целью ее гармонизации с требованиями Европейской фармакопеи.
3. Валидировать усовершенствованную методику определения специфической активности препаратов рекомбинантного эритропоэтина.
4. Аттестовать стандартный образец специфической активности эритропоэтина, разработать комплект документации на стандартный образец (паспорт, «Инструкция на научно-техническую продукцию отраслевой стандартный образец специфической активности эритропоэтина», макет первичной и вторичной упаковки).

Научная новизна исследования

Впервые в Российской Федерации разработана технология изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина, включая выбор состава вспомогательных веществ и оптимизацию условий лиофилизации, которая обеспечивает получение стандартного образца со сроком годности 5 лет при температуре хранения минус 20 °С.

Разработан лиофилизированный стандартный образец специфической активности эритропоэтина ОСО 42-28-437-2017, который в отличие от ранее существующих отечественных стандартных образцов, характеризуется стабильностью в течение 5 лет, и по точности аттестованного параметра (доверительный интервал рассчитанной активности от 94,5 – 105,8) сопоставим со стандартным образцом Европейской фармакопеи.

Впервые в Российской Федерации разработана стандартизованная методика определения специфической активности эритропоэтина, и достигнут международный уровень требований к её точности, введен критерий приемлемости результатов испытаний – доверительный интервал рассчитанной активности от 64 до 156 % (P=0,95). Предложен методический подход к валидации биологического метода *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследований состоит в том, что на примере стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина предложен подход к проведению валидации биологических методов. Достигнутый уровень стандартизации путем использования разработанного стандартного образца, обоснованным выбором линейных мышей, метода подсчета ретикулоцитов (проточная цитометрия), а также обоснованием дизайна методики позволил достигнуть необходимой точности и гармонизировать отечественные требования к препаратам эритропоэтина с требованиями Европейской фармакопеи по основному показателю качества – специфическая активность.

Практическая значимость работы подтверждена использованием полученных результатов в деятельности Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации для разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности биотехнологических лекарственных препаратов при проведении прикладных научных исследований, экспертизе качества субстанции, экспертизе предложенных методов контроля качества лекарственного средства и качества представленных образцов лекарственного средства с использованием этих подходов. Материалы работы реализованы: разработкой двух общих фармакопейных статей «Эритропоэтины» ОФС.1.7.1.0016.18 и «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина» ОФС.1.2.4.0017.18, в которых сформулированы требования и условия определения специфической активности эритропоэтина (включены в XIV Государственную фармакопею Российской Федерации, введенную в действие приказом Минздрава России от 30.10.2018) (акт внедрения), комплектом документации на стандартный образец (паспорт, макет первичной и вторичной упаковки, «Инструкция на научно-техническую продукцию отраслевой стандартный образец специфической активности эритропоэтина»). Апробация разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина проведена отечественным производителем лекарственных препаратов эритропоэтина ООО «Фармапарк» (акт внедрения от 16 января 2019 г.) и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научный

центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 03 декабря 2018 г.).

Методология и методы исследования

В соответствии с целью и задачами диссертационной работы методология исследования заключалась в исследовании условий стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина в Российской Федерации. Предметом исследования стала специфическая активность эритропоэтина, объектами – стандартные образцы эритропоэтина и лекарственные препараты эритропоэтина. Научная литература, посвященная вопросам стандартизации методики определения специфической активности лекарственных препаратов эритропоэтина, была проанализирована формально-логическими методами. В ходе выполнения работы применяли биологический метод определения специфической активности эритропоэтина по стимуляции эритропоэза у нормоцитемических мышей с подсчетом ретикулоцитов двумя способами регистрации (проточной цитофлуориметрией и световой микроскопией) с обработкой результатов статистическими методами. Все исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (выписка из протокола заседания от 10.02.2015 г.). Кроме того, для оценки показателей качества субстанции для изготовления стандартного образца и разработанного на ее основе готового стандартного образца использовали физико-химические методы (спектрофотометрический метод, электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, капиллярный зонный электрофорез) и иммунохимические методы (иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноблотинг).

Лабораторные животные

Экспериментальные исследования выполнены на линейных Balb/c (n=1312), гибридных B6D2F1 (n=336), F1 (CBA*C57BL) (n=384) и беспородных мышах (n=96). Животных получали из питомников «Столбовая» Московской области и КДЛ Филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Физико-химические методы исследований

Определение концентрации белка проводили спектрофотометрическим методом по ОФС 1.2.3.0012.15.

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.2.1.0023.15.

Капиллярный зонный электрофорез проводили в соответствии с ЕФ (01/2008:1316 Ph.Eur. 8.0., 2013) на оборудовании PA 800 plus (Beckman Coulter, USA), в сравнении со стандартным образцом для физико-химических испытаний – Erythropoietin for physicochemical tests CRS batch 1 (CRS).

Иммуноблотинг проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.7.2.0022.15 с использованием поликлональных кроличьих антител против эритропоэтина человека (Sigma Aldrich, США).

Лиофилизацию выполнили на установке для лиофильной сушки Advantage XL (VirTis, США). В качестве прототипа выбран способ получения лиофилизированной

фармацевтической композиции рекомбинантного эритропоэтина человека стабильного при комнатной температуре (Carcagno С.М. с соавт., WO 0027419). Процесс лиофилизации контролировали по показаниям датчиков давления и температуры. По окончании программы давление в камере выравнивали до атмосферного. Ампулы подключали к аппарату для запаивания и запаивали газовой горелкой при разрежении 750 мТорр. После запаивания проводили контроль качества лиофилизации.

Контроль качества запаивания. Герметичность ампул оценивали в соответствии с МУК 4.1/4.2.588-96 на приборе «Искра-1».

Испытания на однородность дозирования проводили в соответствии с ОФС 1.4.2.0008.15 двумя способами: определением массы нетто с использованием электронных аналитических весов СР-225D класса точности $\pm 0,05$ мг в диапазоне от 0,001 до 5 г (Sartorius GMBH) и по содержанию рекомбинантного Эпоэтина альфа иммуноферментным анализом в соответствии с инструкцией производителя набора.

Испытания на однородность массы содержимого одной ампулы провели в соответствии с требованиями ОФС 1.4.2.0009.15, используя электронные аналитические весы СР-225D.

Определение потери в массе при высушивании провели в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0010.15.

Биологические методы исследования

Специфическую активность определяли в соответствии с ЕФ биологическим методом *in vivo* на нормоцитемических мышцах по уровню стимуляции эритропоэза в сравнении с 3 международным стандартом эритропоэтина рекомбинантного для количественного определения биологической активности (3rd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant for bioassay, 3rd IS) и стандартным образцом эритропоэтина Европейской Фармакопеи – European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP batch 3. Методом последовательных разведений (фосфатно-альбуминовым забуференным физиологическим раствором, рН 7,2) готовили рабочие растворы стандартного и испытуемого образцов с концентрацией 80, 40 и 20 МЕ/мл. Существенным условием получения достоверных результатов было обеспечение проведения испытания стандартного и испытуемого образцов в идентичных условиях. С этой целью проводили шифрование образцов крови и рандомизацию лабораторных животных. Животным подкожно вводили по 0,5 мл одной дозы (одно из разведений испытуемого препарата или стандартного образца). Затем животных распределяли в 8 новых клеток по одному животному с определенной дозой. Таким образом, в каждой клетке должны были оказаться мыши, получившие один из шести растворов (3 испытуемых и 3 стандартных). Через 4 сут. после введения растворов у животных из ретроорбитального синуса глаза отбирали образцы крови (200-300 мкл) в пробирки с К2ЭДТА. Каждому образцу крови присваивали определенный номер, который соответствовал дозе, полученной животным, что обеспечивало эффект слепой рандомизации при подсчете количества ретикулоцитов.

