

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Яковлев Алексей Константинович

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА**

03.01.06. – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Меркулов Вадим Анатольевич

Москва – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы исследования	5
Цель исследования	6
Задачи исследования	6
Научная новизна исследования	6
Теоретическая и практическая значимость работы	7
Методология и методы исследования	8
Объекты исследования	9
Физико-химические методы исследования	13
Биологические методы исследования	14
Статистические методы	16
Личное участие автора в получении результатов	17
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	18
Степень достоверности и апробация результатов исследования	18
Объем и структура диссертации	19
ГЛАВА 1. Обзор литературы	20
1.1 Структура, свойства и механизм действия эритропоэтина	20
1.2 Препараты рекомбинантного эритропоэтина и их характеристика	23
1.3 Методы определения специфической активности лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека	28
1.4 Состояние вопроса стандартизации методики определения специфической активности препаратов эритропоэтина	36
1.5 Заключение	42
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	44
ГЛАВА 2. Разработка технологии изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина	44
2.1 Выбор кандидата в стандартный образец специфической активности эритропоэтина	44

2.2 Оценка качества кандидата в стандартный образец специфической активности эритропоэтина	46
2.3 Совершенствование стадии лиофилизации стандартного образца специфической активности эритропоэтина	52
2.4 Разработка технологической и биологической схем изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина	59
ГЛАВА 3. Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина	65
3.1 Изучение влияния линии мышей на результат определения	66
3.2 Сравнение точности проточной цитометрии и световой микроскопии	67
3.3 Обоснование дизайна методики	74
ГЛАВА 4. Валидация методики определения специфической активности эритропоэтина	85
4.1 Исследование специфичности	85
4.2 Изучение правильности	89
4.3 Оценка прецизионности	90
ГЛАВА 5. Аттестация стандартного образца специфической активности эритропоэтина.....	96
5.1 Установление значений аттестуемой характеристики стандартного образца и ее доверительных интервалов	96
5.2 Обоснование срока годности и разработка документации на стандартный образец специфической активности эритропоэтина	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	118
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121
ПРИЛОЖЕНИЯ	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Эритропоэтин – это цитокин, который стимулирует эритропоэз при взаимодействии с рецепторами на клетках-предшественниках костного мозга [93]. Лекарственные препараты рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) служат неотъемлемой частью патогенетической терапии [7, 30, 131] заболеваний и патологических состояний, сопровождающихся снижением количества эритроцитов и развитием симптоматической анемии [1, 22]. 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 ее завышение влияет на эффективность, а занижение – приводит к развитию нежелательных осложнений: гипертонии и тромбоцитозу с ишемией и инфарктом миокарда, инсульту, тромбозу вен и артерий [50, 75]. Следовательно, точное определение специфической активности важно для обеспечения безопасности применения лекарственных препаратов эритропоэтина.

Специфическую активность лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека, согласно ведущим Фармакопеям мира [60, 61], определяют биологическим методом по влиянию на стимуляцию гемопоэза у полицитемических и нормоцитемических мышей в сравнении со стандартным образцом (СО) и выражают в международных единицах (МЕ). Точность результатов определения специфической активности во многом зависит от качества стандартных образцов, а именно от правильности и прецизионности результатов, полученных при их разработке. Эталонем международных единиц

активности эритропоэтина служит международный стандартный образец [134] (эпоэтин альфа).

К началу наших исследований отечественный стандартный образец эритропоэтина отсутствовал [3]. Российские производители вынуждены использовать зарубежные стандартные образцы или откалиброванные по ним стандартные образцы предприятия, процедура аттестации которых не регламентирована.

Отсутствие в Государственной фармакопее Российской Федерации [6] общей фармакопейной статьи (ОФС), которая регламентирует определение специфической активности эритропоэтина, привело к ряду различий в методике у отечественных производителей. 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.

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. и к началу наших исследований отечественный стандартный образец эритропоэтина отсутствовал. Методики определения специфической активности эритропоэтина российских производителей различались между собой (по используемой линии мышей, количеству исследуемых доз, количеству параллельных испытаний, способу регистрации и учета результатов, а также требованиями к показателю) и отличались от зарубежных производителей [60, 61] 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 актуальна и представляет значительный научный и практический интерес.

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 «Эритропоэтина» 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. 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).

Объекты исследования

В работе использовали следующие стандартные образцы, лекарственные препараты эритропоэтина и реактивы.

Стандартные образцы:

3^{ий} международный стандарт эритропоэтина рекомбинантного для количественного определения биологической активности (3rd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant for bioassay, 3rd IS) (Кат. № 11/170);

Стандартный образец эритропоэтина Европейской Фармакопеи – European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP batch 3 (Кат. № E1515000);

Стандартный образец для физико-химических испытаний – Erythropoietin for physicochemical tests CRS batch 1.

Лекарственные препараты рчЭПО:

Эпокрин[®] (Эпоэтин альфа) раствор для внутривенного и подкожного введения 2000 МЕ, ФГУП «ГосНИИ ОЧБ», Россия;

Эральфон[®] (Эпоэтин альфа) раствор для внутривенного и подкожного введения 2000 МЕ шприцы 0,5 мл № 6, ЗАО «ФармФирма «Сотекс», Россия;

Веро-эпоэтин (Эпоэтин бета) лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и подкожного введения 2000 МЕ, флаконы № 10, ООО «ЛЭНС-Фарм», Россия;

Эпостим[®] (Эпоэтин бета) раствор для внутривенного и подкожного введения 2000 МЕ/мл, в ампулах по 1 мл, №10, ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», Россия;

Эритропоэтин (Эпоэтин бета) раствор для внутривенного и подкожного введения 2000 МЕ/мл ампулы 1 мл № 10, ЗАО «Биннофарм», Россия.

В качестве материала в СО специфической активности эритропоэтина использовали зарегистрированную в РФ субстанцию отечественного производства – Рэпоэтин-СП субстанция-раствор [концентрированный], международное непатентованное наименование – Эпоэтин альфа, производитель – Гос. НИИ ОЧБ ФМБА ФГУП – Россия.

В исследованиях использовали **реактивы/реагенты** отечественного и зарубежного производства:

- Фосфатно-солевой буфер, производства Gibco, кат. № 20012-019;
- Бычий сывороточный альбумин, производства Sigma-Aldrich, кат. № A3294-50G;
- D-(+)-трегалоза дигидрат, производства Symrise, кат. № 621094;
- Акридиновый оранжевый, производства Sigma-Aldrich, кат. № 235474;
- Натрия хлорид, производства Roth, кат. № 3957.1;
- Гидроксид натрия 1 М раствор, производства Merck, кат. № 1.09956.0001;
- Пробирки K₂ЭДТА, производства Greiner bio-one, кат. № 454024;
- Набор реагентов «Раствор бриллиантового крезилового синего для окраски ретикулоцитов в крови», производства ЗАО «Эколаб»;
- Масло иммерсионное для микроскопии, производства Roth кат. № X899.2;
- Набор для определения Эритропоэтина Quantikine[®] IVD[®] ELISA Human Erythropoietin, производства R&D, кат. № DEP00;
- Поликлональные кроличьи антитела против эритропоэтина человека, производства Sigma Aldrich, кат. № E2531.

Для проведения испытаний использовали следующее оборудование:

- Весы аналитические (Mettler Toledo AG, Швейцария);

- Весы электронные (ВСП-0,6/0,1-1 Вес-Сервис ЗАО, Россия);
- Спектрофотометр DU800UV/Visible;
- Перемешивающее устройство LS504S (Thermo Labsystems, Финляндия);
- Проточный цитофлуориметр Navios 10 color (Beckman Coulter, США);
- Прибор для капиллярного электрофореза PA 800 plus (Beckman Coulter, США);
- Флуоресцентный микроскоп Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия);
- Термошкаф суховоздушный EB-53 (JOUAN SA, Франция);
- Орбитальный термошейкер ST-3 (Elmi, Латвия);
- Сушка лиофильная Advantage XL (VirTis, США);
- pH-метр S220 Seven Compact (Mettler Toledo AG, Китай).

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.

Содержание и уход за лабораторными животными проводился с соблюдением всех правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах [62], и в соответствии с требованиями ГОСТ 33215-2014 [20] и ГОСТ 33216-2014 [21].

Животные содержались группами по 6-8 голов в клетках со сплошным дном и опилками в качестве подстилочного материала. Клетки располагались на стеллажах в несколько ярусов. Стеллажи для клеток имели затемненную верхнюю полку для снижения риска дегенерации сетчатки глаза у животных. Для обеспечения необходимой продолжительности светового дня и интенсивности освещения, в помещении наряду с естественным освещением предусмотрено контролируемое искусственное, что в сумме удовлетворяло биологические потребности животных и обеспечивало приемлемые условия среды их обитания с чередованием светлого/темного времени суток. Температура в помещениях

вивария поддерживалась на уровне от 20 до 24 °С, относительная влажность находилась в диапазоне от 45 до 65 %.

Рацион животных соответствовал пищевым и поведенческим потребностям и включал гранулированные корма, творог и овощи. Корм размещали не только в кормушках, но и таким образом, чтобы предоставить возможность его добывать. У всех животных был свободный доступ к чистой питьевой воде.

Чистка клеток проводилась регулярно один раз в 3-4 дня. При обращении с животными стремились минимизировать беспокойство и не нарушать условий их существования.

Эвтаназия животных проводилась с использованием методов, которые соответствуют принципам, изложенным в Рекомендациях Европейской Комиссии по эвтаназии экспериментальных животных [121].

Приготовление растворов

Приготовление стабилизирующего буфера

В мерную колбу вместимостью 50 мл, внесли 1,0 г D-(+)-трегалозы дигидрата, 50 мг бычьего сывороточного альбумина свободного от протеаз, 30 мг натрия хлорида, добавили 20,65 мл дистиллированной воды и перемешали. Раствор подвергли стерилизующей фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм и использовали в день приготовления.

Приготовление 0,1 % фосфатно-альбуминового буфера

В 500 мл фосфатно-солевого буфера растворили 500 мг бычьего сывороточного альбумина. Раствор подвергли стерилизующей фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм и хранили при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес.

Приготовление 0,001 М раствора акридинового оранжевого

3,7 мг акридинового оранжевого внесли в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворили в 0,9 % растворе натрия хлорида, довели объем раствора тем же растворителем до метки и перемешали. Раствор хранили в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 года.

Приготовление 5 мкМ раствора акридинового оранжевого

Непосредственно перед работой в колбу из темного стекла внесли 0,5 мл 0,001 М раствора акридинового оранжевого прибавили 99,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешали.

Физико-химические методы исследования

Определение концентрации белка проводили спектрофотометрическим методом по ФСП Р № 003458/01-050609, изм. № 1 в соответствии с требованиями ОФС 1.2.3.0012.15 [6].

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.2.1.0023.15 [6].

Капиллярный зонный электрофорез проводили в соответствии с требованиями ЕФ [61] на оборудовании РА 800 plus (Becman 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 [6] с использованием поликлональных кроличьих антител против эритропоэтина человека (Sigma Aldrich, США).

Лиофилизацию проводили 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). Способ включает следующие операции: приготовление фармацевтической композиции; предварительное замораживание при температуре минус 30 °С в течение 4 ч.; стадия заморозки (температура минус 40 °С, 6-10 ч. при атмосферном давлении); стадия первичного высушивания (температура минус 40 °С, 2-12 ч., снижение давления до 30 мТорр); повышение температуры до 30 °С в течении 23-70 ч. и вторичное высушивание (температура 30 °С, 12 ч., снижение давления до 1-5 мТорр).

Процесс лиофилизации контролировали по показаниям датчиков давления и температуры. По окончании программы давление в камере выравняли 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». В результате возбуждения газовой среды отмечали свечение ампул голубым или розово-голубым светом, что свидетельствовало об абсолютном остаточном давлении от 75 до 7500 мТорр. Ампулы без свечения и с фиолетовым свечением отбраковывали.

Испытания на однородность дозирования проводили в соответствии с ОФС 1.4.2.0008.15 [6] двумя способами: определением массы нетто с использованием электронных аналитических весов CP-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 CP-225D.

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

Биологические методы исследования

Методика определения специфической активности эритропоэтина на нормоцитемических мышцах

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, pH 7,2) готовили рабочие растворы стандартного и испытуемого образцов с концентрацией 80, 40 и 20 МЕ/мл.

Определение проводили на мышах линий *B6D2F1*, *F1(CBA*C57BL)*, *Balb/C* и беспородных, в возрасте 8 недель. Существенным условием получения достоверных результатов является то, что испытания стандартного и испытуемого образцов должны быть выполнены в идентичных условиях. С этой целью было проведено шифрование образцов крови и рандомизация лабораторных животных. Мышей предварительно взвешивали и, если вся совокупность экспериментальных объектов считалась однородной (разница в весе не более $\pm 0,5$ г) и не было никаких оснований полагать, что разброс эффектов будет меньшим внутри определенным образом сформированных подгрупп, распределение животных в группы с различным воздействием проводили случайным образом. Животных распределяли в 6 клеток (по количеству вводимых растворов), по 8 особей в каждую. Если разница в весе была более $\pm 0,5$ г, но не более ± 2 г, животных вначале распределяли на весовые группы с колебаниями массы тела в пределах $\pm 0,5$ г, помещая каждую группу в отдельную клетку, соответственно их весовой категории. Затем из каждой весовой группы по одному животному равномерно помещали в одну из 6 клеток (по количеству растворов), пока в клетке не будет 8 особей. Это необходимо для того, чтобы не оказалось, что распределенные объекты в подгруппах были более однородными, чем вся совокупность в целом. Такое распределение объектов позволило исключить незначимые источники вариации.

Животным в каждой из 6 клеток наносили определенную метку (красили пикриновой кислотой или выстригали шерсть). Каждому животному в одной из 6 клеток подкожно вводили по 0,5 мл одной дозы (одно из разведений испытуемого

препарата или стандартного образца). Затем с целью рандомизации 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 K_2 ЭДТА. Каждому образцу крови присваивали определенный номер, который соответствовал дозе, полученной животным, что обеспечивало эффект слепой рандомизации при подсчете количества ретикулоцитов.

С целью сравнительной оценки результатов испытания количество ретикулоцитов в каждом образце крови определяли двумя способами:

- проточной цитофлуориметрией;
- световой микроскопией.

Изучение стабильности

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 [6, 23, 24].

Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере в Windows 7 с использованием редактора Microsoft Office Excel 2007. Оценку точности результатов определения специфической активности рчЭПО, полученных с использованием проточной цитофлуориметрии и световой иммерсионной микроскопии, проводили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и XI Государственной фармакопеей СССР. При совершенствовании методики использовали монографию <1033> USP и дисперсионный анализ [130]. Экспериментальные величины представлены в виде среднего геометрического, среднего взвешенного и их доверительных интервалов, рассчитывали методом параллельных линий с помощью пакета прикладных компьютерных программ (PLA, версия 2.0, фирма «Stegmann Syst», Германия).

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).

Объем и структура диссертации

Материалы диссертационной работы изложены на 140 страницах машинописного текста и иллюстрированы 28 рисунками и 36 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 150 источников, из которых 120 на английском языке, и приложений.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Структура, свойства и механизм действия эритропоэтина

Эритропоэтин – это цитокин, который регулирует эритропоэз, стимулируя созревание эритроцитов [58, 115]. Продолжительность жизни эритроцитов составляет 100–120 суток [66], после чего они поглощаются макрофагами в костном мозге, селезенке и печени. Эти потери восполняются новыми эритроцитами, которые продуцируются в костном мозге ежесекундно в количестве около 2,5 миллионов [82]. Основным местом синтеза эритропоэтина в эмбриональном периоде служит печень [78], в постнатальном – почки [79, 94], 10–15 % синтезируется гепатоцитами и эпителиальными клетками, окружающими центральные вены. Кроме почек мРНК ЭПО обнаруживают в головном мозге, печени, селезенке, легких и семенниках, но эти органы не способны заменить почки при хронической почечной болезни. ЭПО, синтезируемый в головном мозге, действует локально, как нейропротективный фактор [111]. Продукция эритропоэтина имеет обратную зависимость от парциального давления кислорода в крови [59, 64]. Синтез ЭПО тесно связан с сигналами системы ренин-ангиотензин [83, 85, 87, 88] и контролируется на транскрипционном уровне. Контроль за синтезом гена расположен в почках, а за снижением его продукции – в печени [90].

История изучения эритропоэтина насчитывает более ста лет. В 1906 году профессор медицины Поль Карно (Paul Carnot) и его помощница Клотильда Дефландр (Clotilde Deflandre) сформулировали теорию гуморального регулирования эритропоэза. Термин «Эритропоэтин» был предложен Евой Бонсдорф (Eva Bonsdorff) и Евой Ялависто (Eeva Jalavisto) из Хельсинки в 1948 году [81].

Эритропоэтин представляет собой кислый гликопротеин, который состоит из 165 аминокислотных остатков и четырех углеводных цепей. Протеиновая часть молекулы эритропоэтина является стабильной структурой, ее молекулярная масса составляет 18,398 кДа [96]. Углеводная часть представлена тремя участками N-

гликозилирования по аминокислотным остаткам аспарагина в положениях 24, 38 и 83 и одним участком О-гликозилирования по серину в положении 126 [93]. Качественный и количественный состав углеводных компонентов О- и N-цепей может меняться и достигать 65 % молекулярной массы белковой части эритропоэтина [54], при этом около 17 % всех углеводных компонентов приходится на сиаловую кислоту [124] (Рисунок 1).

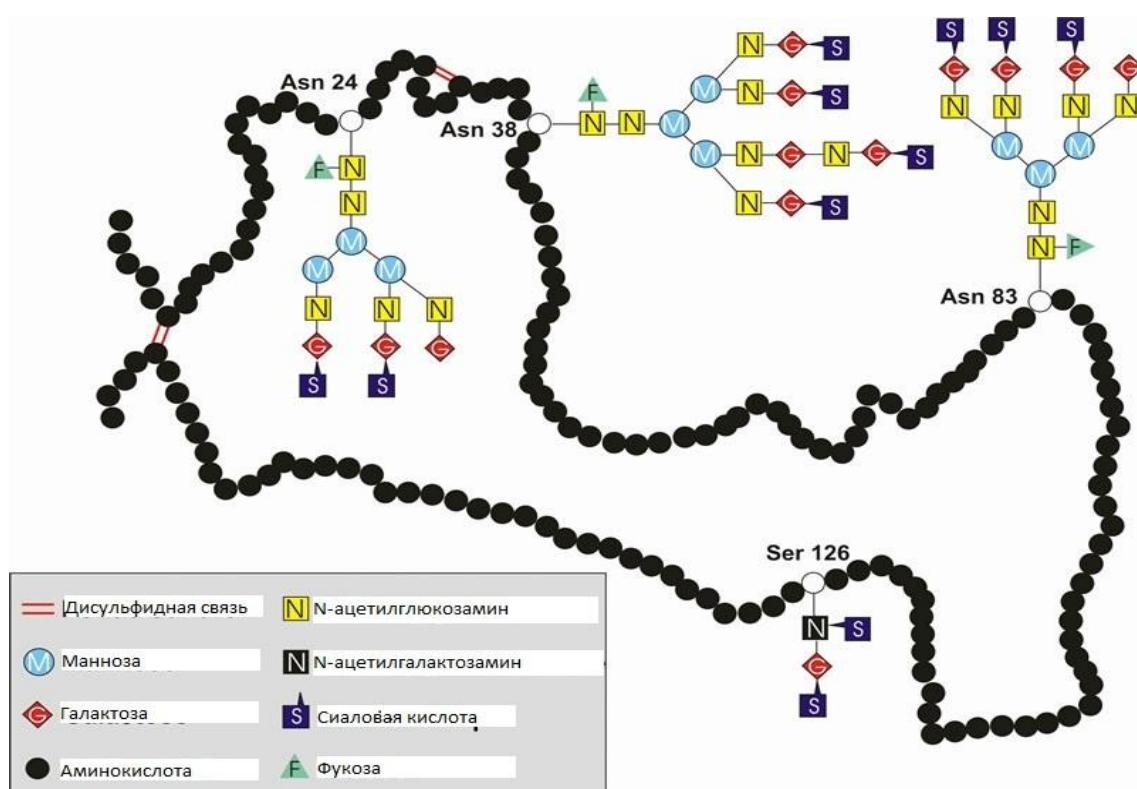


Рисунок 1 – Молекула эритропоэтина [31].

Установлено, что существует более сотни различных эндогенных изоформ эритропоэтина с различной биологической активностью благодаря структурным перестановкам в этих четырех гликанах [134]. Молекулярная масса эритропоэтина зависит от степени гликозилирования его молекулы и может достигать 37 кДа.