Изучение стабильности разработанного стандартного образца проводили в соответствии с ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» в

долгосрочных испытаниях и методом ускоренного старения (XIII ГФ РФ, 2015; Петухов В.Г., 2006).

Статистические методы обработки данных

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере в Windows 7 с использованием редактора Microsoft Office Excel 2007 и пакета прикладных компьютерных программ (PLA, версия 2.0, фирма «Stegmann Syst», Германия). При оценке достоверности различий, правильности и прецизионности полученных результатов использовали дисперсионный анализ.

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад соискателя состоит в самостоятельном планировании научной работы, углубленном анализе отечественной и зарубежной научной литературы, выполнении экспериментальных исследований, анализе и интерпретации полученных экспериментальных данных, их систематизации, статистической обработке с описанием полученных результатов, написании и оформлении рукописи диссертации и основных публикаций по выполненной работе.

Автором обоснован выбор исходного материала и экспериментально подтверждена возможность его применения при производстве стандартного образца специфической активности эритропоэтина; экспериментально доказана возможность включения критерия приемлемости результатов испытания – доверительного интервала рассчитанной активности; проведено совершенствование методики. Оценка качества материала для кандидата в стандартный образец и характеристика разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина по физико-химическим показателям проведена совместно с сотрудниками лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России д.б.н. Волковой Р.А., к.б.н. Томилиным А.В. Лиофилизация материала для кандидата в стандартный образец проведена совместно с сотрудником лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов ИЦЭК МИБП Воропаевым А.А. Валидация методики и аттестация разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина выполнена совместно с сотрудником лаборатории вирусных вакцин ИЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России к.б.н. Постновой Е.Л. и сотрудниками лаборатории фармакологии ИЦЭК ЛС ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России к.б.н. Батуашвили Т.А. и к.б.н. Симутенко Л.В.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанная технология изготовления отечественного стандартного образца специфической активности эритропоэтина, включая выбор состава вспомогательных веществ и оптимизацию условий лиофилизации, обеспечивает получение стандартного образца со сроком годности 5 лет.
2. Усовершенствованная и стандартизованная методика определения специфической активности эритропоэтина с использованием разработанного стандартного образца, линейных мышей, проточной цитометрии и обоснованного

дизайна исследования гармонизирована с требованиями Европейской фармакопеи и характеризуется высокой точностью.

3. Разработанный стандартный образец ОСО 42-28-437-2017 специфической активности эритропоэтина сопоставим с европейским стандартным образцом по основным характеристикам точности и позволяет стандартизовать определение специфической активности лекарственных препаратов эритропоэтина в Российской Федерации.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается достаточным объемом экспериментальных исследований, базирующихся на применении современных методов, приборов для проведения физико-химических, биологических, технологических экспериментов. Экспериментальные исследования выполнены на линейных Balb/c (n=1312), гибридных B6D2F1 (n=336), F1 (CBA*C57BL) (n=384) и беспородных мышах (n=96). Для проведения экспериментальных работ использовано современное оборудование (проточный цитофлуориметр Navios 10 color (Beckman Coulter, США); флуоресцентный микроскоп Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия); прибор для капиллярного электрофореза PA 800 plus (Beckman Coulter, США)) с действующими свидетельствами о поверке/аттестации/калибровке. Статистические методы обработки полученных данных соответствуют поставленным задачам, что позволяет считать результаты исследований достоверными. Выводы и рекомендации, сделанные автором, аргументированы, подтверждены приведенным материалом и вытекают из результатов проведенных исследований.

Диссертация апробирована на заседании ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 5 от 04.12.2018 г).

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на III научно-практической конференции молодых ученых ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ «Приоритетные направления развития экспертной деятельности в области обращения лекарственных средств» (Москва, 2014); IV научно-практической конференции молодых ученых ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ «Научно-методические подходы оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств в Российской Федерации» (Москва, 2015); XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, 4 – в других изданиях, одни тезисы – в рецензируемом издании, 3 – в материалах конференций.

Объем и структура диссертации

Основной текст диссертации изложен на 140 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований с обсуждениями полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка

литературы, включающего 150 работ, из них 30 работ отечественных и 120 работ зарубежных авторов, и приложений. Работа иллюстрированы 28 рисунками и 36 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка технологии изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина

В качестве материала в стандартный образец выбрана субстанция-раствор [концентрированный] Рэпоэтин-СП (ГосНИИ ОЧБ ФМБА ФГУП – Россия), которая отличалась большим сроком стабильности по сравнению с другими кандидатами. Контроль физико-химических, иммунохимических свойств и биологической активности подтвердил ее соответствие требованиям нормативной документации. При разработке технологии изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина были подобраны условия лиофильного высушивания, изменена первичная упаковка и объем наполнения ампул, оптимизирован состав защитной среды. За основу взят состав, используемый в международном стандартном образце, с некоторыми изменениями (Таблица 1): сывороточный альбумин человека заменили на бычий сывороточный альбумин. Лиофилизация материала с учетом изменений не привела к формированию объемно-структурированных лиофилизатов в ампулах.

Таблица 1 – Выбор стабилизирующего состава

Наименование	Процент от объёма						
Сывороточный альбумин человека	0,2*	--	--	--	--	--	--
Бычий сывороточный альбумин	--	0,2	0,2	--	0,2	0,2	0,2
Трегалоза	1,0*	1,0	2,0	3,0**	3,0	4,0	8,0
Натрия хлорид	0,12*	0,12	0,12	0,45**	0,12	0,12	0,12
Дигидрофосфат натрия	--	--	--	0,312**	--	--	--
Аргинин	--	--	--	0,3**	--	--	--
Твин-20	--	--	--	0,01**	--	--	--
Внешний вид	+++	-	+	+++	++	+++	+++

Примечание: * - стабилизирующий состав международного стандартного образца; ** - стабилизирующий состав биологического референс препарата ЕФ; «--» - содержимое в виде порошка; «+» - формирование полых «таблетки»; «++» - неоднородная рыхлая структура в виде «таблетки»; «+++» - однородная пористая масса в виде сформированной «таблетки»

В данном составе роль структурообразующего компонента выполняет трегалоза, исследования по определению ее оптимальной концентрации для получения кристаллической или пористой массы в виде сформированной «таблетки» показали, что лучший результат достигается при использовании стабилизирующего состава с концентрацией трегалозы не менее 4 %.