Эритропоэтин входит в семейство цитокинов 1 класса, которое объединяет белки с компактной глобулярной структурой, представляет собой глобулу, образованную четырьмя антипараллельными альфа-спиралями [44] с двумя бета-складками и двумя внутренними дисульфидными связями между цистеинами в положении 7–161 и 29–33 [138, 142], которые необходимы для проявления биологической активности [100].

Биологические эффекты молекулы эритропоэтина осуществляются посредством связывания активного центра со специфическими мембранными рецепторами клетки-мишени. На сегодняшний день известно два типа рецепторов: гомодимер рецептор эритропоэтина (EPOR) и гетеродимер, состоящий из специфической субъединицы EPOR и 131 кластера дифференцировки (CD131), являющегося β -цепью для рецепторов цитокинов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, интерлейкина 3 и интерлейкина 5 [48]. Проявление биологического действия эритропоэтина зависит как от типа рецептора, так и от клеток-мишеней. Клетками-мишенями для эритропоэтина являются бурстобразующая эритроидная единица на поздних стадиях ее развития [125] и колониеобразующая эритроидная единица [70, 71, 112]. Под действием эритропоэтина эти клетки начинают пролиферировать и дифференцироваться, а в его отсутствии – подвергаются апоптозу [86, 92]. Кроме эритроидных предшественников, рецепторы к эритропоэтину обнаружены на эндотелиальных клетках [36, 37], гладкомышечных клетках сосудов [34, 40], астроцитах, нервных клетках и клетках плаценты [126], клетках почек и слизистой оболочки желудка, а также на некоторых раковых клетках [73, 119, 139]. В связи с этим эритропоэтин, кроме его основного действия – стимуляции эритропоэза, обладает рядом других биологических эффектов. В организме ЭПО увеличивает количество предшественников эндотелиальных клеток [42, 74, 148], обладает нейропротективным и нейротрофическим действием [65, 118, 122], активирует митоген-активируемый протеинкиназный [35] и фосфатидилинозитол-3-киназный пути, которые опосредованно ингибируют апоптоз [34, 86, 145]. Действие эритропоэтина на клетку прекращается после дефосфорилирования EPOR, далее комплекс EPO/EPOR интернализуется внутрь клетки. Около 60 % эритропоэтина ресекретируется, а 40 % – подвергается протеосомальной деградации внутри клетки. Предполагается, что это – основной механизм деградации циркулирующего эритропоэтина [72, 84]. При этом одна молекула стимулирует разные физиологические реакции, необходимые для восстановления после травм,

как на уровне целостного организма (преодоление кровопотери), так и на уровне отдельных органов и тканей.

Таким образом, у молекулы ЭПО выделяют три основные функции или биологических эффекта: активация эритропоэза, стимуляция ангиогенеза [55, 89, 97, 136, 147, 148], блокирование апоптоза [19, 91]. Некоторые публикации указывают на то, что в ближайшем будущем у препаратов рекомбинантных эритропоэтинов, вероятно, появятся новые показания к применению, связанные с их цитокиновой активностью, отличной от стимуляции эритропоэза [76, 106, 109, 110, 120, 123, 149]. Эти, на первый взгляд, совершенно разнонаправленные активности в итоге складываются в единую систему обеспечения восстановления эритропоэза в саногенезе организма, и в дальнейшем могут быть учтены при определении специфической активности. По мнению ведущих специалистов, плеiotропность биологического действия ЭПО интегрируется в эритропоэтиновую активность, повышает значимость лекарственных препаратов рчЭПО и расширяет спектр их применения.

1.2 Препараты рекомбинантного эритропоэтина и их характеристика

Лекарственные препараты рчЭПО применяют при лечении симптоматической анемии [1, 22] при хроническом заболевании почек у больных [29, 41, 108, 143], находящихся на диализе, симптоматической анемии почечного генеза [52], симптоматической анемии вызванной химиотерапией солидных и гематологических немиелоидных опухолей, а также для увеличения объема донорской крови, предназначенной для последующей аутоотрансфузии. За последние два десятилетия препараты эритропоэтина были использованы более чем у миллиона пациентов [46], преимущественно с хронической почечной болезнью [33, 113, 141, 150]. Согласно данным статистики, хронической почечной болезнью страдает около 10 % населения, а среди лиц старше 64 лет – 33 % [51]. В 2005 г. совокупные мировые продажи эпоэтина альфа составили 6,163 млрд. долларов [98]. В кризис 2008 г. препараты рекомбинантного эритропоэтина были

составной частью «локомотива» восстановления фармацевтической промышленной биотехнологии.

В Российской Федерации, по данным государственного реестра лекарственных средств МЗ [3], зарегистрировано 6 фармацевтических субстанций рчЭПО, 5 отечественного производства и одна – зарубежного, 14 лекарственных препаратов, 7 из которых отечественные и 7 – зарубежные (Таблица 1).

Таблица 1 – Препараты рчЭПО, зарегистрированные в РФ

№ п/п	Наименование		Наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения лекарственного препарата
	Торговое	Международное непатентованное	
1	2	3	4
Фармацевтические субстанции			
1.	Эритропоэтин альфа человеческий рекомбинантный	Эпоэтин альфа	АО "Биннофарм" - Россия
2.	Эритропоэтин	Эпоэтин альфа	ЗАО "ФармФирма "Сотекс" - Россия
3.	Эпоэтин	Эпоэтин бета	Шаньдун Кэсин Биопродактс Ко. Лтд - Китай
4.	Рэпоэтин-СП	Эпоэтин альфа	Гос. НИИ ОЧБ ФМБА ФГУП - Россия
5.	Эритропоэтин человека рекомбинантный	Эпоэтин бета	Микроген НПО ФГУП - Россия
6.	Эритропоэтин человека рекомбинантный	Эпоэтин бета	ООО "ФАРМАПАРК" - Россия
Российские лекарственные препараты			
1.	Эпокрин®	Эпоэтин альфа	ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Россия
2.	Эральфон®	Эпоэтин альфа	ЗАО «ФармаФирма «Сотекс», Россия
3.	Эпостим	Эпоэтин бета	ОАО «Фармапарк», Россия
4.	Эритропоэтин	Эпоэтин бета	ЗАО "Биннофарм", Россия
5.	Веро-эпоэтин	Эпоэтин бета	ООО "ЛЭНС-Фарм", Россия
6.	Эритростим	Эпоэтин бета	ФГУП "НПО "Микроген" Минздрава России, Россия
7.	Эпоэтин бета		
Зарубежные лекарственные препараты			
1.	Эпрекс®	Эпоэтин альфа	Веттер Фарма Фертигунг ГмбХ и Ко. КГ, Германия
2.	Бинокрит®	Эпоэтин альфа	Сандоз ГмбХ, Австрия Производитель - Ай Ди Ти Биологика ГмбХ, Германия
3.	Эпоратио	Эпоэтин тета	Тева Фармацевтические Предприятия Лтд, Израиль

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
4.	Аэприн®	Эпоэтин альфа	Лаборатория Тьютор С.А.С.И.Ф.И.А., Аргентина
5.	Рекормон	Эпоэтин бета	Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария
6.	Аранесп	Дарбэпоэтин альфа	Амджен Европа Б.В, Нидерланды
7.	Мирцера	Эпоэтин бета [метоксиполи- этиленгликоль]	Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария

Лекарственные средства этой группы входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения» [25].

Ген эритропоэтина человека был клонирован в бактериальных клетках *Escherichia coli* в 1983 г. [137]. Из-за принципиального отличия системы гликозилирования бактериальных клеток синтезированный эритропоэтин имел молекулярную массу, соответствующую дегликозилированному цитокину [56]. В дальнейшем рчЭПО был получен с использованием клеток насекомых (вектор на основе бакуловируса), он имел молекулярную массу 23 кДа, и в экспериментах на культуре эритропоэтин-зависимых клеток его активность соответствовала нативному цитокину, однако в исследованиях *in vivo* была установлена более низкая биологическая активность. Наиболее удачными были исследования Lin F.K. с соавт. [99], которые первыми получили эритропоэтин в культуре эпителиоподобных клеток яичника китайского хомячка. В дальнейшем рчЭПО был получен и на других клеточных линиях.

Препараты рчЭПО являются одними из первых успешно применяемых в медицинской практике биотехнологических лекарственных средств. В 1985 г. начались клинические исследования первого лекарственного препарата рчЭПО [144]. В 1989 г. американская фармацевтическая компания «Амджен» выпустила на рынок препарат Erogen (эпоэтин альфа). Затем фирмами «Roche» и «Chugai» были выпущены препараты Recormon и Erogin (эпоэтин бета).

Гликозилирование молекулы эритропоэтина не контролируется на генетическом уровне, это посттрансляционный процесс [67, 96, 114, 127], поэтому в разных производственных условиях практически невозможно получить

идентичные молекулы рчЭПО [77]. Лекарственные препараты рчЭПО, выпускаемые разными производителями, отличаются по степени гликозилирования. В связи с этим международной группой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) было принято решение о присвоении разных международных непатентованных наименований (МНН) препаратам эритропоэтина, с различной степенью гликозилирования [63]. Для формирования МНН предложено использовать корень – poetin [146], при неизменной аминокислотной последовательности добавляется приставка «э» («е» в английском варианте) – эпэтин, особенности гликозилирования отражаются путем добавления буквы греческого алфавита. В настоящее время существует девять МНН эпэтинов (альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон, каппа, омега, тета и дзета), что фактически отражает разработку нового производственного процесса получения рекомбинантного эритропоэтина. Для препаратов, которые имеют модифицированную последовательность аминокислот, добавляют приставку «дарб».

Степень гликозилирования молекулы эритропоэтина влияет на фармакокинетику препарата, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Фармакокинетика препаратов рчЭПО [8-18]

Международное непатентованное наименование	ММ, кДа	Фармакокинетика			
		Подкожное введение			Внутривенное введение, период полувыведения, ч
		Достижение максимальной концентрации, ч	Биодоступность *, %	Период полувыведения, ч	
Эпэтин альфа	28-34	12-18	25-40	16-24	5-6
Эпэтин бета	34-37	12-28	23-42	13-28	4-12
Эпэтин тета	30,6	10-14	31	34	4-6
Дарбэпэтин альфа	37,1	н/д	37	73	21-24
Эпэтин бета [метоксиполиэтиленгликоль]**	≈ 60	72-95	54-62	139-142	134

Примечание: * по сравнению с внутривенным введением; ** химическое название, МНН - отсутствует

Одним из путей повышения эффективности рчЭПО служит увеличение молекулярной массы, что приводит к удлинению периода полувыведения

препарата из крови. Увеличения молекулярной массы можно достичь путем использования одного из двух подходов – изменения аминокислотного состава белковой части гликопротеина и прикрепления в этих местах дополнительных карбогидратных цепей или в результате полимеризации с метоксиполиэтиленгликоль бутановой кислотой.

В 2001 г. на фармацевтическом рынке появился новый препарат второго поколения – NESP (Novel erythropoiesis stimulating protein) новый эритропоэз стимулирующий белок, МНН Дарбэпоэтин альфа, который разработала фирма «Амджен», в РФ препарат зарегистрирован под торговым наименованием Аранесп. Аминокислотная последовательность Дарбэпоэтина отличается от нативного и рекомбинантного эритропоэтина человека. В белковом ядре молекулы Дарбэпоэтин альфа путем сайт-направленного мутагенеза проведена замена пяти аминокислот (Ala 30 Asn, His 32 Thr, Pro 87 Val, Trp 88 Asn и Pro 90 Thr), благодаря чему к остаткам аспарагина в позициях 30 и 88 добавлено две дополнительные N-олигосахаридные цепи [57]. Аранесп имеет большую молекулярную массу и отличается повышенным количеством сиаловых кислот, благодаря чему увеличен период полувыведения до 24 часов [101] по сравнению с лекарственными препаратами рчЭПО первого поколения, у которых он составляет 4-12 часов.

Компания «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд.» разработала препарат третьего поколения – С.Е.Р.А. (Continuous Erythropoietin Receptor Activator – активатор рецепторов эритропоэтина длительного действия), в РФ препарат зарегистрирован под торговым наименованием Мирцера, который отличается от нативного эритропоэтина и препаратов предыдущих поколений наличием амидной связи между N-концевой аминогруппой или ε-аминогруппой лизина, преимущественно Lys⁵² и Lys⁴⁵, и метоксиполиэтиленгликоль бутановой кислотой [102]. Данная комбинация позволила повысить молекулярную массу до 60 кДа, при этом белковая часть молекулы осталась неизменной. Полимеризация привела к снижению сродства активного центра эритропоэтина к соответствующему рецептору на клетках, поэтому препарат по сравнению с эпоэтином бета обладает

более низкой специфической активностью *in vitro*. Однако Мирцера отличается значительно более длительным периодом полувыведения и имеет большую активность *in vivo* [43, 103, 105].

Таким образом, промышленный выпуск лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека стал возможным после расшифровки гена и разработки технологии получения рчЭПО на основе клеток линии СНО. Препараты рекомбинантного эритропоэтина служат неотъемлемой частью патогенетической терапии заболеваний и патологических состояний, сопровождающихся снижением количества эритроцитов. Их применение позволяет устранить анемический синдром, уменьшить потребность в гемотрансфузиях, снизить инфекционную заболеваемость, повысить качество жизни. Лекарственные препараты рчЭПО по своей природе гликопротеины, при неизменной белковой части молекулы, гликаны в их составе очень вариабельны. Структура олигосахаридных цепей зависит от клеток-продуцентов и условий их культивирования.

1.3 Методы определения специфической активности лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека

Одним из основных показателей качества, отражающих эффективность и безопасность лекарственных препаратов рчЭПО, служит специфическая активность. Объективная информация о ее величине и точность оценки позволяют гарантировать терапевтические возможности данных лекарственных средств, поскольку ошибка в сторону завышения оценки влияет на эффективность, а в сторону занижения – приводит к развитию нежелательных осложнений: гипертонии и тромбоцитозу с ишемией и инфарктом миокарда, инсульту, тромбозу вен и артерий [50, 75].

Наличие в составе лекарственных препаратов эритропоэтина нескольких изоформ в разном процентном соотношении с разной биологической активностью исключает возможность применения физико-химических методов для определения специфической активности и обуславливает дозирование препарата

не по количеству вещества, а по его активности. Специфическая активность проявляется ответной реакцией организма на количество введенного препарата в виде стимуляции эритропоэза, в результате получают безразмерный показатель. В связи с этим ВОЗ рекомендует определять активность эритропоэтина в относительных – международных единицах, отражающих биологическую активность.

Комитет биологической стандартизации при ВОЗ разработал эталон МЕ эритропоэтина – международный стандартный образец и установил процедуру определения. Определение специфической активности проводят биологическим методом по влиянию на стимуляцию гемопоэза у полицитемических и нормоцитемических мышей (Таблица 3) в сравнении со стандартным образцом.

Таблица 3 – Фармакопейные требования и особенности определения специфической активности препаратов рчЭПО [60, 61, 117]

Метод	Основные особенности методики	Требования фармакопей		
		Европейская	Американская	Китайская
1	2	3	4	5
Биологический, полицитемические мыши	Активность оценивают по стимулированию включения ^{59}Fe в циркулирующие эритроциты мышей с полицитемией	+		-
Биологический, нормоцитемические мыши	Рассчитанная активность, %, (доверительный интервал, $P=0,95$)	от 80 до 125 (от 64 до 156)		80-140 -
	Дозы, МЕ/мл	80, 40, 20		
	Количество мышей	8		4
Биологический, эритропоэтин зависимые клеточные линии (UT-7 или др.)	Рассчитанная активность, %, (доверительный интервал, $P=0,95$)	-	от 80 до 125 (от 74 до 136)	-

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
ИФА	Рассчитанная активность, %, (доверительный интервал, P=0,95)	-		80-120 -

Примечания: – «+» методика включена в фармакопею;
– «-» методика отсутствует в фармакопеи;
– в РФ ОФС «Эритропоэтины» находится на стадии разработки.

Как видно из таблицы 3, специфическую активность эритропоэтина определяют биологическим методом *in vivo* на полицитемических и нормоцитемических мышах, биологическим методом *in vitro* на эритропоэтин зависимой культуре клеток и ИФА.

При использовании полицитемических мышей активность препарата оценивают по стимулированию включения изотопа ^{59}Fe в циркулирующие эритроциты мышей с полицитемией, вызванной пониженным атмосферным давлением. Выполнение данной методики связано с использованием радиоактивной метки, в связи с этим, она менее широко применяется в настоящее время (Рисунок 2).

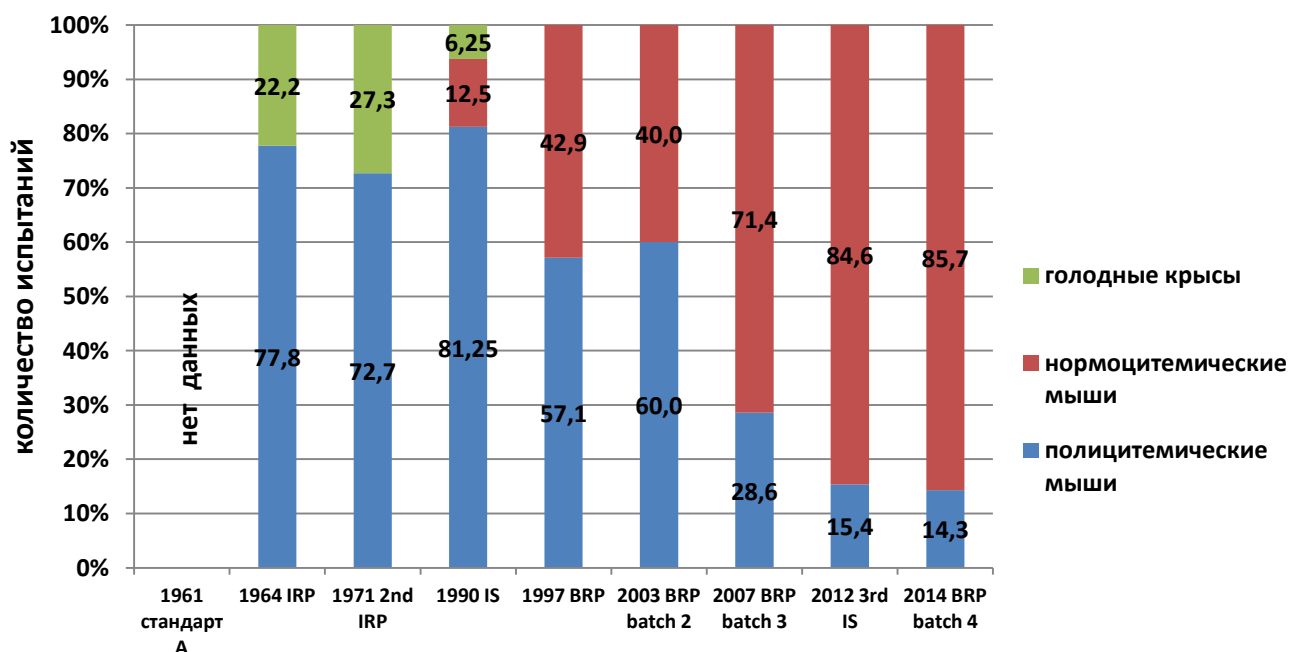


Рисунок 2 – Частота использования методик определения специфической активности при аттестации стандартных образцов эритропоэтина

Методика определения специфической активности рчЭПО на нормоцитемических мышцах не требует использования барокамеры и радиоактивной метки, поэтому более предпочтительна. При использовании данной методики стимуляцию эритропоэза оценивают микрофлуориметрически, определяя количество ретикулоцитов, окрашенных флуоресцентным красителем, с помощью проточного цитометра.

В американской фармакопее в ОФС «Эритропоэтин» для оценки качества по показателю «Специфическая активность» в 2013 г. введен метод *in vitro* на эритропоэтин-зависимой культуре клеток. Использование данного метода возможно только после подтверждения прямой корреляции результатов, полученных методами *in vivo* и *in vitro*, поскольку, асиалированный и сиалированный эритропоэтин в условиях *in vivo* и *in vitro* имеют разную активность [107]. Сиалирование молекулы эритропоэтина влияет на фармакокинетику, иммуногенность [80], проявление биологической активности и в целом на терапевтическую эффективность препарата [95]. Сиаловые кислоты, входящие в состав углеводной части эритропоэтина, маскируют сахара, являющиеся антигенными детерминантами [32, 45, 129, 132]. При отщеплении сиаловых кислот концевым сахаром становится галактоза и такой эритропоэтин (асиалированный) поглощается клетками печени [68, 69, 128], не достигая клеток-мишеней. Чем больше сиаловых остатков в молекуле рчЭПО, тем дольше его циркуляция в организме. В методике *in vitro* асиалированный эритропоэтин более активен по сравнению с сиалированным, что обусловлено большей аффинностью связывания с рецепторами [140]. Наличие лектиновых рецепторов в клетках печени, а также большая аффинность дегликозилированного эритропоэтина объясняют отрицательную корреляцию между результатами определения его специфической активности методами *in vivo* и *in vitro* [132].

Добиться прямой корреляции результатов методов *in vivo* и *in vitro* возможно двумя способами:

1. Испытуемый и стандартный препараты должны иметь одинаковое процентное соотношение изоформ, что связано со стабильностью производства.

Этот подход реализован в препарате Аранесп, что подтверждается более жесткими требованиями к процентному соотношению изоформ. В отличие от природного и рекомбинантного эритропоэтинов, у которых активность, определяют в МЕ, у Аранеспа – в мкг белка (доля углеводного компонента при этом не учитывается), 1 мкг препарата эквивалентен 200 МЕ рчЭПО [84]. Производитель подтвердил прямую корреляцию результатов, полученных методами *in vivo* и *in vitro*. В качестве референс-препарата используется стандартный образец предприятия, аттестованный относительно международного стандарта методом *in vivo* для переноса МЕ, установленных на мышах, на культуру клеток.

2. Путем предварительного удаления асиалированного эритропоэтина перед определением специфической активности на эритропоэтин-зависимых клеточных линиях. Данный подход предложен L. Peter с соавторами, в 1996 г. получен патент на способ определения биологической активности эритропоэтина *in vitro* [116]. Принцип запатентованного метода заключается в том, что испытуемые образцы вначале инкубируют с культурой клеток, которая поглощает десиалированный эритропоэтин. В другой модификации этого метода для удаления десиалированного эритропоэтина используют хроматографию. После чего образцы инкубируют с эритропоэтин-зависимой культурой клеток, в которые встроен ген люциферазы, и по уровню пролиферации клеток определяют активность эритропоэтина, по сути, моделируются условия целого организма. Данный метод используется для определения специфической активности препарата Эпрекс.

В Китайской фармакопее для определения специфической активности эритропоэтина наряду с биологической методикой на нормоцитемических мышах используется ИФА, что на наш взгляд, совершенно необоснованно. Поскольку ИФА указывает на специфичность связывания эритропоэтина с антителами, и не служит подтверждением его активности в организме. Данный метод подходит для подтверждения антигенной идентичности, поэтому его целесообразно использовать для оценки по показателю «Подлинность».

В настоящее время производители лекарственных средств пытаются заменить методы с использованием лабораторных животных на более точные физико-химические методы. В отчетах Европейского директората по качеству медицинских препаратов рассматривается возможность косвенной оценки активности по результатам физико-химических методов. Этот подход разработан Малдерсом и его коллегами [104]. Установив значимую корреляционную связь между процентным содержанием изоформ и биологической активностью, как они считают, это может быть использовано для прогнозирования специфической активности. Однако следует учитывать, что связывание ЭПО с рецептором на клетке мишени и передача сигнала внутрь клетки определяется структурой белка, а не углеводной частью молекулы, которая в основном связана с фармакокинетикой препарата. Поэтому, на сегодняшний день до конца не ясно насколько данный подход будет удовлетворять условиям, необходимым для обоснования замены биологического метода на физико-химические.

До введения в ЕФ (2008 г.) ОФС «Эритропоэтин, раствор концентрированный», каждый производитель представлял собственные требования для оценки качества препаратов данной группы. В связи с этим нормативная документация препаратов разных производителей отличалась по перечню оцениваемых показателей, методов, используемых для их оценки, а также по нормативным требованиям к некоторым из них. Например, имел место более широкий предел допустимых значений по показателю специфическая активность (70-140 %) по сравнению с требованиями, введенными в ЕФ (80-125 %), отсутствие доверительного интервала полученного значения. Аналогичная ситуация в настоящее время наблюдается и в РФ, так как ОФС на эритропоэтин находится в стадии разработки. Отсутствие в РФ единых регламентирующих требований (ОФС) к оценке качества препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека привело к различиям в нормативной документации у отечественных производителей и от требований ЕФ (Таблица 4).

Таблица 4 – Параметры методики определения специфической активности лекарственных препаратов рчЭПО отечественных производителей и требования Европейской фармакопеи

Параметр	Требования						
	Нормативной документации отечественных производителей						Европейской фармакопеи
	1	2	3	4	5	6	
Линия мышей	беспородные	F1(CBA*C57BL) Balb/c	Balb/c	F1(CBA*C57BL)			B6D2F1
Количество мышей в группе	не менее 7	5	8	6			не менее 8
Дозы, МЕ/мл	0,10,20,40,80		0, 20, 40, 80	20, 40, 80			20, 40, 80
Способ подсчета ретикулоцитов	Визуальный		Визуальный/ гемализатор	Микрофлуориметрический			Микрофлуориметрический
Статистический метод	Регрессионный	Параллельных линий		Регрессионный			Параллельных линий
Критерий приемлемости испытания	-	Подобие испытуемого образца стандартному (параллелизм)		-			Подобие испытуемого образца стандартному (параллелизм)
Диапазон рассчитанной активности, %	80-120		80-125	80-120			80-125
Доверительный интервал рассчитанной активности, (P=0,95), %	-						64-156

Примечание: «-» данный параметр не используют в схеме методики

В ОФС на «Эритропоэтин раствор концентрированный» ЕФ определение специфической активности рекомендуется проводить биологическим методом *in vivo* на полицитемических и нормоцитемических мышах линии B6D2F1, количество особей в каждой группе не менее 8, рассчитанная активность должна быть в диапазоне от 80-125 %, а её доверительный интервал ($P=0,95$) от 64-156 %.

Анализ нормативной документации препаратов эритропоэтина, зарегистрированных в РФ, показал, что для оценки специфической активности большинство производителей 69,2 % используют метод *in vivo* на нормоцитемических мышах, 15,4 % - метод *in vitro* на культуре клеток и 7,7 % - метод *in vivo* на полицитемических мышах, а 7,7 % вместо определения специфической активности проводят количественное определение рчЭПО с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Рисунок 3).

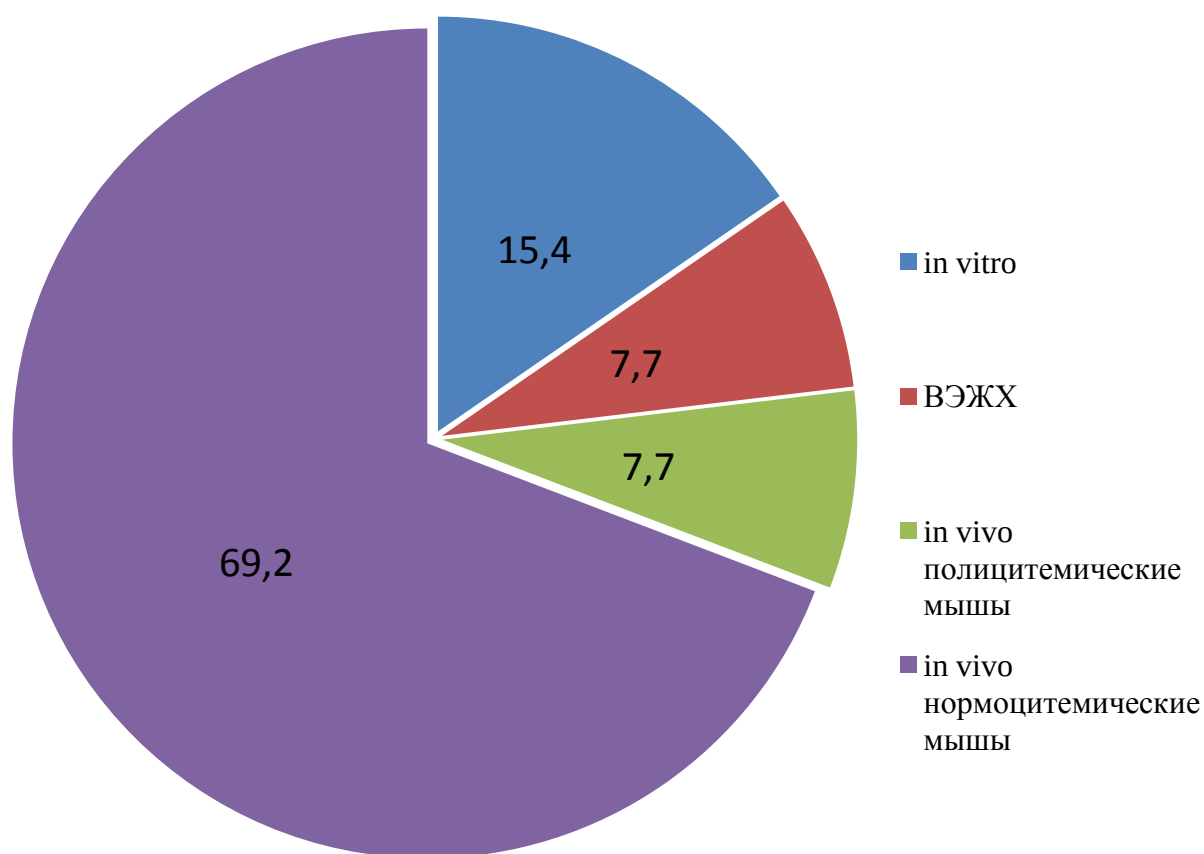


Рисунок 3 – Методы определения специфической активности лекарственных препаратов рчЭПО в РФ

Таким образом, на сегодняшний день в РФ и в мире в целом биологический метод *in vivo* по влиянию на стимуляцию гемопоэза у нормоцитемических мышей

является основным методом определения специфической активности препаратов рчЭПО. Процедура, данного метода закреплена на уровне ВОЗ и позволяет наиболее корректно с учетом всех особенностей фармакокинетики эритропоэтина определять специфическую активность в условиях, приближенных к клиническому применению препарата.

1.4 Состояние вопроса стандартизации методики определения специфической активности препаратов эритропоэтина

В основе определения специфической активности эритропоэтина лежит принцип сравнения биологического эффекта испытуемого препарата с эффектом известной активности стандартного образца. Поэтому стандартный образец является неотъемлемой частью в проведении экспертизы качества лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина и позволяет оценить сопоставимость полученных результатов, обеспечивая необходимую точность и прослеживаемость измерений [2, 26].

В области обращения лекарственных средств принят следующий термин: стандартные образцы – вещества, посредством сравнения с которыми осуществляется контроль качества лекарственных средств с помощью физико-химических и биологических методов в целях подтверждения соответствия лекарственных средств требованиям нормативной документации, установленным при осуществлении государственной регистрации, и которые применяются для калибровки стандартных образцов производителя лекарственных средств, используемых для контроля качества и иных целей при обращении лекарственных средств [27, 28].

Необходимость в разработке стандартного образца для количественного определения биологической активности эритропоэтина появилась в 1959–1960 гг. [53]. Учитывая сведения, представленные в публикациях [38, 39, 47, 134], всю историю разработки стандартных образцов можно условно разделить на два этапа (Рисунок 4).

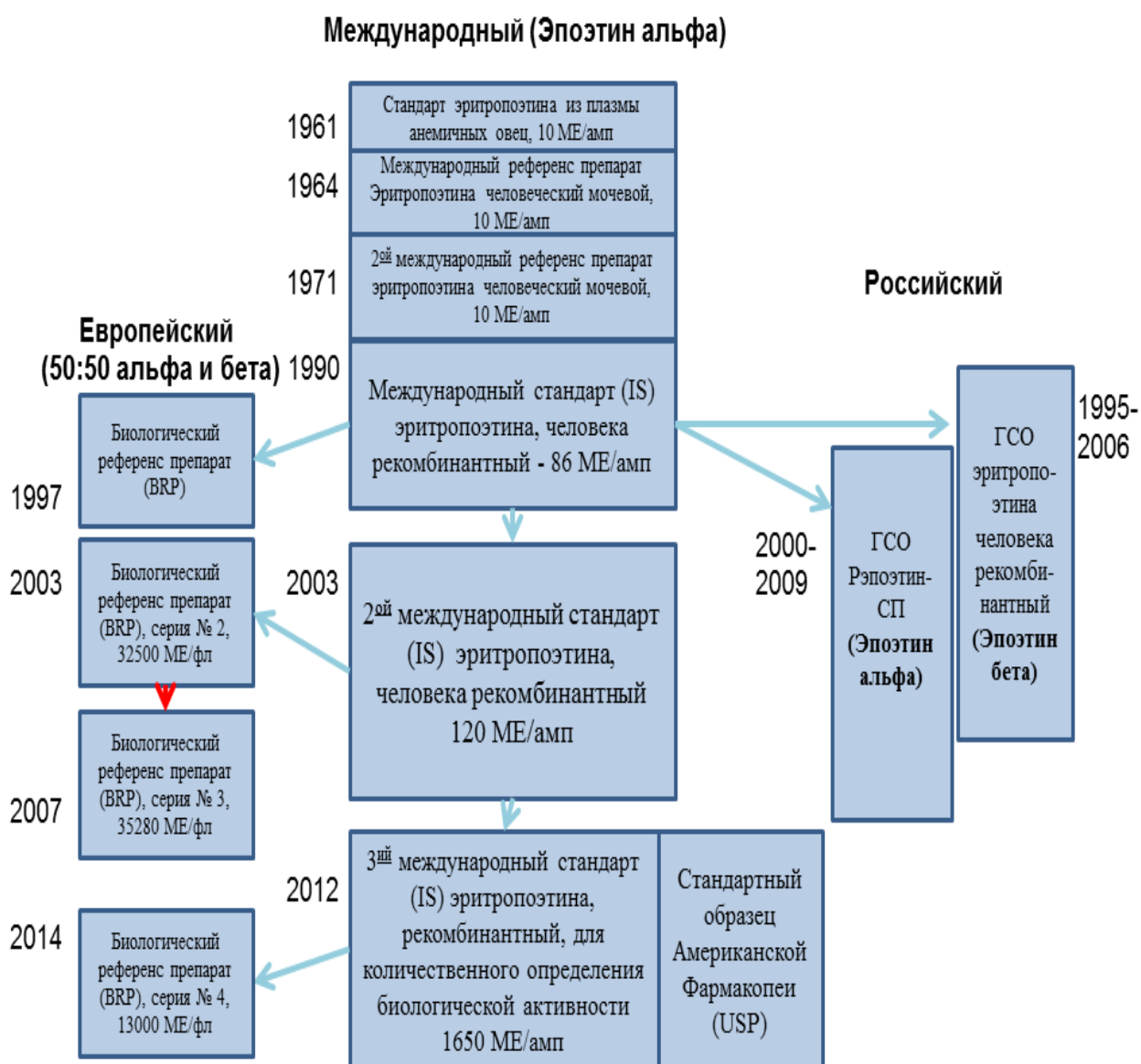


Рисунок 4 – Этапы разработки стандартных образцов эритропоэтина

На первом этапе – с 1961 по 1990 гг. – эритропоэтин получали путем выделения из естественных доступных источников (плазмы крови и мочи), основные трудности были связаны с его низким содержанием в биологических материалах. В 1961 г. разработали первый стандарт эритропоэтина (стандарт А), исходным материалом для которого послужила плазма анемичных овец. Активность стандарта составляла 10 МЕ на ампулу, за единицу активности приняли действие 5 мМ раствора хлорида кобальта [53]. Избыточное поступление хлорида кобальта в организм сопровождается состоянием гипоксии [49], поскольку кобальт вытесняет атом железа из гемасенсорной молекулы. При этом воспроизводятся условия низкого напряжения кислорода в тканях, что запускает

синтез эритропоэтина и, в последующем, пролиферацию предшественников эритроцитов.

В 1964 г. был разработан стандарт В, или международный референс-препарат (IRP), аттестацию которого провели по стандарту А. В качестве исходного сырья для получения стандарта В использовали смесь из 4 партий природного эритропоэтина, выделенного из мочи пациентов с анемией. Межлабораторные исследования по аттестации стандарта В были проведены в 3-х лабораториях. Международная единица установлена как активность, содержащая 1,48 мг стандарта В, что эквивалентно биологической активности одной единицы Стандарта А [53].

В 1971 г. в 10 лабораториях проведены исследования по аттестации 2^{го} международного референс-препарата природного эритропоэтина человека (2nd IRP) (Erythropoietin, human, urinary, Lyophilized, 10 IU/ampoule. 2nd International Reference Urinary hormone 67/343), а также дополнительные межлабораторные исследования, в которых данный стандарт сравнили с препаратами, полученными из плазмы овец и кролика. Результаты проведенных исследований отвечали критериям параллельности и линейности, поэтому были сделаны выводы, что изученные препараты можно использовать при разработке внутрилабораторных стандартов [38].

Определение активности эритропоэтина до 1971 г. включительно проводили биологическим методом *in vivo* на полицитемических мышах и голодных крысах. Полицитемию вызывали понижением атмосферного давления, кровопусканием или понижением атмосферного давления с последующим кровопусканием. Активность препарата оценивали по стимулированию включения ⁵⁹Fe в циркулирующие эритроциты. И только с 1990 г. для определения специфической активности стали использовать нормоцитемических мышей, оценивая влияние препаратов на стимуляцию ретикулоцитоза по соотношению окрашенных ретикулоцитов к эритроцитам. В связи с тем, что несовершенство методов выделения и очистки эритропоэтина из биологического материала не позволяло получать препараты с активностью более 10 МЕ/амп и в достаточном количестве,

на начальном этапе в качестве внутрилабораторных стандартов использовали препараты из плазмы овец и кроликов [38]. По этой же причине невозможно было провести расширенные межлабораторные исследования. Сведения о количестве лабораторий, принимавших участие в межлабораторных исследованиях, представлены на рисунке 5.

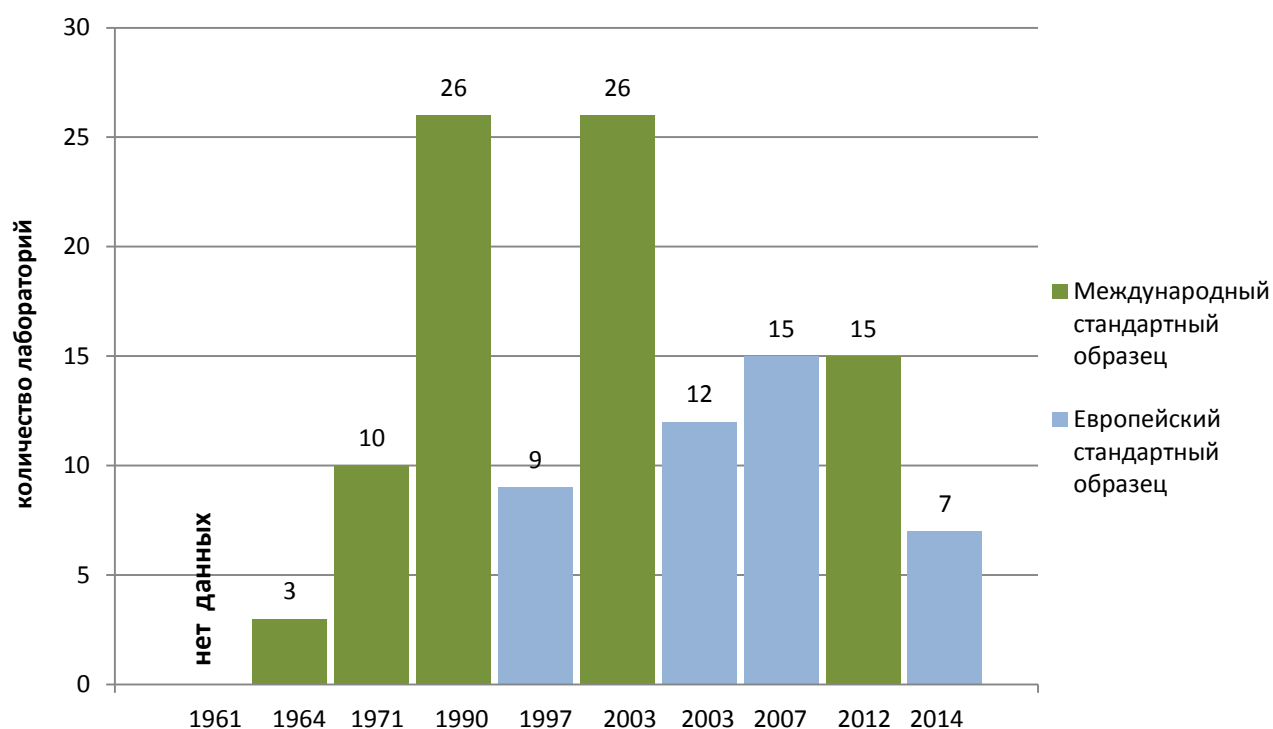


Рисунок 5 – Участие лабораторий в межлабораторных исследованиях [38, 39, 47, 53, 134]

Второй этап – с 1990 г. по настоящее время – характеризуется появлением рекомбинантной технологии, достижениями в области очистки белков, расшифровкой нуклеотидной последовательности гена, кодирующего молекулу эритропоэтина. Все эти достижения позволили получить рекомбинантный белок эритропоэтина с высокой удельной активностью и в достаточном количестве для проведения расширенных межлабораторных исследований. Динамика увеличения удельной активности представлена на рисунке 6.