В качестве прототипа по условиям лиофилизации был выбран способ изготовления лиофилизированной фармацевтической композиции рекомбинантного эритропоэтина человека, стабильного при комнатной температуре, который был усовершенствован нами. Отличительными признаками усовершенствованной технологии является: изменение стабилизирующего буфера и объема наполнения ампул и, как следствие, сокращение числа операций, изменение температурного режима и давления, сокращение продолжительности процесса лиофилизации до 12 ч. Основные операции и параметры разработанного способа лиофильного высушивания обобщены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные параметры лиофилизации при изготовлении стандартного образца специфической активности эритропоэтина

Операция	Температура, °С	Давление, мТорр	Продолжительность, час
Замораживание	1°С /мин до минус 45	Атмосферное	1 2
Первичное высушивание	минус 40	100	6
Повышение температуры до 20 °С и понижение давления	1°С /мин	100-30	1
Вторичное высушивание	20	30	2
Средняя суммарная продолжительность лиофильного высушивания			12

Лиофилизацию проводили на установке для лиофильной сушки Advantage XL (VirTis, США). Процесс лиофилизации контролировали по показаниям датчиков давления и температуры. По окончании программы давление в камере выравнивали до атмосферного. Ампулы подключали к аппарату для запаивания и запаивали газовой горелкой при разрежении 750 мТорр. После запаивания в соответствии с программой аттестации провели контроль качества кандидата в стандартный образец, результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты контроля лиофилизированного кандидата в стандартный образец специфической активности эритропоэтина

Наименование	Результат
Визуальный контроль качества лиофилизации	Однородная пористая структура в виде сформированной «таблетки» белого цвета
Контроль качества запаивания (герметичность)	Герметично
Однородность дозирования: -содержание ЭПО альфа, мкг	18,7 (CV 6,34 %; n=10)
Однородность массы, мг	2,19 (CV 2,7 %; n=75)
Потеря в массе при высушивании, %	1,93 (n=75)
Подлинность	Соответствует

Таким образом, в ходе исследований оптимизирован состав среды высушивания, определена оптимальная концентрация трегалозы, обеспечивающая приемлемую структуру и сохранение активности лиофилизированного препарата, определены

условия лиофилизации.

Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина

Совершенствование методики, используемой отечественными производителями лекарственных препаратов эритропоэтина, проводили по следующим направлениям: обоснование выбора мышей, способа регистрации эритропоэза, обоснование дизайна и статистического метода анализа результатов. Обязательным условием проведения испытаний было шифрование образцов крови и рандомизация лабораторных животных, что позволило исключить или уменьшить дополнительные источники вариации.

Изучение влияния линии мышей на результат определения. Влияние мышей (линия B6D2F1, предусмотренная ЕФ, и мыши, используемые отечественными производителями: линии Balb/C, F1(CBA^xC57BL), а также беспородные) на результаты определения специфической активности оценивали по правильности и прецизионности, в качестве критериев использовали требования ЕФ к активности и ее доверительному интервалу (Рисунок 1).

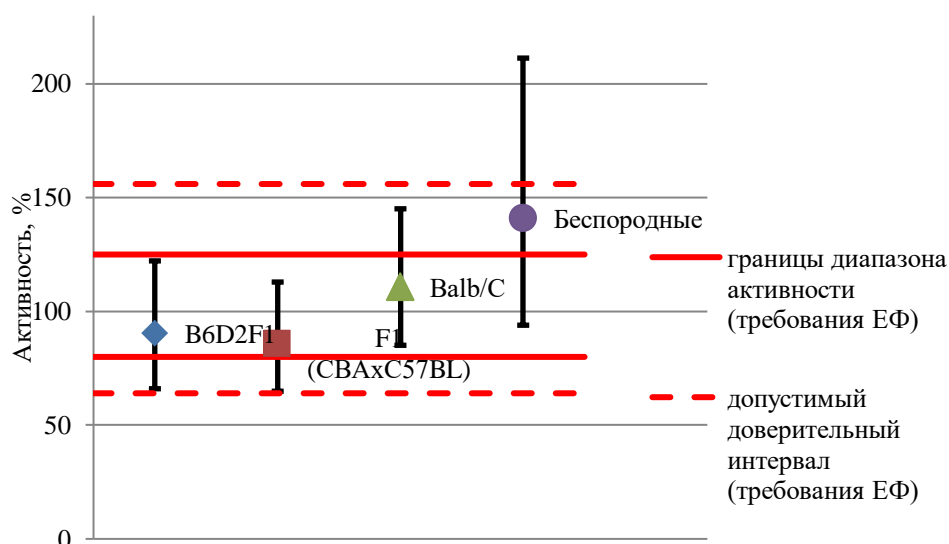


Рисунок 1 – Влияние мышей на результат определения специфической активности эритропоэтина

Результаты, полученные в испытаниях с мышами линий B6D2F1, Balb/C и F1 (CBA^xC57BL), соответствуют требованиям ЕФ по активности и доверительному интервалу. При использовании беспородных мышей, рассчитанная активность и ее доверительный интервал не соответствует требованиям, в массиве первичных данных выявлено три выброса тестом Граббса, кроме того в одном из экспериментов не выполнен основной критерий приемлемости результатов – подобие испытуемого препарата стандартному образцу.

Сравнение точности проточной цитометрии и световой микроскопии.

Сравнение точности методов подсчета ретикулоцитов провели в 6 испытаниях на мышах линии B6D2F1 в возрасте 8 недель ($n=288$). Количество ретикулоцитов подсчитывали двумя способами – световой микроскопией и проточной цитометрией. Правильность оценивали по смещению, результаты представлены на рисунке 2.

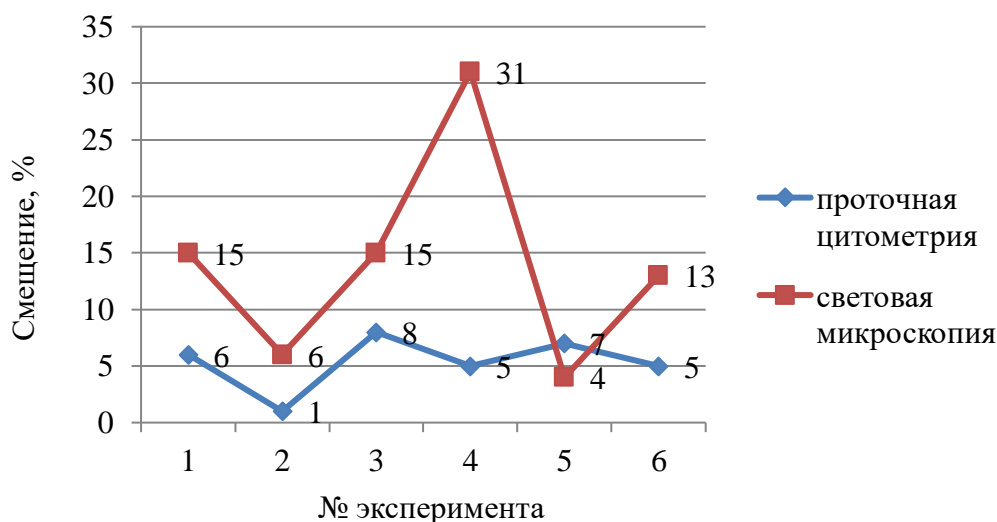


Рисунок 2 – Сравнение правильности методов подсчета ретикулоцитов

Результаты, полученные методом проточной цитометрии, в среднем имели смещение в 3 раза меньше по сравнению с результатами, полученными с помощью световой микроскопии.