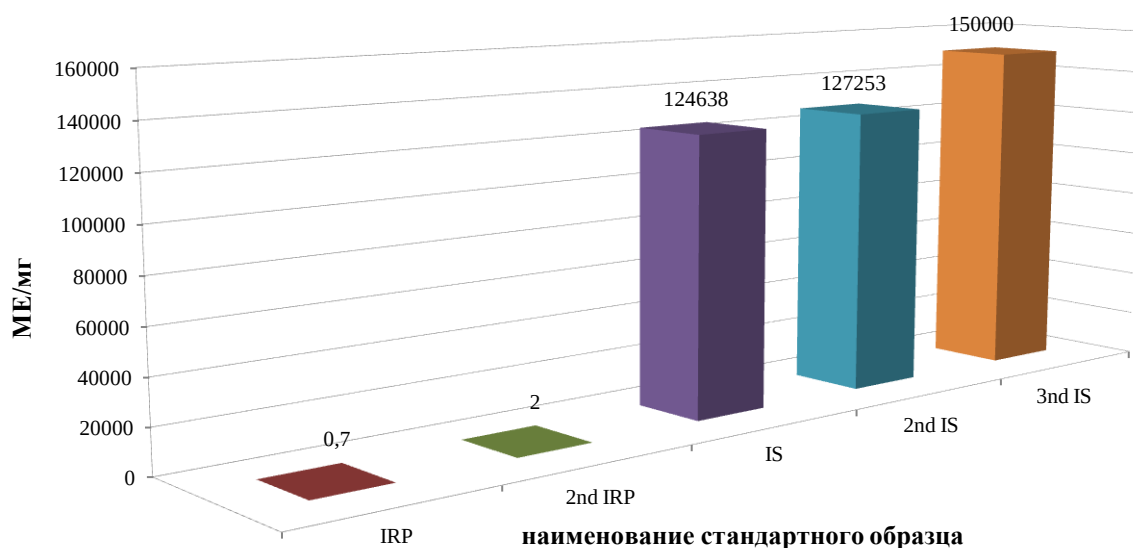


Рисунок 6 – Динамика увеличения удельной активности стандартных образцов эритропоэтина [38, 53, 134]

Появление препаратов на основе рчЭПО потребовало создания соответствующих стандартов. В 1990 г. в Национальном институте биологических стандартов и контроля (NIBSC, Великобритания) аттестован международный стандартный образец (IS) рекомбинантного эритропоэтина человека с активностью 86 ME/амп на основе эритропоэтина альфа [134]. В 2003 г. аттестован 2-й международный стандарт рекомбинантного эритропоэтина человека с активностью 120 ME/амп. (2nd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant, 2nd IS), в 2012 г. – 3-й международный стандарт рекомбинантного эритропоэтина для количественного определения биологической активности (3rd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant for bioassay, 3rd IS). Активность этого стандарта составила 1650 ME/амп. Второй этап характеризуется увеличением удельной и, соответственно, специфической активности стандартных образцов эритропоэтина.

При аттестации 3rd IS Фармакопейная конвенция США получила разрешение Национального института биологических стандартов и контроля использовать указанный стандарт в качестве фармакопейного.

В результате совершенствования технологии производства и технической оснащенности аналитических исследований стало возможным повысить требования к качеству препаратов и оценивать их на содержание димеров и

высокомолекулярных родственных соединений, сиаловых кислот и др. В связи с этим возникла необходимость разработки стандартного образца для оценки данных показателей. Физико-химическими методами было установлено, что характеристики эритропоэтинов альфа и бета отличаются [133-135], поэтому в качестве стандарта для физико-химических методов было предложено использовать их смесь. Первый такой стандарт Biological reference preparation (BRP) – European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin был разработан в 1997 г., состоял из равных количеств (50:50) эпоэтина альфа и бета разных производителей и предназначался для определения специфической активности, подлинности, содержания белка, димеров и высокомолекулярных родственных соединений, сиаловых кислот [47]. Позднее Европейский директорат принял решение о разделении функций стандартных образцов. В 2014 г. аттестованы два стандарта: стандартный образец эритропоэтина для оценки биологической активности BRP 4 (Erythropoietin BRP#4, E1515000) и новый сертифицированный стандартный образец эритропоэтина для оценки физико-химических показателей (Erythropoietin for physicochemical tests CRS batch#1, Y0001725) [39].

В России было зарегистрировано два стандартных образца эритропоэтина:

1. Государственный стандартный образец эритропоэтина (ГСОЭ) (эпоэтин бета), был зарегистрирован с 1995 по 2006 гг. и предназначался для количественного определения эритропоэтина методом *in vivo* по включению радиоактивного изотопа ^{59}Fe в циркулирующие эритроциты мышей с полицитемией, вызванной пониженным атмосферным давлением. ГСОЭ выпускался в сухом (лиофилизированном) виде с активностью от 100-5000 МЕ, в его состав входило 2,5 мг альбумина человека и 5 мг маннита. Срок хранения – 2 года при температуре от 2 до 8 °С. К недостаткам ГСОЭ следует отнести неоднородность дозирования и как следствие высокую вариабельность основной заявленной характеристики – активности, коэффициент вариации достигал $\pm 15 \%$ (ФС 42-3657-98).

2. Государственный стандартный образец Рэпоэтина-СП (эпоэтин альфа) ФС 42-0111-06, представлял собой водный раствор фармацевтической

субстанции, расфасованной в пробирки по 0,2 и 1 мл с активностью от 241500 до 275000 МЕ/мл. Срок действия данного стандартного образца истек в 2009 г., к тому же он имел следующие недостатки: область его применения ограничена использованием исключительно для анализа субстанции Рэпоэтина-СП и лекарственных форм на ее основе [3], значения доверительных интервалов аттестованного значения не были рассчитаны, условия хранения – при температуре минус 55 °С.

1.5 Заключение

В заключение следует отметить, что, несмотря на более чем вековую историю изучения эритропоэтина, ежегодно публикуется более 800 статей, посвященных изучению новых биологических свойств эритропоэтина, разработке препаратов новых поколений, что указывает на интерес к данной теме и ее актуальность. Фармакодинамика, стратегия и тактика применения препаратов рчЭПО в конечном итоге обуславливается их фармакокинетикой, что особенно актуально для препаратов новых поколений. Кроме того, специалисты признают актуальность и перспективность расширения определения плеiotропности биологического действия (ангиогенез и апоптоз) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции рекомбинантные эритропоэтины. Одновременно повышаются требования к качеству препаратов и к оценке их по таким показателям, как содержание димеров и высокомолекулярных родственных соединений, сиаловых кислот и др.

В настоящее время в РФ нет отечественного стандартного образца эритропоэтина как для определения активности, так и для физико-химических показателей. Поэтому для оценки качества указанных препаратов производители применяют Международный стандартный образец биологической активности, стандартный образец эритропоэтина Европейской Фармакопеи или откалиброванные по ним стандартные образцы предприятия, процедура аттестации которых не регламентирована. Это ставит отечественных производителей в зависимость от курса валюты и увеличивает себестоимость

препаратов эритропоэтина. Отсутствие в Государственной фармакопее РФ ОФС, которая регламентирует определение специфической активности эритропоэтина, привело к ряду различий в методике у отечественных производителей. Разработка ОФС и ее гармонизация с ЕФ позволит контролировать один из основных показателей качества препаратов в соответствии с международными требованиями, что обеспечит эффективность и повысит безопасность при их клиническом применении.

Таким образом, анализ публикаций, посвященных структуре, функциям, механизму действия эритропоэтина и способам определения его специфической активности, позволяет сделать выводы:

1. Рекомбинантный эритропоэтин человека, входящий в состав лекарственных препаратов в качестве действующего вещества, представляет собой смесь изоформ, которые определяют фармакокинетику, фармакодинамику, терапевтическую эффективность и безопасность лекарственного средства. Углеводный компонент в структуре молекулы эритропоэтина выполняет решающую роль для проявления специфической активности в организме.

2. Основным универсальным методом определения специфической активности препаратов рчЭПО служит метод *in vivo* на нормоцитемических мышцах. Данный метод максимально моделирует механизм действия препаратов рчЭПО при терапевтическом применении. Остальные методы могут быть вспомогательными для более полной характеристики по другим показателям.

3. Многообразие методик контроля специфической активности эритропоэтина с различными нормативными требованиями обуславливают актуальность и необходимость разработки нормативных документов для регламентированного обращения и гармонизации препаратов с международными требованиями.

4. Значимость препаратов рчЭПО в клинической практике, необходимость точной оценки их специфической активности и отсутствие стандартного образца в РФ обуславливает необходимость его разработки и аттестации для гармонизации с международными требованиями.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Разработка технологии изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина

2.1 Выбор кандидата в стандартный образец специфической активности эритропоэтина

Стандартный образец служит неотъемлемой частью методики определения специфической активности эритропоэтина. При разработке национальных стандартных образцов ВОЗ рекомендует (WHO Technical Report Series, No. 800, 1990, Annex 4; No. 932, 2006 Annex 2) руководствоваться следующими требованиями – кандидат в стандартный образец по свойствам (показателям качества) должен:

- максимально соответствовать исследуемым образцам;
- быть стабильным;
- обладать необходимой активностью для целей, которым он предназначен.

Обобщенный анализ возможности осуществления рекомендаций ВОЗ показал, что для выполнения требований в полном объеме необходимо соблюдать определенный алгоритм разработки СО, который состоит из трех последовательных этапов стандартизации препаратов рчЭПО (Таблица 5).

Таблица 5 – Алгоритм выполнения рекомендаций ВОЗ при разработке СО

№ п/п	Рекомендации ВОЗ	Этапы разработки СО
1	Стандарт должен максимально соответствовать исследуемым образцам	Выбор материала Стабилизация и получение Аттестация, установление сроков годности и условий хранения
2	Стандарт должен быть стабильным	
3	Стандарт должен обладать достаточной активностью для целей, которым он предназначен	

На этапе выбора материала для кандидата в стандартный образец мы столкнулись с тем, что первая из трех рекомендаций ВОЗ имеет общий характер, так как не учитывает многообразия форм эритропоэтина (альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон, каппа, омега, тета и дзета), их структурно-функциональные и фармакокинетические особенности. Отсутствие ОФС на эритропоэтин, которая регламентирует требования к данной группе препаратов, еще более усложнило задачу выбора материала для кандидата в СО.

Кандидат в стандартный образец специфической активности эритропоэтина выбирали из зарегистрированных в РФ субстанций отечественного производства. По данным государственного реестра лекарственных средств МЗ РФ на момент выбора было зарегистрировано 3 фармацевтических субстанции рчЭПО: две - эпозтин бета и одна - эпозтин альфа (Таблица 6).

Таблица 6 – Характеристика кандидатов в стандартный образец специфической активности эритропоэтина

Наименование		Дата включения в реестр	Срок годности, годы
Торговое/производитель	Международное непатентованное		
Рэпоэтин-СП/ ГосНИИ ОЧБ ФМБА ФГУП – Россия	Эпозтин альфа	1999	3
Эритропоэтин человека рекомбинантный/ Микроген НПО ФГУП – Россия	Эпозтин бета	1998	2
Эритропоэтин человека рекомбинантный/ ООО "ФАРМАПАРК" – Россия		1998	2

Эритропоэтин человека рекомбинантный, субстанция-раствор [концентрированный], производитель – ООО "ФАРМАПАРК" – Россия, и Эритропоэтин человека рекомбинантный, субстанция-раствор [концентрированный], производитель – Микроген НПО ФГУП - Россия выпускались по одному нормативному документу ФС 42-3658-98, поэтому в качестве кандидатов в СО специфической активности эритропоэтина рассматривали две субстанции:

1. Рэпоэтин-СП субстанция-раствор [концентрированный], МНН - Эпоэтин альфа, производитель – Гос НИИ ОЧБ ФМБА ФГУП – Россия;

2. Эритропоэтин человека рекомбинантный субстанция-раствор [концентрированный], МНН – Эпоэтин бета, производитель – Микроген НПО ФГУП - Россия.

Основываясь на рекомендациях ВОЗ к стандартным образцам в качестве кандидата в стандартный образец, была выбрана субстанция Рэпоэтин-СП, МНН - Эпоэтин альфа, производитель - ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России. В пользу выбора послужило то, что срок ее годности в 1,5 раза больше по сравнению с другими субстанциями и, кроме того, по составу полисахаридных цепей она подобна действующему международному стандартному образцу эритропоэтина (Таблица 7).

Таблица 7 – Сопоставление кандидатов в СО с действующими СО

Кандидаты в СО		Стандартный образец (МНН)	
Торговое наименование	МНН	Международный (Эпоэтин альфа)	Европейский (Эпоэтин альфа и бета (50:50))
Рэпоэтин-СП субстанция-раствор [концентрированный]	Эпоэтин альфа	+	±
Эритропоэтин человека рекомбинантный субстанция-раствор [концентрированный]	Эпоэтин бета	–	±

Примечание: «–» не соответствует по гликозилированию;

«±» частично соответствует;

«+» полное соответствие

2.2 Оценка качества кандидата в стандартный образец специфической активности эритропоэтина

Субстанция «РЭПОЭТИН-СП» представляет собой кислый гликопротеин, который состоит из 165 аминокислотных остатков, с двумя внутренними дисульфидными связями между цистеинами в положении 7–161 и 29–33. Углеводная часть представлена тремя участками N-гликозилирования в положениях 24, 38 и 83 по аминокислотным остаткам аспарагина и одним участком O-гликозилирования в положении 126 по серину. Молекулярная масса

около 34 кДа. Препарат получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК на линии клеток CHO (штамм-производитель CHO-ЭПО SP/M), с последующей хроматографической очисткой.

Качество субстанции Рэпоэтин-СП оценили по паспортным данным, результаты представлены в таблице 8 и результатам экспертизы качества по показателям: содержание белка, подлинность, специфическая активность и удельная активность.

Таблица 8 – Результаты определения биологических и физико-химических показателей качества кандидата в СО специфической активности эритропоэтина

Показатель	Требования ФСПР № 003458/01-050609, изм. № 1	Результаты оценки серии № 1320914
1	2	3
Описание	Замороженная жидкость, которая при размораживании становится прозрачной и бесцветной	Соответствует
Подлинность: 1. Биологический. По разделу «Количественное определение»	Должен обладать специфической биологической активностью	Соответствует
2. Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS с последующим иммуноблоттингом	Должна быть ярко выраженная полоса эритропоэтина в области ММ 34 кДа. Допускается наличие минорных полос димера и продуктов протеолиза	Одна полоса эритропоэтина в области ММ 34 кДа
3. Изоэлектро-фокусирование	5-8 полос в интервале рН 3,5-5,0	7 основных полос в интервале рН 3,7-4,8
4. Пептидное картирование ВЭЖХ с	Профиль хроматограммы раствора испытуемого препарата должен принципиально соответствовать профилю хроматограммы СО	Соответствует
Прозрачность	Препарат должен быть прозрачным	Раствор прозрачный
Цветность	Препарат должен быть бесцветным	Раствор бесцветный
рН	От 6,5 до 7,5	7,0

Продолжение таблицы 8

1	2	3
Посторонние примеси: - белковые примеси 1. Электрофорез в ПААГ	Сумма площадей всех примесных белковых пиков, включая олигомерные формы, не должна быть более 3 % от общей площади всех пиков. Сумма площадей пиков олигомерных форм не должна превышать 1 %	Не выявлено Отсутствует
2. ВЭЖХ	Сумма площадей всех примесных белковых пиков должна составлять величину не более 3 % от общей площади всех пиков	0 %
Белок клеток-продуцентов Иммуноблотинг с антителами к белкам клеток-продуцентов	Допускается наличие следовых полос белков клеток-продуцента	Отсутствуют
ДНК клеток-продуцента Дот-гибридизация	Содержание примесей клеточной ДНК не должно превышать 10 пг на 10000 МЕ	<10 пг на 10000 МЕ
Пирогенность	Должен быть апиrogenным	Апиrogenный
Токсичность	Должен быть нетоксичным	Нетоксичный
Стерильность	Должен быть стерильным	Стерильный
Содержание белка	Не менее 2 мг/мл	2,3 мг/мл
Количественное определение. Биологическая активность.	Не менее 200000 МЕ/мл	309150 МЕ/мл
Удельная активность	Должна быть не ниже 100000 МЕ/мг белка	134413 МЕ/мг

Из представленных данных следует, что субстанция Рэпоэтин-СП серия № 1320914 соответствует требованиям ФСП Р № 003458/01-050609, изм. № 1.

Экспертиза качества субстанции Рэпоэтин-СП

Оценку по показателю «Содержание белка» провели спектрофотометрическим методом по ФСПР № 003458/01-050609, изм. № 1, результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты определения концентрации белка в субстанции Рэпоэтин-СП

№ испытания	Концентрация белка, мг/мл	Среднее значение
1	2,27	2,3 мг/мл
2	2,27	
3	2,26	

Содержание белка в субстанции Рэпоэтин-СП составило 2,3 мг/мл.

Подтверждение «Подлинности» провели двумя методами: капиллярного зонного электрофореза и электрофореза в полиакриламидном геле.

Капиллярный зонный электрофорез. В результате исследований определено процентное содержание изоформ (Рисунок 7), результаты представлены в таблице 10.

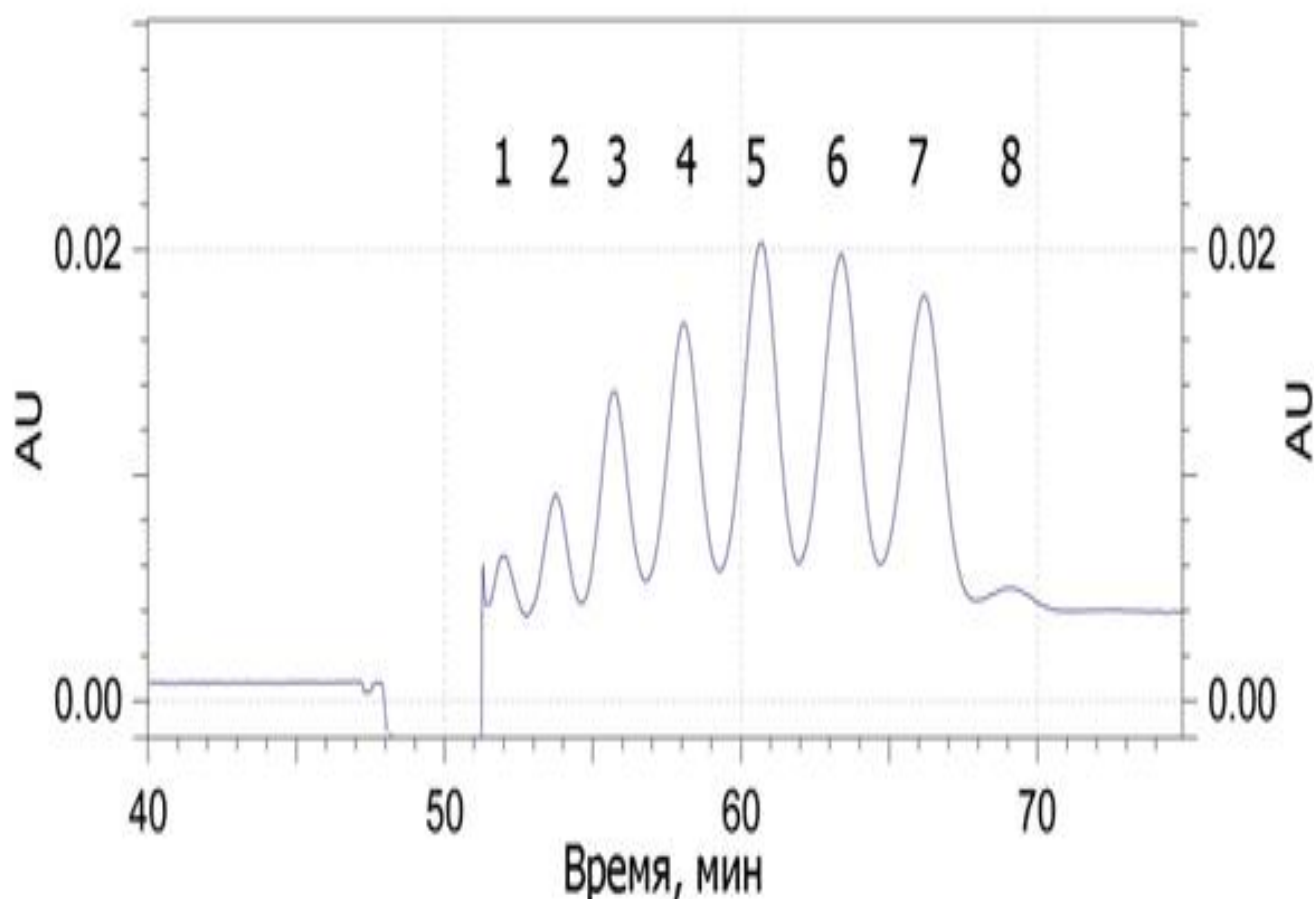


Рисунок 7 – Типичная электрофореграмма кандидата в СО специфической активности эритропоэтина. Капиллярный зонный электрофорез. Номерами обозначены восемь изоформ эритропоэтина

Таблица 10 – Результаты определения содержания изоформ в субстанции Рэпоэтин-СП методом капиллярного зонного электрофореза

Наименование	Содержание изоформ, %		
	Субстанция Рэпоэтин-СП	CRS EPh	Требования фармакопей ^[60, 61]
Изоформа 1	1,44	0,38	0-15
Изоформа 2	4,51	1,40	0-15
Изоформа 3	10,56	5,64	1-20
Изоформа 4	16,23	17,54	10-35
Изоформа 5	22,16	27,05	15-40
Изоформа 6	22,61	29,23	10-35
Изоформа 7	20,91	17,53	5-25
Изоформа 8	1,58	1,23	0-15

Как видно из таблицы 10 процентное содержание изоформ эритропоэтина в субстанции Рэпоэтин-СП соответствует требованиям американской и Европейской фармакопей.

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия – выявлена одна диффузная полоса, сопоставимая по интенсивности и подвижности полосе стандартного образца для физико-химических испытаний (CRS) (Рисунок 8).

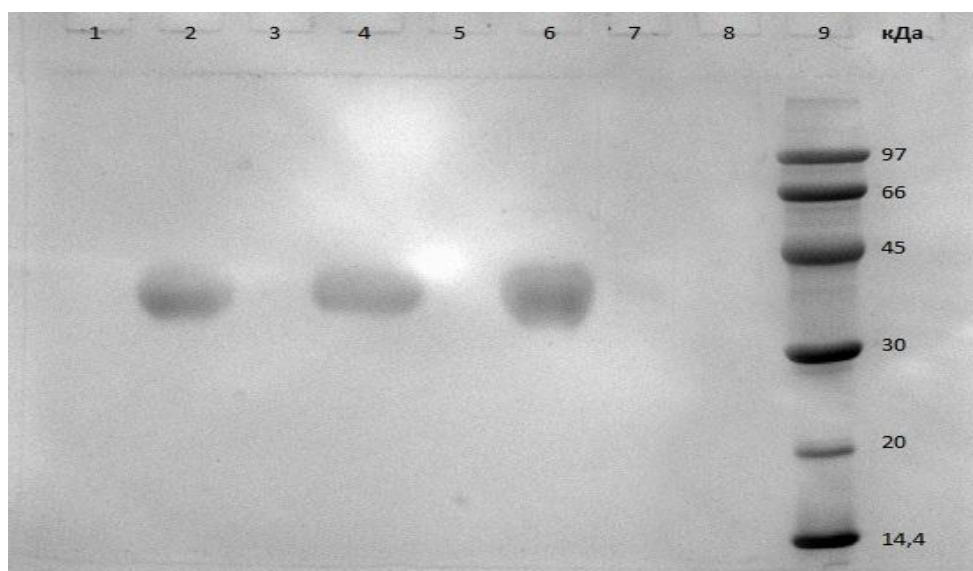


Рисунок 8 – Типичная электрофореграмма кандидата в СО специфической активности эритропоэтина (Рэпоэтин-СП). Электрофорез в полиакриламидном геле с SDS

Примечание: 1, 3, 5, 7, 8 – буферный раствор для образцов; 2 – CRS, нагрузка на лунку – 10 мкг; 4 – эритропоэтин, препарат, нагрузка на лунку – 10 мкг; 6 – кандидата в СО (Рэпоэтин-СП), нагрузка на лунку – 10 мкг; 9 – маркеры молекулярных масс, Amersham, Low molecular weight.

Оценку качества субстанции Рэпоэтин-СП по показателю специфическая активность выполнили биологическим методом *in vivo* на нормоцитемических мышцах линии Balb/c, в соответствии с ЕФ. Провели 6 испытаний относительно международного стандартного образца. Каждое испытание предполагало 3 дозы по 8 повторов ($n=48$). Полученные данные проверили на выбросы и рассчитали значение активности методом параллельных линий. Необходимые критерии параллельности и линейности соблюдены при уровне $P=0,95$, таким образом, средние значения активности можно считать валидными. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты оценки специфической активности кандидата в СО относительно WHO 3nd IS

№ испытания	Активность, МЕ	Доверительный интервал ($P=0,95$), процент	
		минимум	максимум
1	319225	85	118
2	289535	82	123
3	318683	80	124
4	268992	82	121
5	301618	77	129
6	288407	80	124
Среднее взвешенное значение активности	298168	92	108

Полученные результаты в соответствии с требованиями ЕФ проверили на однородность с помощью критерия Хи-квадрат: $\chi^2_{\text{эксп}} = 2,43 < \chi^2_{\text{крит}} (95\%; df = 5) = 9,488$, что свидетельствует об однородности полученных результатов. Результаты объединили и рассчитали среднее взвешенное значение, активность составила 298168 МЕ/мл, что подтвердило соответствие субстанции Рэпоэтин-СП требованиям НД.

Удельную активность рассчитывали по формуле:

$$A_{\text{уд}} = A/C \quad (1)$$

где: А – биологическая активность субстанции, МЕ/мл;

С – содержание белка, мг/мл.

Удельная активность субстанции Рэпоэтин-СП составила 129638 МЕ/мг.

Таким образом, субстанция Рэпоэтин-СП производитель - ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России по паспортным данным и результатам контроля приемлема в качестве материала для приготовления лиофилизированного СО.

2.3 Совершенствование стадии лиофилизации стандартного образца специфической активности эритропоэтина

Первым технологическим шагом в приготовлении лиофилизированной формы СО специфической активности эритропоэтина было обоснование формообразующего состава, подлежащего высушиванию. Защитная среда должна включать сбалансированный набор компонентов, который гарантированно обеспечит при лиофилизации препарата сохранение его активности и приемлемую структуру (внешний вид), то есть защитит от негативного влияния процессов замораживания и сублимационного высушивания, уменьшит отбраковку продукции по физическим свойствам.

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, определена оптимальная концентрация трегалозы, обеспечивающая приемлемую структуру (внешний вид) лиофилизированного препарата. При выборе компонентов были учтены литературные данные и эвтектические характеристики, а также параметры температурного воздействия при замораживании и удалении воды из продукта. За основу взят состав стабилизирующего буфера (Таблица 12), используемого при лиофилизации международного стандартного образца с некоторыми изменениями. По экономическим соображениям сывороточный альбумин человека, заменили бычьим сывороточным альбумином, стоимость которого почти в 10 раз ниже.

Таблица 12 – Состав стабилизирующего буфера стандартных образцов эритропоэтина

Наименование	3 rd IS	BRP # 3
Сывороточный альбумин человека, %	0,2	-
Бычий сывороточный альбумин, %	-	-
Трегалоза, %	1,0	3,0
Аргинин, %	-	0,3
Твин-20, %	-	0,01
Натрия хлорид, %	0,12	0,45
Дигидрофосфат натрия (двуосновной), %	-	0,312

Лиофилизация материала с учетом изменений не привела к формированию объемно-структурированных лиофилизатов в ампулах. В данном составе роль структурообразующего компонента выполняет трегалоза, поэтому основная задача заключалась в определении ее оптимальной концентрации, которая обеспечивает получение лиофилизата с физическими свойствами, соответствующими описанию: кристаллическая или пористая масса в виде сформированной «таблетки». С этой целью были лиофилизированы растворы с концентрациями трегалозы 1, 2, 3, 4 и 8 %. По внешнему виду наиболее выраженный положительный результат отмечали у стабилизирующего буфера с концентрацией трегалозы не менее 4 %. Альтернативные составы значительно уступали по этому параметру, результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Влияние концентрации трегалозы на формирование таблетки

Наименование	Процент от объёма				
Бычий сывороточный альбумин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Трегалоза	1,0	2	3	4	8
Натрия хлорид	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Внешний вид	-	+	++	+++	+++

Примечания:

«-» - содержимое в виде порошка

«+» - формирование полый «таблетки»

«++» - неоднородная рыхлая структура в виде «таблетки»

«+++» - однородная пористая масса в виде сформированной «таблетки»

С учетом полученного результата следующий этап исследований был направлен на определение объема наполнения ампул, который оказывает влияние на физические свойства лиофилизированного препарата. При розливе в ампулы

вместимостью 1 мл материала в объеме 50 мкл высота вертикального столба составляла 3 мм и соответствовала наиболее оптимальной форме и структуре лиофилизата. При увеличении объема отмечалось неравномерное высушивание и нарушение формы «таблетки».

В качестве ближайшего прототипа по условиям лиофилизации был выбран способ (Carcagno С.М. с соавт., WO 0027419) получения лиофилизированной фармацевтической композиции рекомбинантного эритропоэтина человека стабильного при комнатной температуре (Таблица 14).

Таблица 14 – Основные операции и параметры прототипного способа лиофильного высушивания эритропоэтина

Операция	Параметры лиофилизации			
	Температура, °С	Давление, мТорр	Продолжительность, час	
			Вариант А	Вариант Б
Предварительное замораживание	-30	атмосферное	4	4
Замораживание	-40	атмосферное	10	6
Первичное высушивание	-40	30	12	2
Повышение температуры до 30 °С и понижение давления	2-3°С /час 1-2°С /час	5 - 30	23-35	35-70
Вторичное высушивание	30	1-5	12	12
Средняя суммарная продолжительность лиофильного высушивания			67	76

К недостаткам данного способа следует отнести: использование дополнительного низкотемпературного оборудования на стадии предварительного замораживания, что может привести к нарушению структуры препарата и микробной контаминации при его перегрузке из одного типа оборудования в другое и длительность процесса лиофилизации от 67 до 76 ч., это связано с большим объемом наполнения ампул и иным составом стабилизирующего буфера (маннитол – 2,5 %, альбумин человека – 2,5 %, NaCl – 0,32 %, NaH_2PO_4 – 0,14 %, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,4 %).

Важным фактором при отработке режима замораживания является эвтектическая характеристика раствора, или температура его полного перехода в твердую фазу, т.к. при наличии жидкой фазы, даже во внешне замороженном материале, в начале процесса сублимации могут произойти необратимые изменения, такие как нарушение целостности слоя препарата и его физической структуры. Учитывая, что точка эвтектики 4 % раствора трегалозы находится в диапазоне от минус 30 до минус 40 °С, замораживание проводили в сублимационном аппарате без привлечения дополнительного низкотемпературного оборудования, исключив неизбежно происходящее отепление препарата и опасность микробной контаминации при его перегрузке из одного типа оборудования в другое.

На этапе отработки режима замораживания не возникло каких-либо затруднений, так как процесс охлаждения со скоростью 1 °С/мин до температуры минус 45 °С, что гарантированно ниже эвтектической точки, в течение 2 ч. обеспечивал полное замораживание и кристаллизацию влаги в растворе без негативного влияния на активность материала и его физические свойства.

На этапе первичного высушивания остаточное давление в камере снизили до 100 мТорр. Длительность этапа сублимации пропорциональна объему наполнения ампулы и зависит от толщины (высоты) замороженного слоя. Время сушки контролировали по давлению пара на участках сублимации с поверхности материала. Оптимальное время первичного высушивания составило 6 ч. На этапе вторичного высушивания остаточное давление снизили до 30 мТорр, температуру повысили до +20 °С со скоростью 1°С/мин. Продолжительность завершающего этапа досушивания определили в ходе экспериментов по определению остаточной влажности. Выдерживание продукта при температуре +20 °С в течение 2 ч. обеспечивало остаточную влажность готового препарата в диапазоне $1,5 \pm 0,5$ %.

Основные операции и параметры разработанного способа лиофильного высушивания СО специфической активности эритропоэтина обобщены в таблице 15.

Таблица 15 – Основные операции и параметры разработанного способа лиофильного высушивания 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

Для определения специфической активности эритропоэтина по стандартной схеме – три группы (10, 20 и 40 МЕ/животное) в каждой по 8 животных, с учетом технологического запаса требуется не менее 1200 МЕ стандартного образца в ампуле. Для обеспечения достаточной активности СО внесли по 2600 МЕ эритропоэтина в ампулу. Учитывая эксперименты по определению объема заполнения ампул, активность материала должна составлять от 24000 до 52000 МЕ/мл. Для приготовления материала с такой концентрацией использовали 4 мл субстанции РЭПОЭТИН-СП (активность 298168 МЕ/мл), которые развели 19 мл стабилизирующего буфера. Полученный раствор тщательно перемешали и разлили по ампулам. После чего провели испытания на однородность дозирования определением массы нетто в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0008.15, из общего количества отобрали 30 ампул. Средний вес содержимого составил 51 мг, коэффициент вариации 4,44 %. Все операции по приготовлению материала СО и розливу в ампулы проводили с соблюдением требований стерильности под ламинарным потоком. Ампулы равномерно распределили в специальном лотке максимально близко к задней стенке камеры лиофильной сушки. Для контроля процесса лиофилизации в две ампулы поместили датчики температуры. Одну ампулу с датчиком поместили в центре аппарата, вторую у его переднего края. Лиофилизация проходила в автономном режиме по заранее составленной программе. По окончании лиофилизации

провели запаивание ампул, для чего ампулы подключили к аппарату для запаивания, создали разряжение 750 мТорр и запаяли газовой горелкой.

Провели визуальный контроль качества лиофилизации. По физическим свойствам содержимое ампул при осмотре имело однородную пористую структуру в виде сформированной «таблетки» белого цвета.

Контроль качества запаивания (герметичность) оценили в соответствии с МУК 4.1/4.2.588-96 по возбуждению газовой среды на приборе «Искра-1», отмечали свечение ампул голубым или розово-голубым светом, что свидетельствовало об абсолютном остаточном давлении от 75 до 7500 мТорр. Ампулы без свечения и с фиолетовым свечением отбраковывали.

Испытания на однородность дозирования по содержанию рекомбинантного Эпоэтина альфа выполнили количественным определением с помощью ИФА в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0008.15. Из общего количества ампул отобрали случайным образом 10 образцов. Каждое определение включало три уровня доз: 200, 100 и 50 мМЕ/мл, по 2 повтора стандартного и испытуемого образцов, что составило набор для проведения серии параллельных испытаний. Содержание рекомбинантного Эпоэтина альфа рассчитывали методом параллельных линий. Результаты испытания на однородность дозирования представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты испытания на однородность дозирования по содержанию рекомбинантного Эпоэтина альфа

№ образца	Содержание рчЭПО, МЕ/амп	Среднее арифметическое значение, МЕ/амп	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
1	2630	2424	154	6,34
2	2674			
3	2220			
4	2576			
5	2311			
6	2282			
7	2330			
8	2404			
9	2409			
10	2398			

Среднее арифметическое значение составило 2424 МЕ/амп; при пересчете в весовые единицы, исходя из удельной активности (1 МЕ равна 7,7 нг), содержание рекомбинантного эпоэтина альфа составило 18,7 мкг/амп, коэффициент вариации 6,34 %.

Испытания на однородность массы содержимого одной ампулы провели в соответствии с требованиями ОФС 1.4.2.0009.15, используя электронные аналитические весы СР-225D класса точности $\pm 0,05$ мг в диапазоне от 0,001 до 5 г (Sartorius GMBH). Средняя масса лиофилизированной таблетки составила 2,19 мг (коэффициент вариации 2,7 %; $n=75$).

Определение потери в массе при высушивании провели совместно с испытаниями на однородность массы содержимого одной ампулы в соответствии с требованиями ОФС 1.2.1.0010.15 ($n=75$) потеря массы составила 1,93 %.

Подтверждение подлинности проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующим иммуноблотингом в соответствии с требованиями ОФС 1.7.2.0022.15 и ОФС 1.2.1.0023.15 с использованием поликлональных кроличьих антител против эритропоэтина человека (Sigma Aldrich, США). По результатам электрофореза в полиакриламидном геле с последующим иммуноблотингом выявлен основной компонент с молекулярной массой, соответствующий основному компоненту Рэпоэтина-СП и стандартного образца CRS (Рисунок 9).

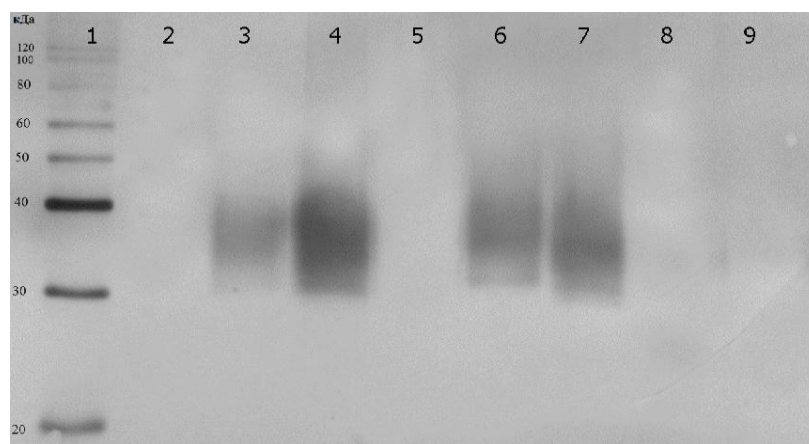


Рисунок 9 – Результаты испытаний кандидата в СО специфической активности эритропоэтина методом Вестерн-блот

Примечание: 1 – маркеры молекулярных масс, MagicMark XP Western protein standard, Invitrogen; 2, 5, 8, 9 – буферный раствор для образцов; 3 – кандидат в СО, нагрузка на лунку –

0,2 мкг; 4 – материал для кандидата в СО (Рэпоэтин-СП), нагрузка на лунку – 1 мкг; 6 – CRS, нагрузка на лунку – 1 мкг; 7 – эритропоэтин, препарат, нагрузка на лунку – 1 мкг.

Таким образом, уменьшение концентрации компонентов в стабилизирующем буфере и объема наполнения ампул позволило сократить число операций при сохранении структуры лиофилизата и снизить продолжительность процесса лиофилизации до 12 ч.

2.4 Разработка технологической и биологической схем изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина

В соответствии с руководящими документами на оформление технологических регламентов технология изготовления лиофилизированной формы СО представлена в виде единого технологического процесса, состоящего из одной подготовительной и пяти технологических стадий (Рисунки 10-12).