Прецизионность оценивали по стандартному отклонению, результаты представлены на рисунке 3.

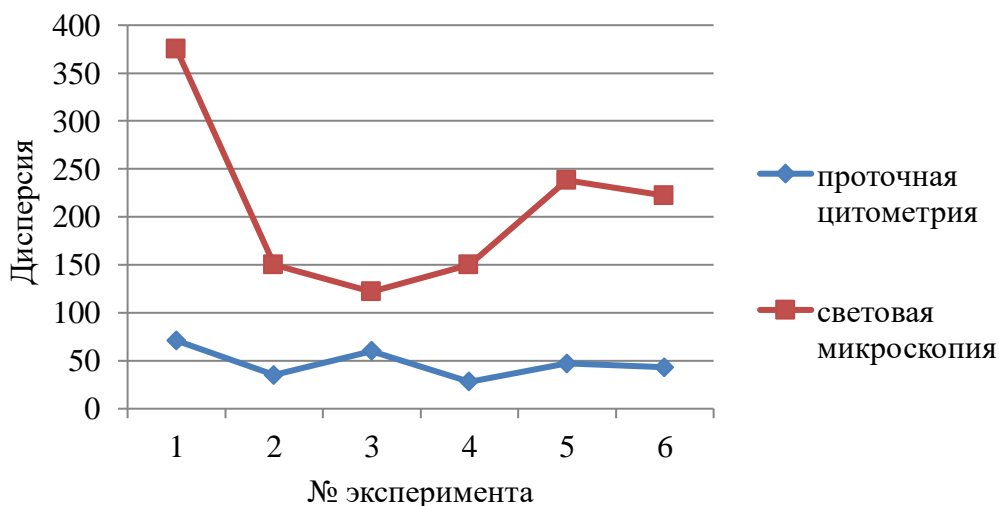


Рисунок 3 – Сравнение прецизионности методов подсчета ретикулоцитов

Дисперсионный анализ показал, что различия между способами подсчета ретикулоцитов статистически значимы: $F_{\text{эксп}}=(5,25; 4,29; 2,03; 5,44; 5,08; 5,14) > F_{\text{крит}}=2,01$ ($f_1=47, f_2=47$), вероятность случайно получить такие различия не превышает 1 %.

Полученные результаты показывают, что проточная цитометрия обеспечивает достаточную точность и позволяет ввести установленный ЕФ критерий приемлемости результатов испытания – доверительный интервал рассчитанной активности. Применение световой микроскопии требует совершенствования условий испытаний.

Обоснование дизайна методики. Проведенные исследования позволили стандартизовать методику в отношении используемых линий мышей и способа подсчета ретикулоцитов и приступить к обоснованию дизайна методики. Экспериментальное изучение прецизионности провели в 6 независимых экспериментах на мышях линии

Valb/C ($n=288$) по стандартизованной методике. Дополнительно рассчитали теоретическую вариабельность методики (USP, монография «1033»), при различных схемах проведения испытаний путем включения различных комбинаций уровней и количества параллельных испытаний, т.е. факторов, которые могут оказать влияние на вариабельность результатов. Стратегия параллельных испытаний на всех уровнях была одинаковой, поэтому компоненты дисперсии определены на основании стандартного однофакторного дисперсионного анализа. Оценки дисперсии использовали для выбора оптимальной схемы методики с желаемым уровнем прецизионности (Таблица 4).

Таблица 4 – Прогнозируемая вариабельность методики для комбинаций уровней и параллельных испытаний

Количество испытаний (n)	Вариабельность методики (геометрический коэффициент вариации, %) для уровней доз (k)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	15,4	10,7	8,6	7,4	6,6	6,0	5,6	5,2
2	12,6	8,7	7,1	6,1	5,4	4,9	4,6	4,3
3	11,5	8,0	6,5	5,6	5,0	4,5	4,2	3,9
4	10,9	7,6	6,2	5,3	4,7	4,3	4,0	3,7
5	10,5	7,3	6,0	5,1	4,6	4,2	3,9	3,6
6	10,3	7,2	5,8	5,0	4,5	4,1	3,8	3,5
7	10,1	7,0	5,7	4,9	4,4	4,0	3,7	3,5
8	10,0	7,0	5,6	4,9	4,3	4,0	3,7	3,4
9	9,9	6,9	5,6	4,8	4,3	3,9	3,6	3,4

Примечание: курсивом выделены результаты, рассчитанные теоретически

Теоретические расчеты показали, что наиболее эффективным способом уменьшения вариабельности окончательного значения, является увеличение количества независимых уровней, то есть концентраций эритропоэтина. Данную возможность проверили в следующем эксперименте.

Определение диапазона методики, в котором существует линейная зависимость эффекта от логарифма дозы, провели на 5 уровнях (10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл) на мышах линии Valb/C. Линейность результатов определения специфической активности оценивали по следующим критериям приемлемости:

- полученная статистическая модель должна соответствовать линейной регрессии, при $p=0,95$;
- коэффициент детерминации линейной регрессии R^2 должен составлять не менее 0,95;
- коэффициент наклона (b) должен быть не менее 1,20.

На основании полученных результатов построили график зависимости эффекта (y) от логарифма дозы (x) (Рисунок 4).

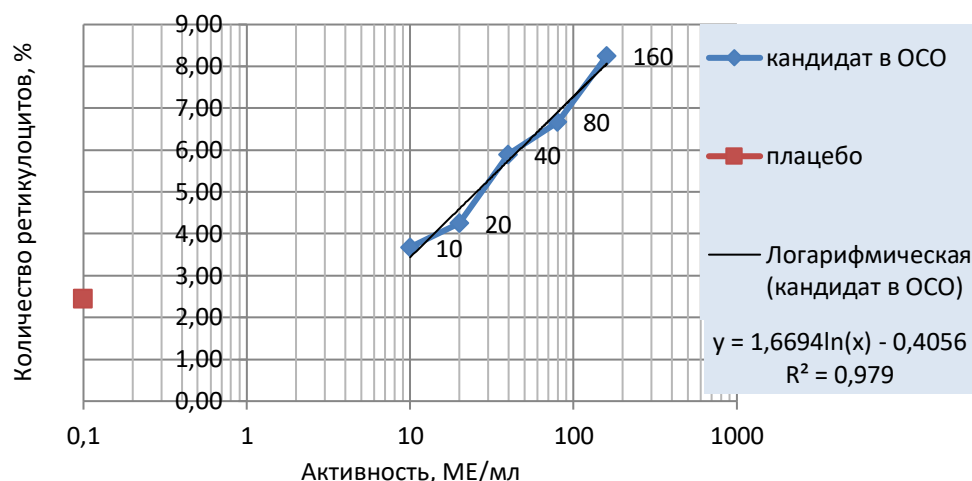


Рисунок 4 – График зависимости эффекта (y) от логарифма дозы (x)

График зависимости эффекта (y) от логарифма дозы (x) выявил линейную зависимость, которая описывается уравнением:

$$y = 1,6694\ln(x) - 0,4056 \quad (R^2 = 0,979)$$

где: -0,4056 – коэффициент сдвига;

1,6694 – коэффициент наклона, т.е. более 1,2. Коэффициент детерминации составил $R^2=0,979 \approx 0,98$, т.е. более 0,95.