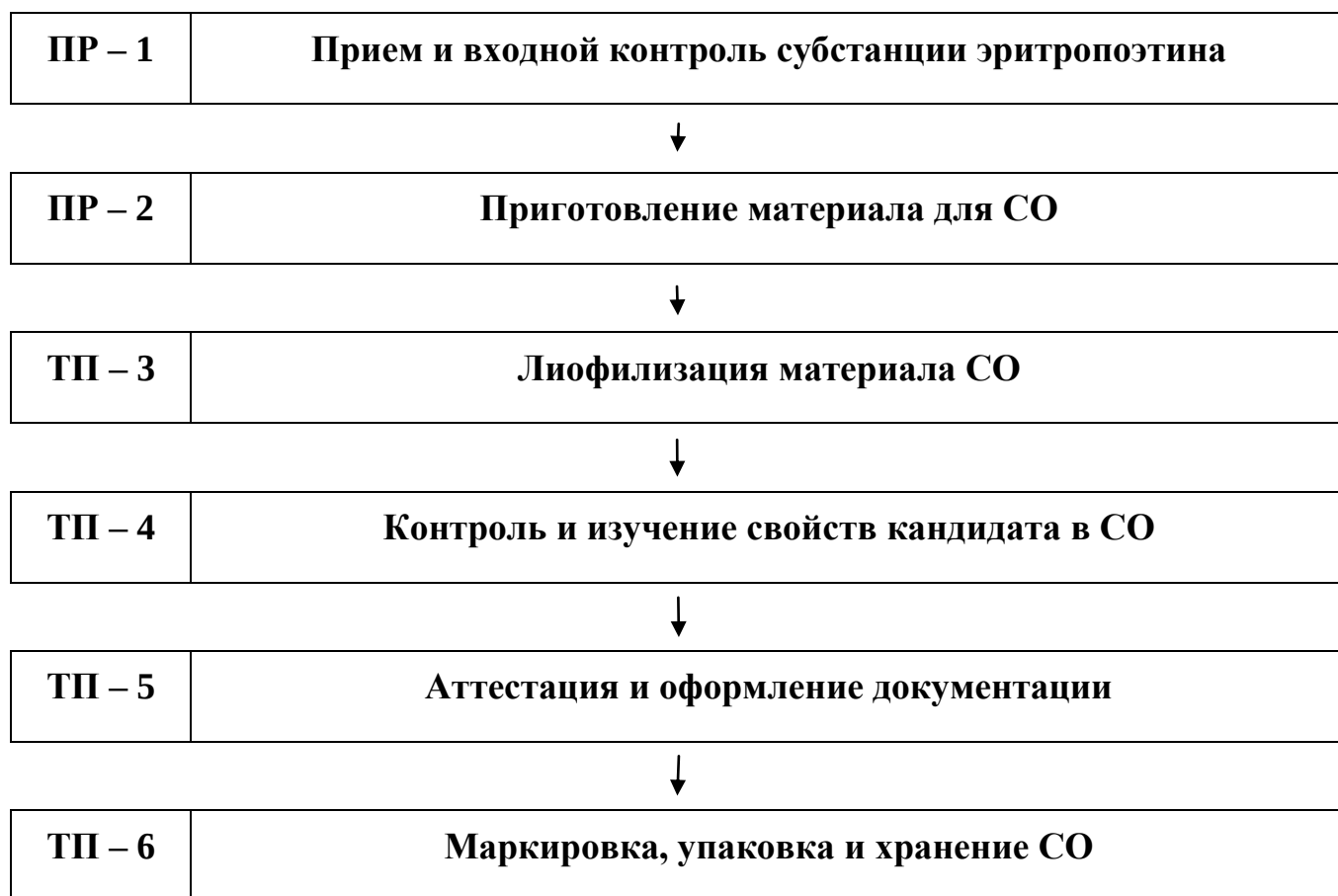


Рисунок 10 – Технологические стадии изготовления СО специфической активности эритропоэтина

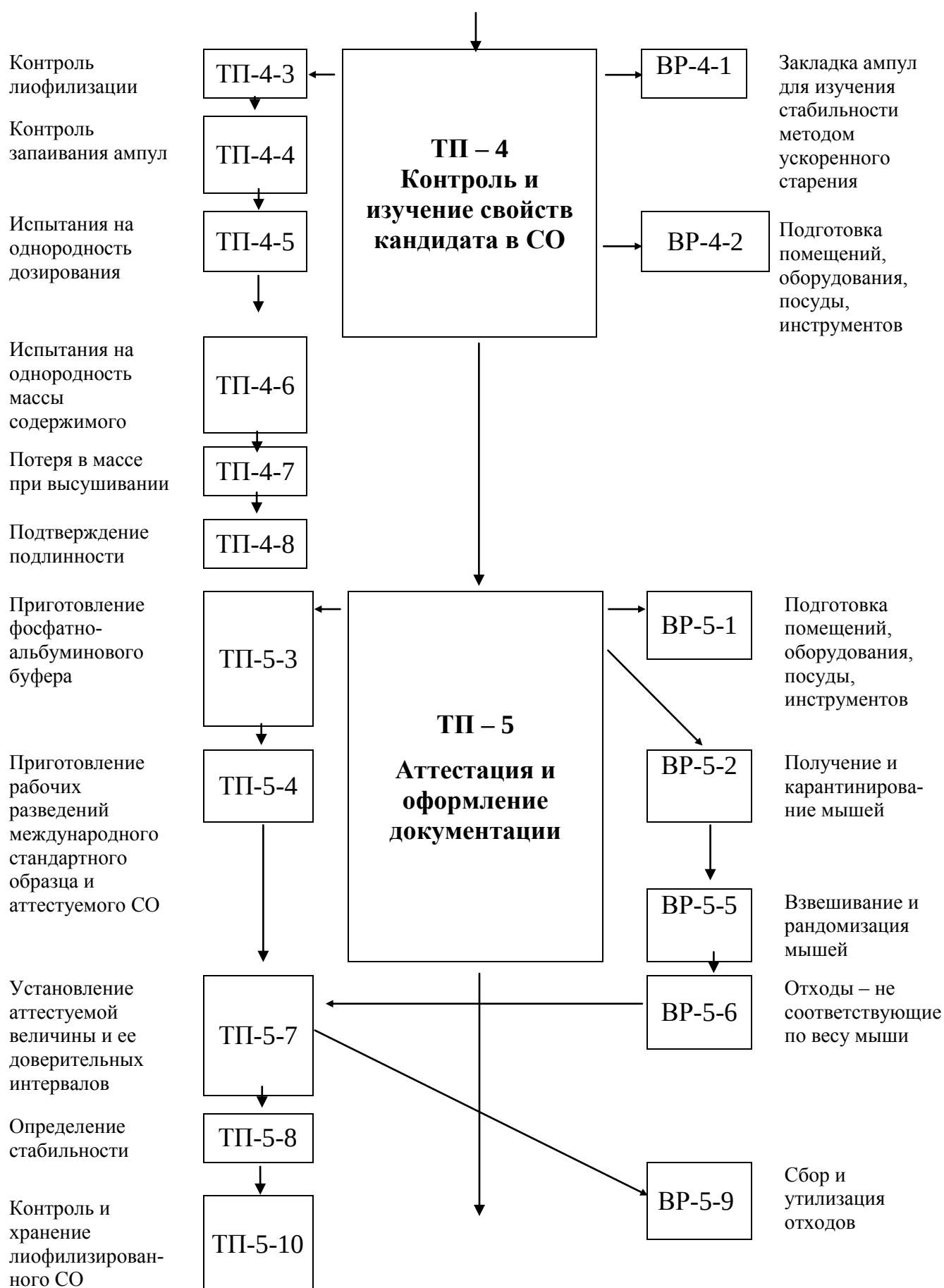
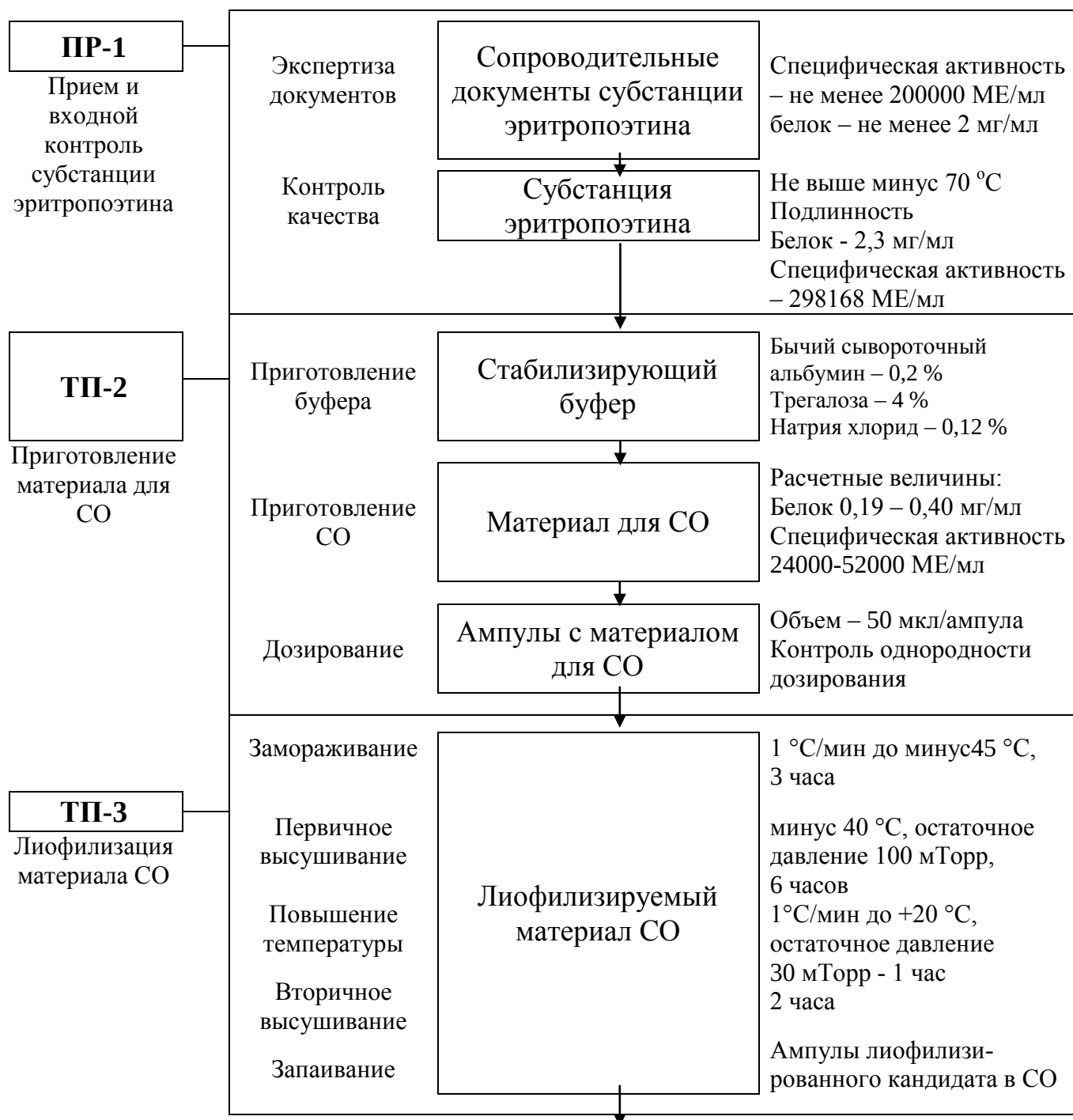




Рисунок 11 – Технологическая схема изготовления и контроля СО специфической активности эритропоэтина по стадиям



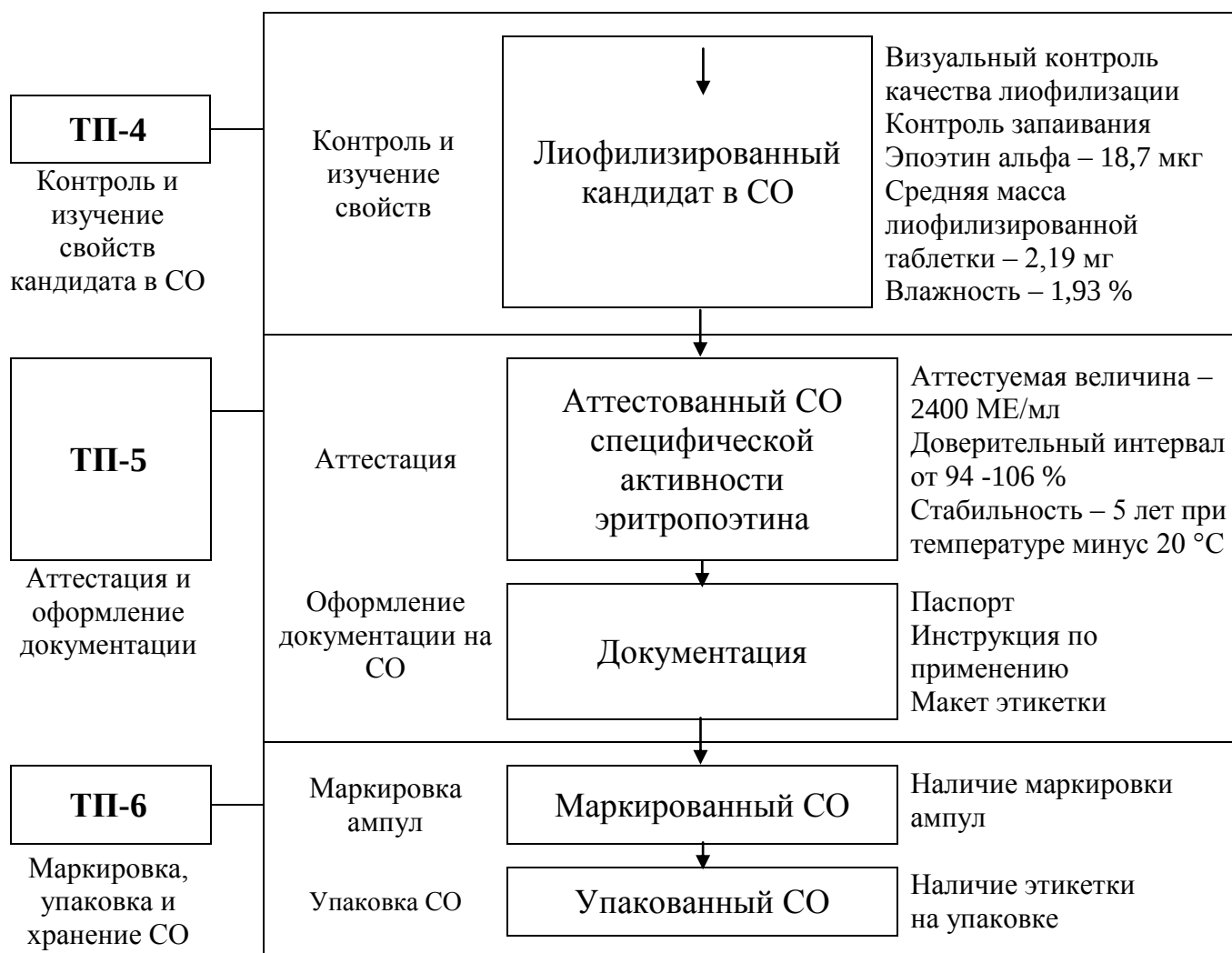


Рисунок 12 – Биологическая схема

На основании проведенных экспериментальных технологических исследований и по результатам разработки технологии изготовления лиофилизированного СО специфической активности эритропоэтина сделаны выводы:

1. Субстанция Рэпоэтин-СП (Гос.НИИ ОЧБ ФМБА ФГУП – Россия) серии № 1320914 соответствует требованиям ФСПР № 003458/01-050609, изм. № 1 на препарат, результатам входного контроля и рекомендациям ВОЗ, и наиболее пригодна для изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина.

2. Разработана технология изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина, которая состоит из одной подготовительной и пяти технологических стадий. 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).

ГЛАВА 3. Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина

Различия в требованиях к проведению методики определения специфической активности (Таблица 4) у отечественных производителей лекарственных препаратов эритропоэтина проявляются в использовании мышей разных линий, количестве животных в группе, вводимых дозах, способе подсчета ретикулоцитов, выборе статистического метода обработки результатов, диапазоне рассчитанной активности. Требования к оценке прецизионности отсутствуют.

Для определения точности методики при различных условиях, использовали следующий подход – испытуемые образцы получали путем серии независимых разведений стандартного образца эритропоэтина Европейской Фармакопеи (European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP batch 3). Один ряд разведений использовали для построения калибровочного графика, он служил стандартом, другой ряд разведений – исследуемым образцом. Этот прием использовали, чтобы стандартный и испытуемый образцы имели одинаковую активность (таким образом, была обнулена разница). Вместо принятого (приписанного) или опорного значения в данном случае появляется возможность пользоваться условно истинным значением, принятым за 100 %. В этом случае различия между результатами будут отражать область неизбежных случайных погрешностей, которая соответствует чувствительности метода. В этой области невозможно установить фактическое различие между полученными результатами. Область неизбежных случайных погрешностей складывается из случайных погрешностей и факторов, оказывающих влияние на результат измерения. Факторами, оказывающими влияние на результат измерения, служат аналитик, используемое оборудование, калибровка оборудования, параметры окружающей среды, вариация ответа животных, интервал времени между измерениями. Таким образом, используя данный прием, аналитик получает возможность установить факторы, которые наиболее сильно влияют на точность результата.

С целью стандартизации методики и выбора оптимальных условий были проведены исследования по влиянию на точность методики вида используемых отечественными производителями мышей, а также способа подсчета ретикулоцитов. Обязательным условием проведения исследований была рандомизация, назначение которой заключалось в том, чтобы, распределенные объекты в подгруппах не оказались более однородными, чем вся совокупность в целом. Это позволило исключить или уменьшить дополнительные источники вариации.

3.1 Изучение влияния линии мышей на результат определения

Исследование робастности методики определения специфической активности эритропоэтина провели по оценке статистической значимости различий результатов, полученных на мышах, используемых отечественными производителями (F1(CBA^xC57BL), Balb/C и беспородных) и линией мышей, указанной в Европейской фармакопее (B6D2F1). Дизайн эксперимента состоял из двух определений на каждой линии мышей, каждое определение состояло из 48 исследований ($n = 384$). В экспериментах учитывали влияние одного фактора – линии мышей. Подсчет ретикулоцитов проводили на проточном цитофлуориметре. Специфическую активность рассчитывали методом параллельных линий, результаты представлены в виде средней геометрической и ее доверительного интервала (Рисунок13).

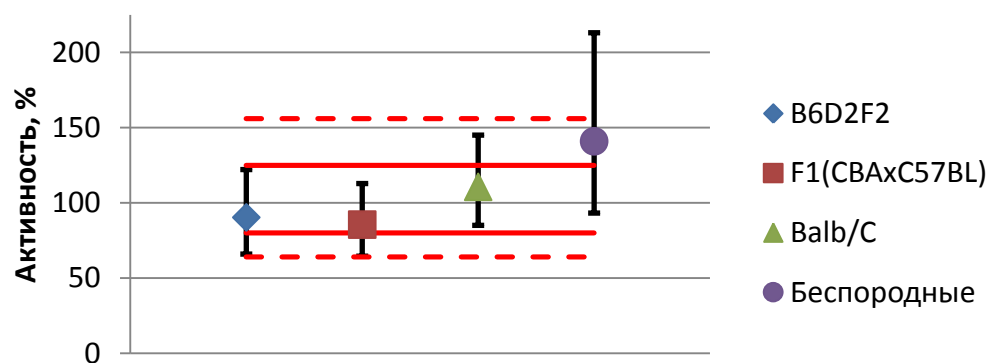


Рисунок 13 – Влияние мышей на результат определения специфической активности эритропоэтина.

Примечание: сплошные красные линии – диапазон рассчитанной активности, пунктирные красные линии – доверительный интервал рассчитанной активности (требования ЕФ).

Результаты, полученные на линейных мышах B6D2F1, Balb/C и F1 (CBA^xC57BL) соответствуют требованиям ЕФ по активности и доверительному интервалу. В опытах с беспородными мышами результаты не соответствуют требованиям, в массиве первичных данных выявлено три выброса (тест Граббса), кроме того, в одном из экспериментов не выполнен основной критерий приемлемости результатов – подобие испытуемого препарата стандартному образцу. В силу этих причин производитель № 1 (Таблица 5), для повышения точности методики увеличил общее количество животных с 48 до 56 по сравнению в ЕФ за счет увеличения числа групп и расширения диапазона исследуемых доз.

3.2 Сравнение точности проточной цитометрии и световой микроскопии

Исследование влияния способа подсчета ретикулоцитов при определении параметров методики и установлении диапазонов их значений провели в 6 испытаниях на мышах линии *B6D2F1* в возрасте 8 недель ($n=288$). Количество ретикулоцитов подсчитывали двумя способами – световой микроскопией и проточной цитометрией. Функция красителя в обоих способах подсчета – идентификация ретикулоцитов среди эритроцитов. Для проточной цитометрии использовали флуоресцентный краситель – 5 мкМ раствор акридинового оранжевого. В цитометрические пробирки помещали по 1000 мкл 5 мМ раствора красителя и 2 мкл цельной крови. Инкубировали в течение 1-30 мин в темном месте (в случае необходимости хранения, допускается инкубация до 24 ч, при температуре от 2 до 8° С). После окрашивания проб, с использованием проточного цитофлуориметра определяли количество ретикулоцитов в процентах от общего числа эритроцитов и ретикулоцитов. Для этого строили две гистограммы: двупараметрическая гистограмма (Рисунок 14) – служила для разделения эритроцитов и ретикулоцитов от тромбоцитов.

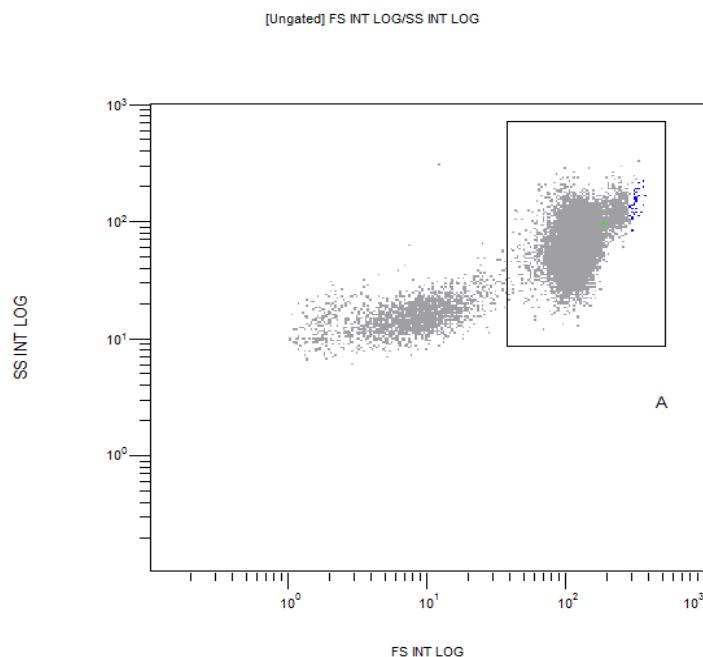


Рисунок 14 – Двупараметрическая гистограмма: по оси ординат – гранулярность, по оси абсцисс - размер, областью А выделены эритроциты и ретикулоциты, вне выделенной области находятся тромбоциты и дебрис.

На следующем этапе необходимо было разделить ретикулоциты и эритроциты, для этого строили однопараметрическую гистограмму (Рисунок 15).

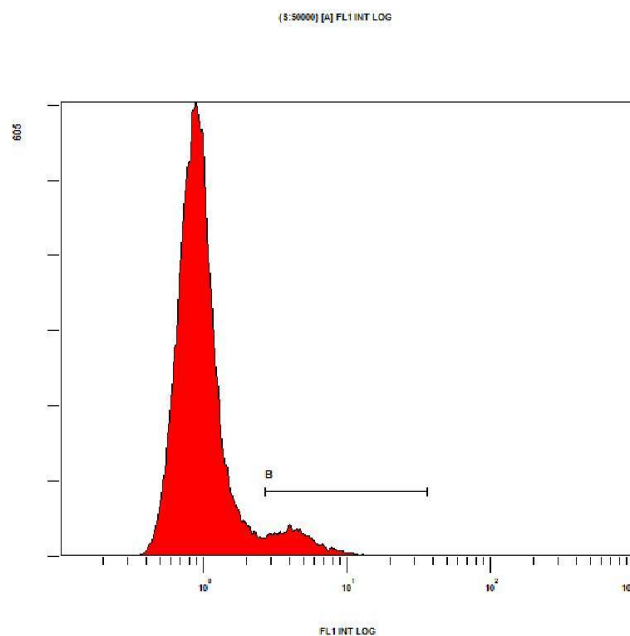


Рисунок 15 – Типичная гистограмма определения количества ретикулоцитов в образце крови мыши при учете проточным цитофлуориметром

Примечание: маленький пик, выделенный сверху планкой – ретикулоциты, окрашенные флуоресцентным красителем, пик слева – эритроциты. Всего проанализировано 50120 клеток из них 4231 клетка - ретикулоциты, что составляет 8,44 %

При оценке результатов с помощью световой иммерсионной микроскопии смешивали 50 мкл красителя «Раствор бриллиантового крезилового синего для окраски ретикулоцитов в крови» и 50 мкл образца крови, выдерживали 15-30 мин при комнатной температуре и готовили мазки крови на предметном стекле. Подсчет ретикулоцитов проводили под иммерсией при 1000-кратном увеличении (Рисунок 16). Подсчитывали столько «полей зрения» под микроскопом, чтобы общая сумма клеток была равна 1000.

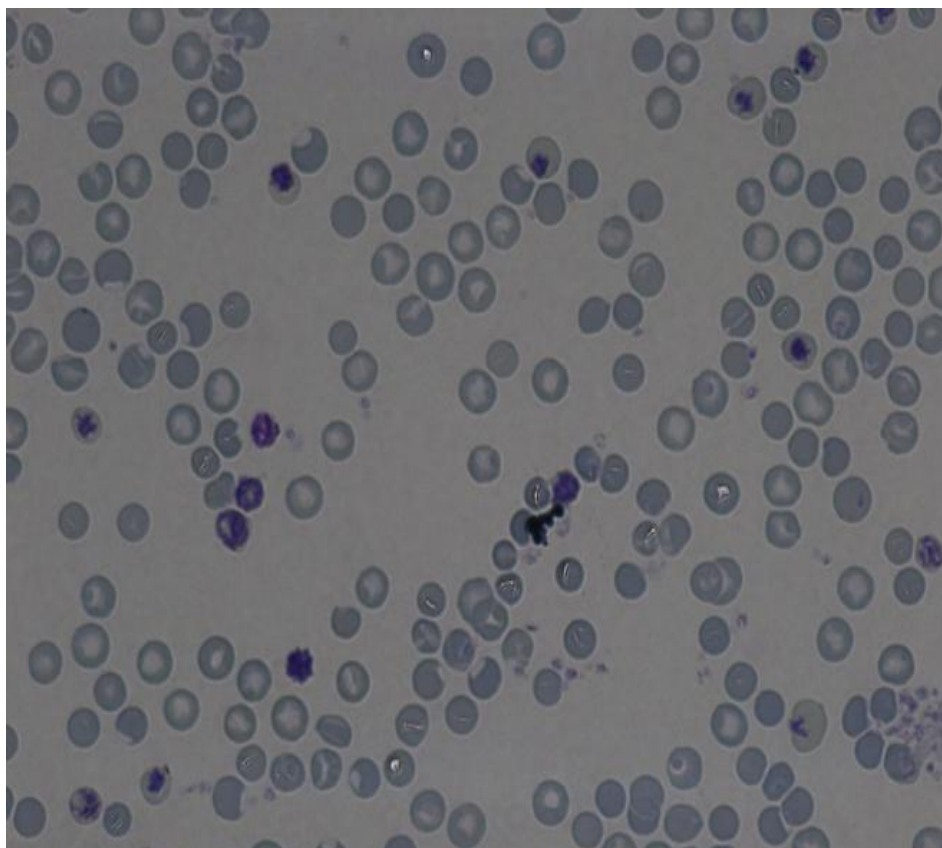


Рисунок 16 – Поле зрения микроскопа, увеличение x1000

Примечание: клетки, окрашенные фиолетовым цветом – ретикулоциты, серым – эритроциты. В поле зрения 200 клеток, 15 из них ретикулоциты, что составляет 7,5 % от общего количества клеток

Полученные первичные данные статистически обрабатывали методом параллельных линий.

Влияние способа подсчета оценивали по правильности и прецизионности полученного значения рассчитанной активности. По результатам проведенных исследований, получены средние геометрические значения рассчитанной активности и их доверительные интервалы (Таблица 17 и 18).

Таблица 17 – Рассчитанные значения показателя «Специфическая активность» при использовании двух способов учета результатов ($P=0,95$)

Номер испытания	Проточная цитометрия		Световая микроскопия		Требования ЕФ
	Специфическая активность, %	Весовой коэффициент	Специфическая активность, %	Весовой коэффициент	
1	94,3	47	85,5	4	80-125
2	98,8	101	94,4	17	
3	91,8	40	84,8	10	
4	95,3	74	69,1*	7	
5	106,5	49	103,5	17	
6	104,7	34	87,3	14	

Примечание: * - рассчитанное значение не соответствует требованиям ЕФ

В таблице 17 представлены средние геометрические значения, рассчитанные методом параллельных линий при статистической обработке 48 результатов определения специфической активности и их весовые коэффициенты. Весовой коэффициент – это числовой коэффициент отражающий значимость, относительную важность, «вес» значения, чем больше весовой коэффициент, тем больше доверия данному значению. Как видно из таблицы 18 результаты, полученные проточной цитометрией, имеют большие весовые коэффициенты в сравнении с результатами, полученными микроскопией, что указывает на большую их достоверность. При учете результатов с помощью световой иммерсионной микроскопии активность эритропоэтина определяется на 3-26 % ниже по сравнению с использованием проточной цитометрии, что указывает на наличие систематической ошибки, при этом в одном из 6 испытаний основной показатель качества препарата не соответствует требованиям ЕФ.

В таблице 18 представлены доверительные интервалы (I_{95}) специфической активности.

Таблица 18 – Доверительный интервал рассчитанной активности ($P=0,95$)

Номер испытания	Доверительный интервал рассчитанной активности (I_{95}), процент		Требования ЕФ, I_{95} , процент
	Проточная цитометрия	Световая иммерсионная микроскопия	
1	2	3	4
1	70 - 126	31 - 235	64 – 156

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4
2	81 - 121	58 - 153	64 – 156
3	67 - 127	44 - 162	
4	75 - 120	32 - 148	
5	80 - 142	63 - 170	
6	74 - 148	51 - 149	

Доверительные интервалы результатов, полученных световой микроскопией, имели более широкие границы в сравнении с результатами, полученными с помощью проточной цитометрии, и ни в одном из испытаний не соответствовали требованиям ЕФ.

Оценку правильности и прецизионности результатов, полученных с использованием проточной цитофлуориметрии и световой иммерсионной микроскопии при определении специфической активности рчЭПО, проводили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и XI Государственной фармакопеи СССР.

Правильность – это степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений, к принятому опорному значению. Правильность оценивали по смещению, расчеты показали, что результаты, полученные с помощью двух способов подсчета ретикулоцитов, имеют смещение относительно опорного значения. Величина смещения при использовании проточной цитометрии составляет 1- 8 %, световой микроскопии – от 4 - 31 % (Таблица 19).

Таблица 19 – Величина смещения относительно значения принятого в качестве опорного

Номер испытания	Относительное смещение, процент		Соотношение (в/а)	Среднее по 6 испытаниям
	Проточная цитометрия (а)	Световая иммерсионная микроскопия (в)		
1	6	15	2,5	3,3
2	1	6	6,0	
3	8	15	1,9	
4	5	31	6,2	
5	7	4	0,6	
6	5	13	2,6	

Представленные данные свидетельствуют о наличии смещения при обоих способах подсчета. При использовании микроскопии смещение больше в 1,9 - 6,2 раза. Исключение эксперимент № 5, смещение меньше в 0,6 раза, однако, если обратить внимание на весовые коэффициенты (Таблица 17), то станет очевидным, что степень доверия к результату, полученному методом проточной цитометрии, выше. Таким образом, правильность результатов, полученных методом проточной цитометрии, в среднем в 3,3 раза выше по сравнению с результатами, полученными с помощью световой микроскопии.

Оценка дисперсий представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Прецизионность результатов определения специфической активности эритропоэтинов с использованием проточной цитометрии и световой иммерсионной микроскопии

Номер испытания	Дисперсия		$F_{\text{эксп.}}$	$F_{\text{табл.}}$ ($P=0,99$, $f_1=47$, $f_2=47$)
	Проточная цитометрия	Световая иммерсионная микроскопия		
1	71	375	5,25	2,01
2	35	150	4,29	
3	60	122	2,03	
4	28	150	5,44	
5	47	238	5,08	
6	43	222	5,14	

Межгрупповое и внутригрупповое число степеней свободы равно 47, критическое значение F при 1 % уровне значимости составляет 2,01. Вычисленное значение F во всех экспериментах превышает табличное значение, что указывает на статистически значимые различия между способами подсчета ретикулоцитов. Вероятность случайно получить такие различия не превышает 1 %. Представленные данные свидетельствуют о лучшей воспроизводимости метода проточной цитометрии, поскольку последний характеризуется меньшей дисперсией по сравнению со световой микроскопией (не менее чем в два раза).

Более высокое значение дисперсии результатов при использовании световой иммерсионной микроскопии, возможно связано с недостаточным количеством клеток, подлежащих подсчету, из-за трудоемкости метода. Данное

предположение было сделано по результатам исследования зависимости стандартного отклонения от количества подсчитанных клеток при использовании проточного цитометра. Для этого рассчитали величину дисперсии при различном количестве подсчитанных клеток (Рисунок 17).

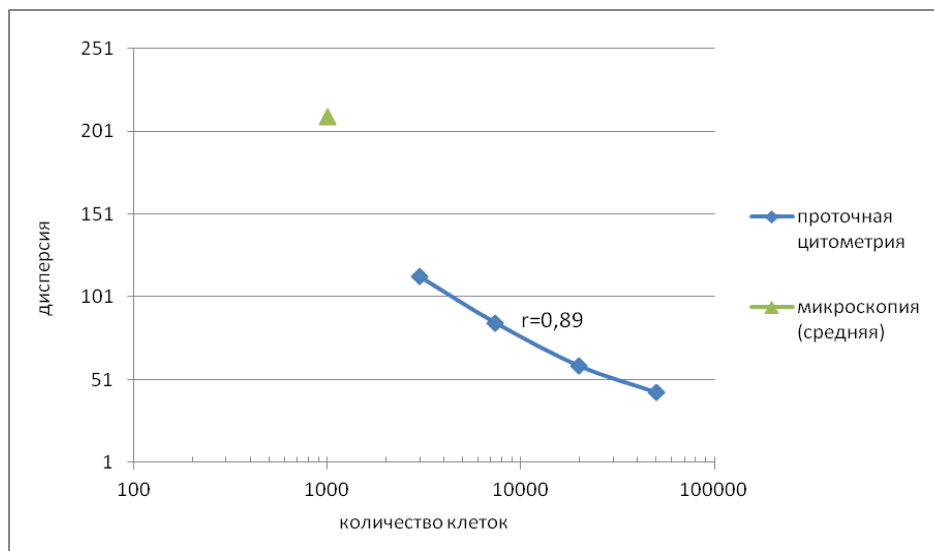


Рисунок 17 – Влияние количества подсчитанных клеток на величину дисперсии при использовании проточного цитометра

Наличие обратной зависимости величины дисперсии от количества подсчитанных клеток на проточном цитометре (коэффициент корреляции 0,89) свидетельствует о возможности повышения прецизионности метода световой иммерсионной микроскопии путем увеличения общего числа подсчитываемых клеток.

Таким образом, результаты обоих способов подсчета имеют смещение. Метод проточной цитометрии обладает большей точностью по сравнению с методом световой иммерсионной микроскопии. Методика определения специфической активности препаратов эритропоэтина с использованием проточной цитометрии соответствует требованиям ЕФ по характеристикам точности. Результаты, полученные с помощью световой иммерсионной микроскопии, обладают меньшей точностью и не соответствуют требованиям ЕФ по доверительному интервалу. При отсутствии проточного цитометра использование менее точной световой микроскопии требует отработки оптимальных условий (количество подсчитываемых клеток).

3.3 Обоснование дизайна методики

Проведенные исследования позволили стандартизовать методику в отношении используемых линий мышей и способа подсчета ретикулоцитов и приступить к обоснованию дизайна методики.

Точность подсчета ретикулоцитов, методом проточной цитометрии в среднем в два раза выше световой микроскопии, что указывает на возможность введения, установленного ЕФ, критерия приемлемости результатов испытания – доверительного интервала рассчитанной активности. Предметом исследований было обоснование оптимального дизайна методики, позволяющего гармонизировать требования по точности к результатам определения специфической активности эритропоэтина с ЕФ.

Изучение прецизионности провели в 6 независимых экспериментах на мышах линии Balb/C ($n=288$) по схеме, изменяющей факторы, которые могут оказывать влияние на точность методики. Для этого использовали первичные результаты подсчета ретикулоцитов методом проточной цитометрии. Каждый эксперимент включал три уровня доз: 20, 40 и 80 МЕ/мл, по 8 повторов стандартного и испытуемого образцов, что составило набор для проведения серии параллельных испытаний. Стимуляцию эритропоэза оценивали в процентах ретикулоцитов на 1000 эритроцитов, полученные результаты характеризовались вариабельностью (Рисунок 18).

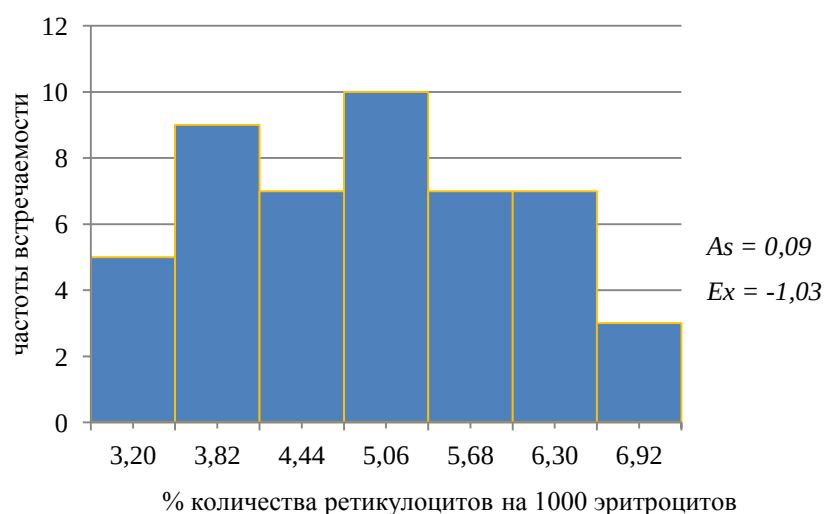


Рисунок 18 – Гистограмма распределения количества ретикулоцитов

Проверку первичных данных на нормальность распределения проводили в соответствии с общепринятой методикой (Лакин Г.Ф., 1990). Величина коэффициента асимметрии ($As=0,09$) близка к нулю, коэффициент эксцесса (Ex) заметно выражен и равен $-1,03$, что превышает табличное критическое значение $Ex_{крит}=0,867$ при уровне значимости $\alpha=1\%$, поэтому гипотеза о нормальности распределения отвергается. Поскольку статистические методы, используемые в исследовании, требуют, чтобы данные были близки к нормальному распределению, результаты были подвергнуты логарифмическому преобразованию по основанию натурального логарифма (e) (Рисунок 19). Полученные величины коэффициента асимметрии и эксцесса ниже табличных ($As_{крит}=0,802$; $Ex_{крит}=0,867$, при $n=48$ и уровне значимости $\alpha=1\%$), что указывает на близость к нормальному распределению.

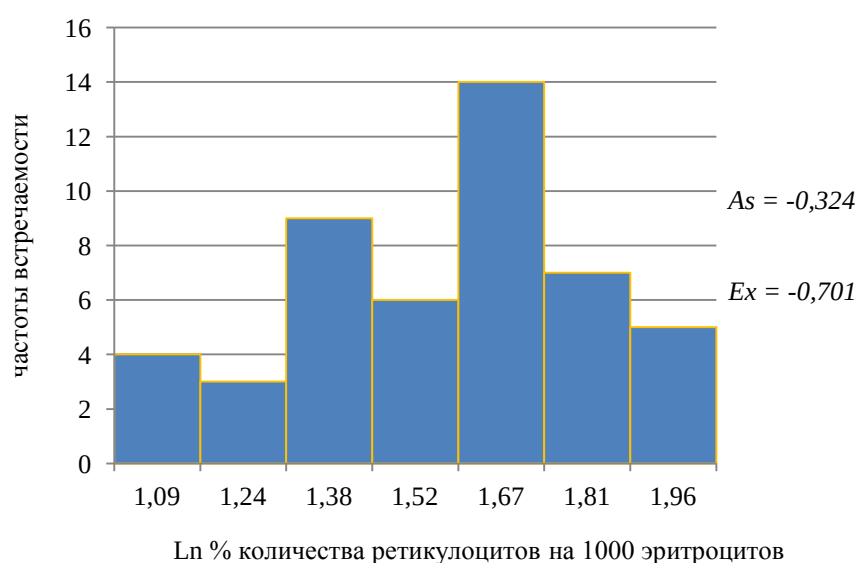


Рисунок 19 – Гистограмма распределения количества ретикулоцитов. Данные после логарифмического преобразования

Стратегия параллельных испытаний на всех уровнях была одинаковой, поэтому компоненты дисперсии определены на основании стандартного однофакторного дисперсионного анализа, описанного в ЕФ [130]. Результаты дисперсионного анализа для модели компонент дисперсии эксперимента № 3 приведены в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты дисперсионного анализа на примере уровня 20 МЕ/мл

Источник изменчивости	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	Оценки компонент дисперсии
Между параллельными испытаниями	7	0,196	0,028	0,0083
Остаточная дисперсия внутри уровня	8	0,091	0,011	0,0114
Сумма	15	0,287	-	-

Оценки компонент дисперсии рассчитали на каждом уровне испытания по прецизионности. Промежуточную прецизионность выражали как процент геометрического коэффициента вариации (% GCV), и определяли по формуле (USP, монография <1033>):

$$\text{ПП} = 100 \times (e^{\sqrt{\sigma^2_{\text{между}} + \sigma^2_{\text{внутри}}}} - 1) \% \quad (2)$$

где: e – иррациональное число;

$\sigma^2_{\text{между}}$ – дисперсия между уровнями;

$\sigma^2_{\text{внутри}}$ – дисперсия эксперимента.

Результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Компоненты дисперсии и общая вариабельность уровней эксперимента № 3

Компонента	Значение компоненты			
	Уровень			Среднее
	20 МЕ/мл	40 МЕ/мл	80 МЕ/мл	
Дисперсия между	0,0083	0,0078	0,0060	0,0074
Дисперсия внутри	0,0114	0,0176	0,0107	0,0132
Промежуточная прецизионность, %	15,1	17,3	13,8	15,4

Соотношение максимальной и минимальной дисперсий между параллельными испытаниями составляет 1,4, внутри уровня 1,6 предельным значением по схеме исследования является 6. При превышении этой величины за счет избыточной вариабельности данный уровень необходимо было бы исключить из дальнейшего анализа и ограничить диапазон применения методики. Валидационные испытания имели сбалансированный дизайн, поэтому дисперсии

между уровнями усреднили, геометрический коэффициент прецизионности методики составил 15,4 %.