Проверка полученных результатов на соответствие линейной регрессии с помощью дисперсионного анализа показала, что исследуемая модель соответствует линейной регрессии, наклон линии в координатах «логарифм дозы – ответ» существенно отличается от нуля. Вероятность случайно получить такие различия не превышает 5 %, $F_{\text{эксп}} = 87,48 > F_{\text{табл}} = 4,12$ ($f_{\text{меж}} = 1$, $f_{\text{внутр}} = 35$, при $p=0,95$).

Результаты оценки линейности в диапазоне от 10 до 160 МЕ/мл соответствуют всем трем критериям приемлемости. В данном диапазоне подтверждена линейная зависимость, результаты испытаний (подсчета ретикулоцитов) прямо пропорциональны концентрации эритропоэтина в образце.

Следующим шагом необходимо было определить смещение на отдельных уровнях и его доверительные интервалы. Результаты представлены на рисунке 5.

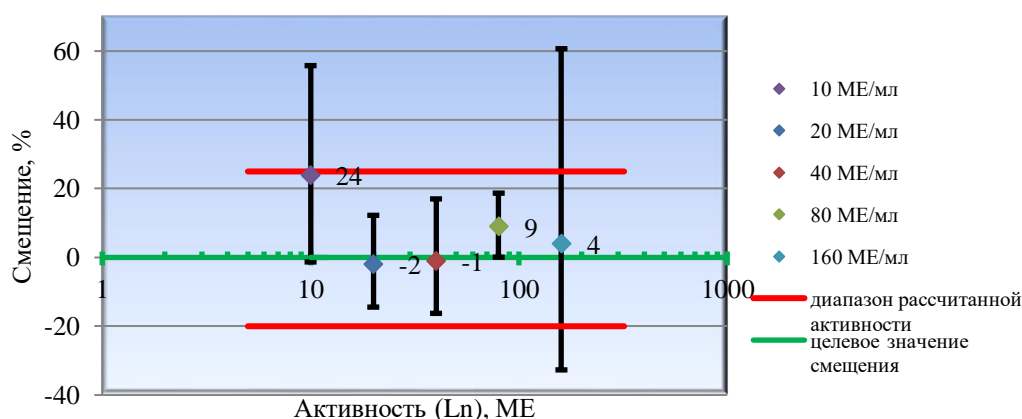


Рисунок 5 – График 90 % доверительных интервалов для смещения

Смещение находится внутри установленного диапазона, однако, 90 % доверительные интервалы крайних уровней не соответствуют целевым критериям, тем самым ограничивая диапазон применения методики. Исходя из полученных

результатов, можно сделать заключение о целесообразности схемы с тремя уровнями доз 20, 40 и 80 МЕ/мл.

Для оценки результатов необходимо было подобрать математическую модель, которая наиболее соответствует дизайну методики, так как отечественные производители используют для оценки результатов различные подходы: регрессионный анализ, метод параллельных линий. Поскольку определение специфической активности испытуемого препарата проводят путем сравнения со стандартным образцом, то в методике должен быть реализован подход, основанный на эквивалентности или подобии испытуемого образца стандартному. Для экспериментально обоснованного формата методики, ограниченного тремя уровнями доз, подходит метод параллельных линий, который позволяет достоверно проверить предположение о подобии, сравнением двух линий на графике, построенных по средним величинам в серии разведений. Критерием подобия служит параллельность этих линий.

Валидация методики определения специфической активности эритропоэтина

Для валидации усовершенствованной методики провели изучение следующих характеристик: специфичность, правильность и прецизионность.

Специфичность подтвердили по способности методики определять специфическую активность в присутствии вспомогательных веществ. Для оценки специфичности методики установили следующие критерии:

1. в растворе плацебо не должна выявляться специфическая активность;
2. стандартный образец должен обладать специфической активностью;
3. прямые зависимости «доза-эффект» для испытуемого и стандартного образцов, построенные по средним значениям в серии двукратных разведений, должны быть параллельными (при $p=0,95$).

В результате проведенных исследований показано: при введении раствора плацебо количество ретикулоцитов не повышается и остается на физиологическом уровне, при введении стандартных и испытуемых растворов с разной активностью отмечается дозозависимое увеличение количества ретикулоцитов в образцах крови подопытных животных (Рисунок 6).

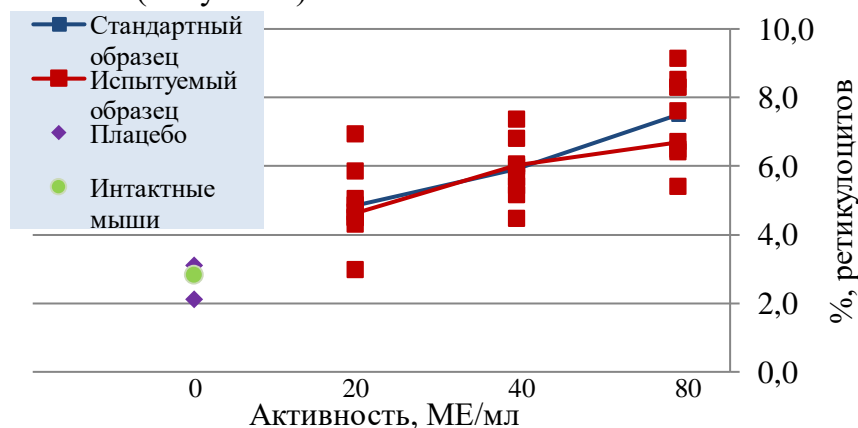


Рисунок 6 – Дозозависимое увеличение количества ретикулоцитов от активности эритропоэтина

Оценку критериев № 2 и 3 проводили дисперсионным анализом, результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Оценка критериев приемлемости специфичности методики

Критерий, №	Степень свободы	F _{эксп}	F _{табл} (p=0,95)	Требование	Оценка*
2	1	36,57	4,07	Наклон линии в координатах «логарифм дозы - ответ» должен существенно отличаться от нуля	+
3	1	0,56	4,07	Различия между наклоном прямых испытуемого и стандартного образцов должны быть статистически незначимы	+

Примечание: * – оценка на соответствие критерию: + соответствие; – несоответствие

Результаты по оценке специфичности соответствуют установленным критериям. Специфичность методики подтверждена отсутствием влияния матричных компонентов.

Правильность исследовали 3 аналитика в 12 независимых экспериментах, каждый выполнил по 2 эксперимента на мышах линии Balb/C ($n=96$) и на мышах линии F1(CBAxC57BL) ($n=96$). В качестве критерия использовали требования к показателю - рассчитанная активность, должна быть в диапазоне от 80 до 125 %, исходя из требований, смещение относительно опорного значения установили в диапазоне от минус 20 до 25 %.

Результаты оценки правильности методики представлены на рисунке 7.

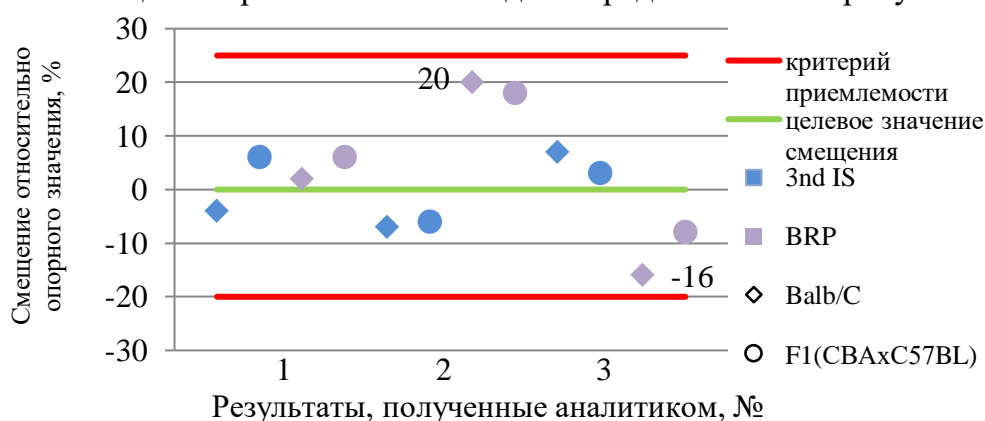


Рисунок 7 – Оценка правильности

Представленные графически данные показывают, что полученные результаты имеют смещение от минус 16 до 20 % и находятся внутри установленного диапазона. Таким образом, результаты по оценке правильности соответствуют установленному критерию приемлемости.

Прецизионность методики оценивали в условиях повторяемости (сходимости) и воспроизводимости.

Схема экспериментов по повторяемости включала определение степени близости друг к другу результатов 8 независимых параллельных испытаний в трех сериях двукратных разведений, полученных одним аналитиком на одном и том же оборудовании в течение одного дня.

При совершенствовании методики были установлены требования к границам доверительного интервала: от 64 до 156 %. Исходя из этого, для оценки результатов прецизионности в условиях повторяемости использовали полуширину доверительного

интервала ($I_{95/2}$) рассчитанной активности, которая не должен превышать величину 1,56 антилогарифма (AntiLn).

Результаты оценки повторяемости представлены на рисунке 8.

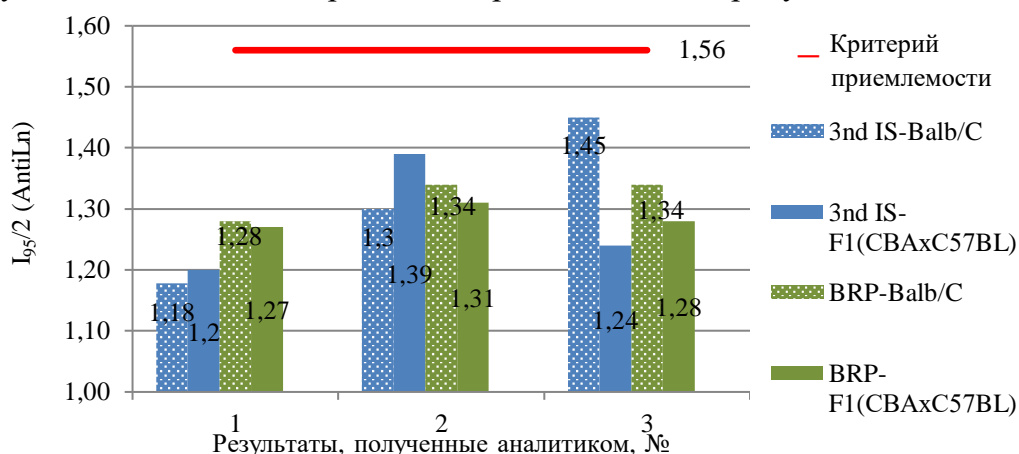


Рисунок 8 – Оценка прецизионности в условиях повторяемости

В результате проведенных исследований показано, что ни один из полученных результатов не превышает предельной величины 1,56. Таким образом, результаты по оценке прецизионности в условиях повторяемости соответствуют установленному критерию приемлемости.

Вариабельность результатов в условиях воспроизводимости оценивали по степени близости друг к другу независимых результатов определения специфической активности, полученных при аттестации стандартного образца в результате межлабораторных исследований. Поскольку валидация методики проводилась с использованием кандидата в стандартный образец, критерий приемлемости прецизионности в условиях воспроизводимости увеличили в 3 раза – антилогарифм полуширины доверительного интервала результатов, полученных не менее чем в трех лабораториях, не должен превышать $\sqrt[3]{1,25}=1,077 \approx 1,08$.

По результатам 18 определений рассчитали антилогарифм полуширины доверительного интервала, результаты представлены на рисунке 9.

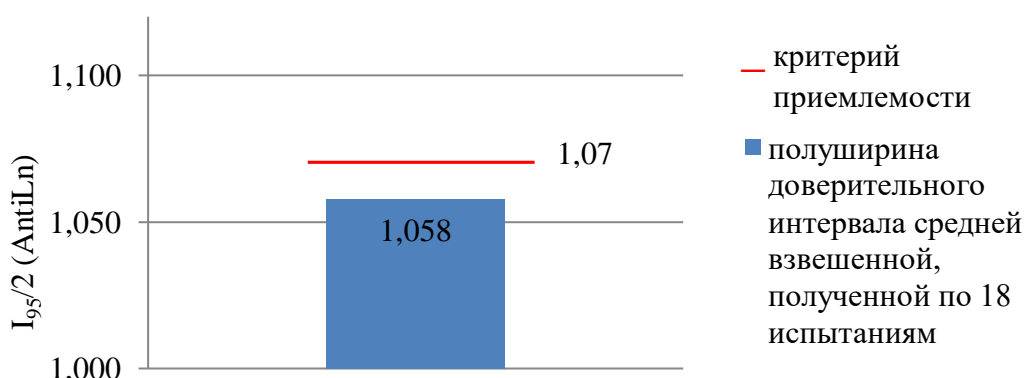


Рисунок 9 – Соответствие критерию приемлемости результатов по оценке прецизионности в условиях воспроизводимости

Антилогарифм полуширины доверительного интервала по результатам 18 определений специфической активности, полученных в трех лабораториях, составил 1,058. Результаты по оценке прецизионности в условиях воспроизводимости соответствуют установленному критерию приемлемости.

По результатам валидации можно сделать следующий вывод: рабочие характеристики процедуры и лежащий в ее основе метод отвечают установленным требованиям, что позволяет признать усовершенствованную нами методику пригодной для определения специфической активности эритропоэтина с использованием разработанного стандартного образца на мышцах линий Balb/C и F1(CBAxС57BL).

Результатом совершенствования методики и проведения ее валидации стало документальное оформление стандартизованной методики определения специфической активности эритропоэтина в виде общих фармакопейных статей: «Эритропоэтины» ОФС 1.7.1.0016.18 и «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина» ОФС 1.2.4.0017.18, в которых представлены требования и условия определения специфической активности препаратов рекомбинантного эритропоэтина с использованием нормоцитемических мышей. Достигнутый уровень стандартизации свидетельствует о гармонизации усовершенствованной методики с требованиями ЕФ, обоснованности ее нормативов и предложенных методических подходов к оценке валидационных характеристик.

Аттестация стандартного образца специфической активности эритропоэтина

Аттестация кандидата в стандартный образец специфической активности эритропоэтина проводилась в рамках выполнения НИР «Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств». Исследования проходили в трех лабораториях, результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты аттестации стандартного образца специфической активности эритропоэтина

Лаборатория	№ испытания	Разработанный стандартный образец относительно 3 rd IS		Разработанный стандартный образец относительно BRP bacht #3	
		Активность, МЕ	Доверительный интервал (P=0,95), %	Активность, МЕ	Доверительный интервал (P=0,95), %
1	1	2311	85-118	2266	66-149
	2	2305	76-130	2448	79-128
	3	2539	83-120	2538	79-127
2	1	2052	84-119	2880	77-134
	2	2257	76-130	2969	76-137
	3	2244	71-139	2841	78-131
3	1	2562	71-145	2009	72-134
	2	2269	70-144	2117	77-129
	3	2481	80-124	2604	80-128
Среднее взвешенное значение активности, МЕ		2401			
Доверительный интервал, рассчитанной активности (P=0,95), %		94,5-105,8			

Специфическую активность рассчитывали методом параллельных линий. Каждое значение представляет собой среднее геометрическое, полученное на основании 48 исследований. Результаты, полученные в разных лабораториях, относительно разных стандартных образцов и на разных линиях мышей проверили на однородность с помощью критерия Хи-квадрат. Экспериментальное значение составило $\chi^2_{\text{эсп}} = 13,326 < \chi^2_{\text{крит}} (95\%; df=17) = 27,587$, что свидетельствует об однородности, полученных результатов. После чего рассчитали среднее взвешенное значение аттестованной характеристики стандартного образца, которое составило 2401 МЕ/амп. (коллегиально было принято решение округлить результат до 2400 МЕ/амп), доверительный интервал – от 94,5 до 105,8 %.

Изучение стабильности разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина проводили в долгосрочных испытаниях при температуре минус 20 °С. Образцы подвергали проверке по показателю специфическая активность каждые три месяца в течение первого года и каждые 6 месяцев в течение второго года исследований (Рисунок 10).

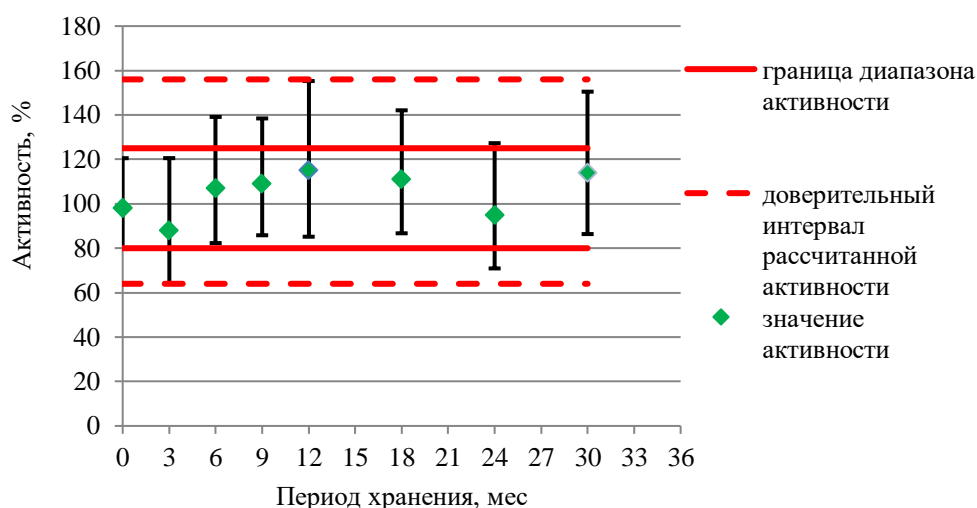


Рисунок – 10 Долгосрочные испытания по изучению стабильности разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина

В результате проведенных исследований показано, что активность и ее доверительные интервалы находятся в допустимом диапазоне. Наряду с долгосрочными испытаниями стабильности проведены испытания методом «ускоренного старения», результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты изучения стабильности разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина методом «ускоренного старения»

Температура хранения, °С	Период хранения (дни)	Активность, %	Доверительный интервал, %
1	2	3	4
80±0,2	2*	--	--
	5**	--	--
50±0,2	1***	103	57 - 177
	7**	--	--

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4
37±0,2	270	108	78 - 129
28±0,2	270	97	78 - 127
4±1,0	270	107	76 - 132

Примечание: * - отсутствует параллельность; ** - изменение цвета и формы таблетки; *** - доверительный интервал превышает допустимый диапазон

Вычисление прогнозируемого срока годности провели в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0009.15. Прогнозируемый срок годности разработанного стандартного образца при температуре хранения минус 20 °С составил более 20 лет, что согласуется с опытом изучения стабильности 2^{ого} международного стандартного образца эритропоетина, который использовался в течение 24 лет и сохранял активность в течение 13,5 лет хранения при температуре хранения 37 °С. Полученные результаты позволили установить срок годности 5 лет при температуре хранения минус 20 °С с возможностью его продления по результатам мониторинга стабильности.

По результатам аттестации разработанного стандартного образца специфической активности эритропоетина и изучения стабильности разработан и зарегистрирован комплект документации на ОСО 42-28-437-2017: Паспорт, Инструкция на научно-техническую продукцию отраслевой стандартный образец специфической активности эритропоетина, Макеты этикеток первичной и вторичной упаковки. Разработанный комплект документации устанавливает порядок и условия применения стандартного образца специфической активности эритропоетина.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология изготовления стандартного образца специфической активности эритропоетина, которая обеспечивает получение сублимационно высушенного стандартного образца со сроком годности 5 лет при температуре хранения минус 20 °С. Оптимизирован состав стабилизирующего буфера (трегалоза – 4,0 %, бычий сывороточный альбумин – 0,2 %, натрия хлорид – 0,12 %) и условия лиофилизации (замораживание при температуре минус 45 °С в течении трех часов, первичное высушивание при температуре минус 40 °С и давлении 100 мТорр в течении 6 ч, вторичное высушивание при температуре 20 °С и давлении 30 мТорр в течении 3 ч).
2. Усовершенствована и стандартизована методика определения специфической активности эритропоетина. Обоснован диапазон применения методики, вид и количество используемых в испытании животных (по 8 мышей линии Balb/C или F1(CBAxС57BL) для каждого уровня), введен критерий приемлемости результатов – доверительный интервал рассчитанной активности.
3. Результаты валидации усовершенствованной методики подтверждают ее пригодность для определения специфической активности эритропоетина с использованием разработанного стандартного образца ОСО 42-28-437-2017. Валидационные характеристики методики: специфичность – подтверждена,

правильность характеризуется смещением от минус 16 до 20 %, прецизионность не превышает 1,45 антилогарифма полуширины доверительного интервала.

4. Разработанный стандартный образец специфической активности эритропоэтина аттестован в межлабораторных исследованиях: специфическая активность – 2400 МЕ, доверительный интервал (94,5-105,8 %) сопоставим с доверительным интервалом Европейского стандартного образца (94,3-106,0 %). По результатам аттестации разработан комплект документации на стандартный образец ОСО 42-28-437-2017 (паспорт, «Инструкция на научно-техническую продукцию отраслевой стандартный образец специфической активности эритропоэтина», макет первичной и вторичной упаковок).

5. Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина, включая разработку стандартного образца ОСО 42-28-437-2017, обеспечивает гармонизацию отечественных требований с Европейскими. Разработанная методика положена в основу общих фармакопейных статей «Эритропоэтины» ОФС.1.7.1.0016.18 и «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина» ОФС.1.2.4.0017.18.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для обеспечения точности определения специфической активности лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека отечественным производителям рекомендуется определение специфической активности в соответствии с требованиями ОФС «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина» ОФС.1.2.4.0017.18, а также использование разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина при контроле препаратов эритропоэтина или для аттестации соответствующего стандартного образца предприятия. Учреждениям, проводящим экспертизу и контроль качества данных лекарственных средств, рекомендуется использование разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина при оценке соответствия препаратов требованиям нормативной документации.

Производителям и лабораториям, использующим при определении специфической активности эритропоэтина световую микроскопию, рекомендуется совершенствование методики в отношении условий регистрации результатов для обеспечения соответствия требованиям к критерию приемлемости результатов испытаний.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Использованный подход к валидации методики определения специфической активности эритропоэтина будет использован при разработке методических рекомендаций по валидации биологических методов.

Использование разработанного стандартного образца перспективно для совершенствования методики определения специфической активности с

использованием эритропоэтин-зависимых культур клеток с целью преодоления фармакокинетических недостатков (отрицательной корреляции).

Использование разработанного стандартного образца может быть полезным при разработке методов контроля активности препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека, основанных на принципах, отличных от стимуляции эритропоэза (неоангиогенез и блокировании апоптоза), что имеет научную и практическую значимость, обеспечивая расширение показаний к применению лекарственных препаратов эритропоэтина в клинической практике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Меркулов, В.А. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика / В.А. Меркулов, А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Л.А. Гайдерова, **А.К. Яковлев**, Н.В. Медуницын // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2013. – № 3 (47). – С. 4-11.
2. Солдатов, А.А. Доказательство подобия рекомбинантных эпоэтинов, зарегистрированных на основе принципов "BIOSIMILARS" (физико-химические и биологические свойства) / А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, Н.В. Медуницын, В.Д. Мосягин, Л.А. Гайдерова, **А.К. Яковлев**, В.П. Бондарев, А.Н. Миронов // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2014. – № 1 (49). – С. 11-22.
3. **Яковлев, А.К.** Сравнительная оценка методов световой иммерсионной микроскопии и проточной цитометрии при определении специфической активности рекомбинантных эритропоэтинов / **А.К. Яковлев**, Л.А. Гайдерова // Материалы III научно-практической конференции молодых ученых «Приоритетные направления развития экспертной деятельности в области обращения лекарственных средств». – М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. – 2014. – С. 64-68.
4. **Яковлев, А.К.** Результаты предварительной аттестации отечественной субстанции «Рэпоэтин-СП» для использования в качестве отраслевого стандартного образца биологической активности эритропоэтинов / **А.К. Яковлев.**, Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова, Н.П. Неугодова, Т.А. Батуашвили, Л.В. Симутенко, Е. Л. Постнова // Материалы IV научно-практической конференции молодых ученых «Научно-методические подходы оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств в Российской Федерации». – М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. – 2015. – С. 92-95.
5. **Яковлев, А.К.** Этапы стандартизации препаратов эритропоэтинов / **А.К. Яковлев**, Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова, Т.Н. Лобанова, Т.А. Батуашвили, Л.В. Симутенко, Е.Л. Постнова, Е.И. Юрчикова // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2015. – № 4 (56). – С. 17-20.
6. **Яковлев, А.К.** Изучение принципов стандартизации фармакологической активности препаратов рекомбинантных эритропоэтинов / **А.К. Яковлев**, Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова, Т.Н. Лобанова, Е.Л. Постнова, Е.И. Юрчикова,

- Т.А. Батуашвили, Р.А. Волкова, В.Н. Подкуйко, Ю.В. Олефир // Стандартные образцы. – 2016. – № 1. – С. 8-20.
7. Яковлев, А.К. Изучение возможности гармонизации метода определения специфической активности рекомбинантных эритропоэтинов с требованиями Европейской фармакопеи / А.К. Яковлев, Л.А. Гайдерова, В.Н. Подкуйко, Р.А. Волкова, Н.А. Алпатова, Ю.В. Олефир // Стандартные образцы. – 2016. – № 3. – С. 4-11.
 8. Яковлев, А.К. Аттестация стандартного образца активности эритропоэтина / А.К. Яковлев, Н.А. Алпатова, Т.А. Батуашвили, Л.В. Симутенко, Е.Л. Постнова, А.А. Воропаев // Сборник материалов XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов. – М.: Видокс. – 2017. – С.186-187.
 9. Алпатова, Н.А. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств / Н.А. Алпатова, Л.А. Гайдерова, А.К. Яковлев, Е.В. Мотузова, С.Л. Лысикова, А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17. – № 1 (61). – С. 13-26.
 10. Яковлев, А.К. Исследование стандартности методики определения специфической активности эритропоэтина на нормоцитемических мышцах / А.К. Яковлев, Н.А. Алпатова, Е.Л. Постнова, Л.В. Симутенко, Т.А. Батуашвили // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – № 5. – С. 77-78.
 11. Яковлев, А.К. Разработка отраслевого стандартного образца специфической активности эритропоэтина / А.К. Яковлев, Р.А. Волкова, Л.В. Симутенко, Е.Л. Постнова, Т.А. Батуашвили, А.А. Воропаев, Н.А. Алпатова, В.А. Томилин, Е.Д. Мыца, В.П. Бондарев, В.А. Меркулов // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 1. – С. 60-64.
 12. Яковлев, А.К. Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина / А.К. Яковлев, А.В. Алешкин, В.А. Меркулов, В.П. Бондарев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63. – № 7. – С. 422-428.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЕФ	– Европейская фармакопея
ИФА	– иммуноферментный анализ
МЕ	– международная единица
ОФС	– общая фармакопейная статья
рчЭПО	– рекомбинантный эритропоэтин человека
AntiLn	– антилогарифм
BRP	– Biological Reference Preparation, биологический референс-препарат
I _{95/2}	– полуширина доверительного интервала
IS	– международный стандартный образец