Результаты средних оценок дисперсий и промежуточная прецизионность по 6 экспериментам представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Дисперсия и общая вариабельность испытаний (6 экспериментов)

Компонента	Номер испытания					
	1	2	3	4	5	6
Дисперсия между	0,0024	0,0005	0,0074	0,0001	0,0016	0,0051
Дисперсия ошибки	0,0159	0,0085	0,0132	0,0064	0,0089	0,0062
Промежуточная прецизионность, %	14,5	9,9	15,4	8,2	10,7	11,2

Оценки дисперсии использовали для определения схемы методики с желаемым уровнем прецизионности. Прогнозируемую вариабельность (ПВ) для независимых уровней (k) с серией разведений (n) испытуемого препарата в рамках эксперимента № 3 рассчитывали по формуле (USP, монография <1033>):

$$\text{ПВ} = 100 \times (e^{\sqrt{\sigma^2_{\text{между}}/k + \sigma^2_{\text{внутри}}/(nk)}} - 1) \% \quad (3)$$

В таблице 24 представлен прогноз прецизионности при различных комбинациях количества уровней и параллельных испытаний по результатам эксперимента № 3, выбранного по максимальной величине среднего геометрического коэффициента вариации по трем уровням. Расчет расширили путем включения различных комбинаций уровней и количества параллельных испытаний. Геометрический коэффициент вариации методики по схеме три уровня в каждом по 8 параллельных испытаний составил 5,6 %. Как видно из таблицы 24, дальнейшее увеличение животных в уровне не значительно уменьшает вариабельность методики, теоретически снижение вариабельности может быть достигнуто за счет увеличения числа уровней при одновременном снижении количества животных. Это предположение проверили в эксперименте по определению диапазона применения методики.

Таблица 24 – 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

Для определения диапазона, в котором существует линейная зависимость «эффекта от логарифма дозы» исследовали 5 уровней доз (10, 20, 40, 80 и 160 МЕ/мл) на мышах линии Balb/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.

Схема эксперимента включала приготовление следующих растворов:

- плацебо (0,1 % раствор бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере);
- испытуемый раствор 160 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;
- испытуемый раствор 80 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;
- испытуемый раствор 40 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;

- испытуемый раствор 20 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;

- испытуемый раствор 10 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;

Растворы готовили непосредственно перед применением, испытание проводили по методике, описанной в разделе Биологические методы исследования (Методика определения специфической активности эритропоэтина на нормоцитемических мышах). Растворы вводили 6 группам мышей линии Balb/C в каждой по 8 животных. На 4 сутки после введения препаратов из ретроорбитального синуса отбирали образцы крови и подсчитывали количество ретикулоцитов на 50000 красных клеток. Первичные данные представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Результаты подсчета ретикулоцитов

Активность, МЕ/мл	Количество ретикулоцитов в процентах от общего числа красных клеток крови							
	1	2	3	4	5	6	7	8
160	7,68	8,25	7,37	8,2	8,54	13,22	7,43	5,34
80	6,26	5,8	7,16	6,33	6,89	6,76	7,98	6,22
40	5,74	6,66	5,75	5,52	6,49	5,41	5,93	5,71
20	4,25	4,41	4,22	4,27	3,64	5,01	4,08	4,15
10	3,68	3,08	3,48	3,13	3,88	3,87	4,84	3,47
0	2,45	2,12	1,85	2,2	2,3	1,9	3,45	3,25

Соответствие статистической модели линейной регрессии проверили дисперсионным анализом, результаты дисперсионного анализа представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты дисперсионного анализа

Источник отклонений	Степень свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат отклонения	$F_{\text{экс}}$	$F_{\text{табл}}$	Вывод
Разведения*	4	109,4	27,4	22,3	2,635	Соответствует
Линейная регрессия**	1	107,1	107,1	87,48	4,12	Соответствует
Линейность***	3	2,2	0,76	0,62	2,875	Соответствует
Неисключенная погрешность	35	42,9	1,22	--	--	--
Суммарная ошибка	39	152,3	--	--	--	--

Примечание: * – каждое последующее разведение должно достоверно отличаться от предыдущего; ** – наклон линии в координатах «логарифм дозы – ответ» существенно

отличается от нуля; *** – связь между логарифмом дозы и ответом имеет линейную зависимость в пределах используемых доз

Дисперсионный анализ показал, 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 %, $F_{эсп} = 87,48 > F_{табл} = 4,12$ ($f_{меж} = 1$, $f_{внутр} = 35$, при $P=0,95$). На основании полученных результатов построили график зависимости эффекта (y) от логарифма дозы (x) (Рисунок 20).

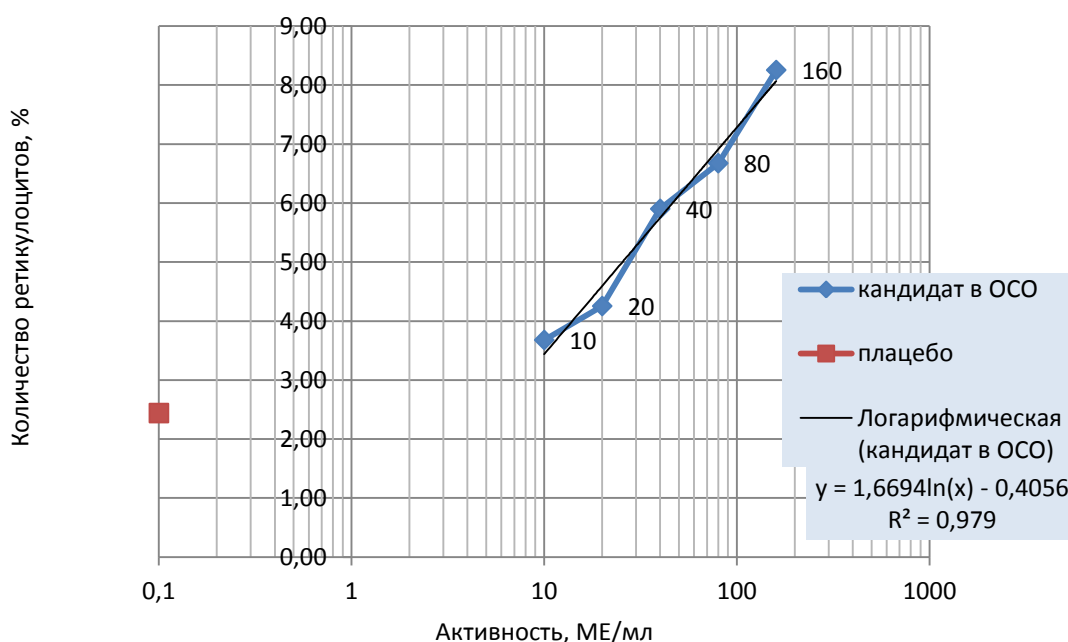


Рисунок 20 – График зависимости эффекта (y) от логарифма дозы (x)

На графике наблюдается линейная зависимость, которая описывается следующим уравнением:

$$y = 1,6694 \ln(x) - 0,4056$$

где: -0,4056 – коэффициент сдвига;

1,6694 – коэффициент наклона.

Коэффициент детерминации составил $R^2 = 0,979 \approx 0,98$, т.е. более 0,95.

Результаты испытания «Линейность» в диапазоне от 10 до 160 МЕ/мл соответствуют критериям приемлемости. В данном диапазоне отмечается линейная зависимость, коэффициент детерминации $R^2=0,98$, результаты испытаний прямо пропорциональны концентрации эритропоэтина в образце.

Следующим шагом необходимо было определить смещение на отдельных уровнях и его доверительные интервалы. Исходными данными служила рассчитанная активность единичного измерения, которую рассчитывали путем сопоставления эффекта стандартного и испытуемого образцов, проявляемого в виде количества ретикулоцитов, и выражали в МЕ (Рисунок 21).

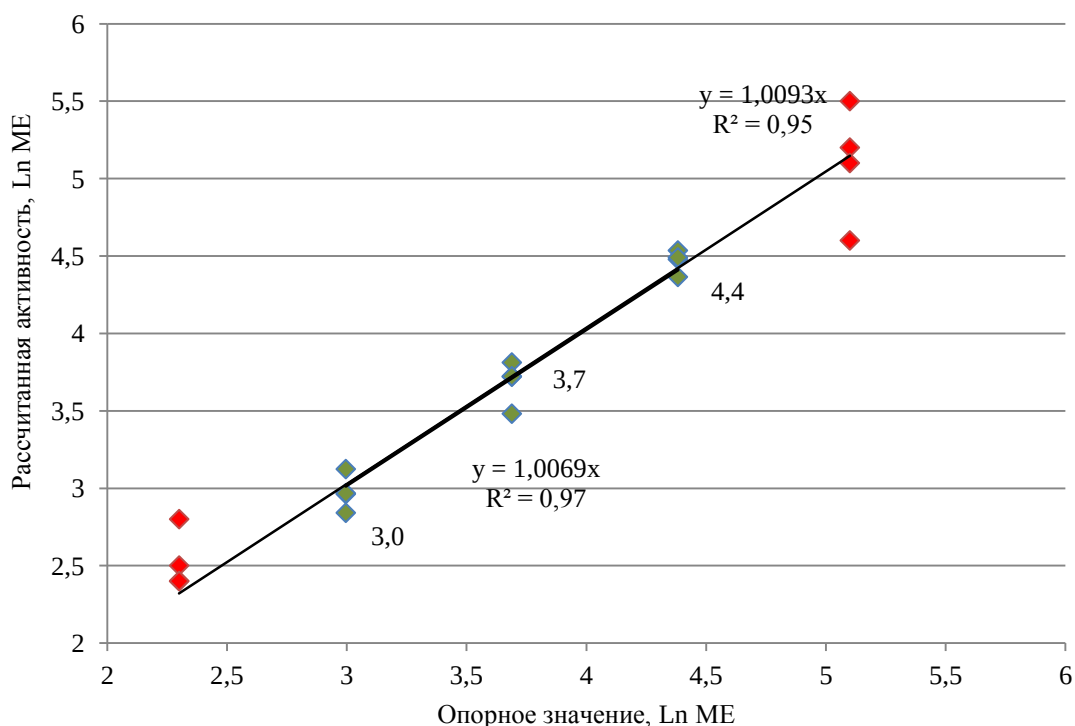


Рисунок 21 – Результаты исследования правильности по уровням.

Примечание: красным цветом указаны точки, имеющие значительную вариабельность при визуальной оценке, зеленым участок линейной зависимости (уравнение регрессии $y=1,0069x$ с коэффициентом детерминации $R^2=0,97$)

Данные, представленные на рисунке 21, свидетельствуют о значительной вариабельности результатов активности на крайних уровнях (10 и 160 МЕ/мл), что вероятно связано с выходом ответа на плато (нижняя и верхняя асимптоты). Для выбора схемы методики принципиально важным является степень корреляции между эталоном и рассчитанной по нему активности. Этому условию соответствует участок прямой в диапазоне от 20 до 80 МЕ/мл (уравнение регрессии $y=1,0069x$ с коэффициентом детерминации $R^2=0,97$). Правильность оценивали по смещению на отдельных уровнях, а также путем отслеживания зависимости на всех уровнях.

В таблице 27 приведены среднее значение и 90 % доверительный интервал на логарифмической шкале, а также соответствующие активность и смещение.

Таблица 27 – Средняя активность и относительные систематические ошибки на уровнях

Уровень доз, МЕ/мл	Активность						Ст откл	GCV %	Смещение	90 % (ДИ)	
	Среднее геом.	90 % (ДИ)		Среднее Ln	90 % (ДИ)					min	max
		min	max		Min	max					
10	12,4	9,9	15,6	2,52	2,29	2,75	0,19	21,4	24	-0,99	56,1
20	19,6	17,1	22,4	2,97	2,84	3,11	0,12	12,3	-2	-14,7	12,0
40	39,8	33,7	47,0	3,68	3,52	3,85	0,14	15,2	-1	-15,8	17,5
80	87,1	80,0	94,9	4,47	4,38	4,55	0,07	7,5	9	-0,04	18,6
160	166	107,7	257	5,11	4,68	5,55	0,37	44,8	4	-32,7	60,7

Изменения величины смещения на разных уровнях и его 90 % доверительные интервалы (Рисунок 22) согласуются с графиком линейной зависимости (Рисунок 21).

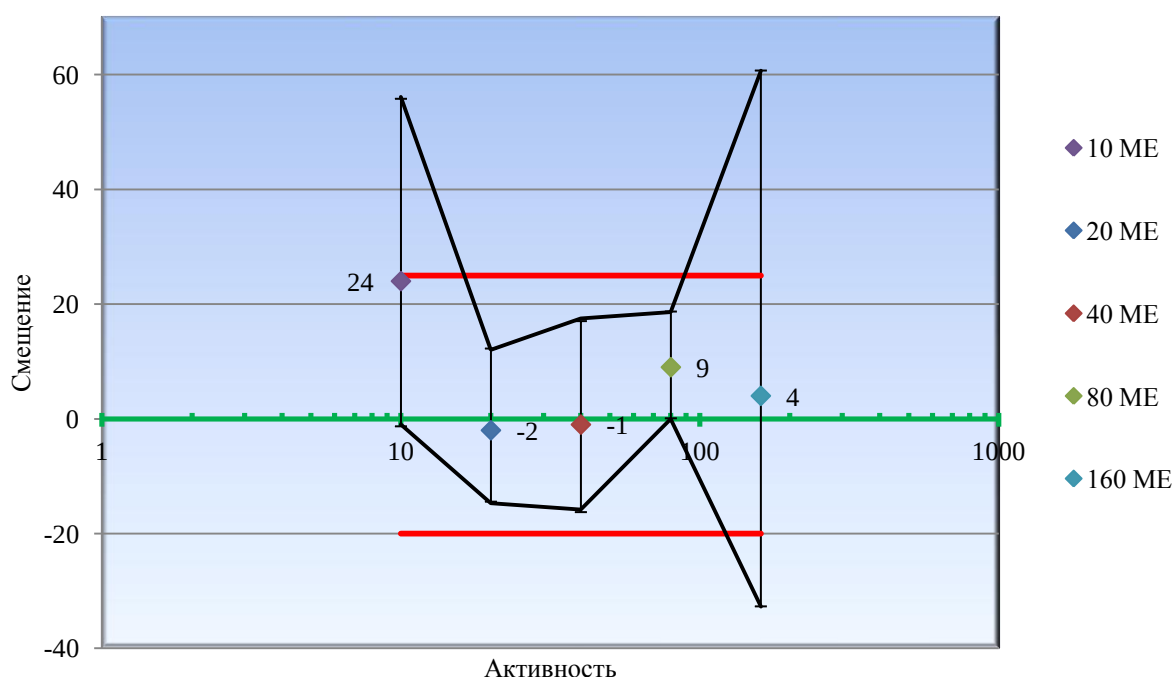


Рисунок 22 – График 90 % доверительных интервалов для смещения.

Примечание: сплошная горизонтальная зеленая линия – целевое значение смещения, сплошные красные линии – диапазон рассчитанной активности

Диапазон рассчитанной активности определили от 80 до 125 %, по результатам анализа требований нормативной документации отечественных

производителей (у большинства из них его границы от 80 до 120 %). Следуя рекомендациям (USP раздел <1033>) верхнюю границу доверительного интервала при логнормальном распределении рассчитывают по формуле $1,00/0,80 \cdot 100\% = 125\%$.

На рисунке 22 между уровнями не прослеживается зависимость смещения. Её наличие указывало бы на систематическое отклонение при сравнении образцов с разными показателями относительной активности. После установления отсутствия зависимости смещения между уровнями провели оценку правильности на каждом уровне. В нашем случае 90 % доверительные интервалы смещения на уровнях 10 и 160 МЕ/мл выходят за пределы диапазона приемлемости.

Исходя из полученных результатов оценки внутрилабораторной прецизионности и правильности, можно сделать заключение о целесообразности схемы методики с тремя уровнями доз 20, 40 и 80 МЕ/мл. В данном диапазоне применения методики сохраняется удовлетворительная точность (Рисунки 21 и 22).

Прецизионность в целом характеризуется доверительным интервалом, поэтому результат испытания необходимо представлять вместе с доверительным интервалом рассчитанной активности. Однако в спецификациях отечественных производителей данный критерий приемлемости результатов отсутствует. В целях гармонизации отечественных требований к точности определения специфической активности эритропоэтина с требованиями Европейской фармакопеи целесообразно ввести в ОФС «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина» критерий приемлемости результатов – доверительный интервал рассчитанной активности и требования (от 64 до 156 %). Границы доверительного интервала рассчитывали исходя из диапазона активности (80-125 %) и правильности методики (смещение не более 8 %, таблица 19) $80\%/125\% \cdot 100\% = 64\%$ – нижний доверительный интервал рассчитанной активности и $125\%/80\% \cdot 100\% = 156\%$ – верхний доверительный интервал рассчитанной активности.

Доверительный интервал рассчитанной активности при величине прецизионности 5,6 % составляет 76 - 131 %, рассчитан методом параллельных линий и соответствует требованиям ЕФ (64 - 156 %, при $P=0,95$) (Таблица 4).

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 (критерий параллельности) (USP <1032> DESIGN AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL ASSAYS). Для экспериментально обоснованного формата методики, ограниченного тремя уровнями доз, применима статистическая обработка результатов методом параллельных линий. В основе данного метода лежит дисперсионный анализ, который позволяет достоверно проверить предположение о подобии сравнением двух линий на графике, построенных по средним величинам в серии разведений. Параллельность – фундаментальный принцип сравнения двух биологических препаратов. Наличие параллельности линий означает, что стандартный образец и испытуемый препарат имеют одинаковую природу, содержат одно и то же активное начало, но в разном соотношении активного и неактивного компонентов, ее отсутствие указывает на несопоставимость препаратов.

На основании экспериментального исследования точности на отдельных уровнях определен диапазон применения методики определения специфической активности эритропоэтина, подобран статистический метод, предложен диапазон специфической активности и границы ее доверительного интервала.

ГЛАВА 4. Валидация методики определения специфической активности эритропоэтина

Определение специфической активности эритропоэтина является количественной методикой, поэтому полученные при валидации результаты статистически обрабатывали и оценивали по следующим характеристикам: специфичность, правильность и прецизионность. Линейность и диапазон применения исследовали в процессе совершенствования методики. Обязательным условием проведения испытаний было шифрование образцов крови и рандомизация лабораторных животных. В качестве испытуемого образца использовали разработанный стандартный образец, активность оценивали относительно международного стандартного образца и стандартного образца эритропоэтина Европейской фармакопеи.

4.1 Исследование специфичности

Специфичность исследовали в 3 экспериментах по способности методики точно и селективно измерять специфическую активность испытуемого препарата эритропоэтина относительно стандартного образца эритропоэтина Европейской фармакопеи, в присутствии вспомогательных веществ (компоненты раствора плацебо).

Для оценки специфичности методики установили следующие критерии приемлемости:

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 $P=0,95$).

Схема эксперимента включала введение следующих растворов:

- плацебо (0,1 % раствор бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере);

- стандартный раствор 80 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;
- стандартный раствор 40 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;
- стандартный раствор 20 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;
- испытуемый раствор 80 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;
- испытуемый раствор 40 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере;
- испытуемый раствор 20 МЕ/мл в 0,1 % растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере.

Растворы готовили непосредственно перед применением, испытание проводили по методике, описанной в разделе Биологические методы исследования (Методика определения специфической активности эритропоэтина на нормоцитемических мышцах). Раствор плацебо вводили двум группам мышей: первая группа – мыши линии Balb/C ($n=8$), вторая – мыши линии F1(CBAxС57BL) ($n=8$). Испытуемые и стандартные растворы вводили мышам линии Balb/C, также была предусмотрена интактная группа мышей 4 мыши линии Balb/C и 4 - CBAxС57BL. На 4 сутки после введения препаратов из ретроорбитального синуса отбирали образцы крови и подсчитывали количество ретикулоцитов на 50000 красных клеток, рассчитывали среднее значение ($\bar{x}$), стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (RSD, %), результаты испытания представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты подсчета ретикулоцитов

Активность, МЕ/мл	Количество ретикулоцитов в процентах от общего числа красных клеток крови										
	1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{x}$	SD	RSD, %
Плацебо											
0	2,74	1,99	2,79	4,33	3,27	3,12	2,99	3,58	3,10	0,68	21,9
	1,62	2,37	1,91	3,01	1,45	1,71	2,45	1,98	2,1	0,5	25,0

Продолжение таблицы 28

Активность, МЕ/мл	Количество ретикулоцитов в процентах от общего числа красных клеток крови										
	1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{x}$	SD	RSD, %
Стандартный образец											
20	4,84	5,84	4,46	4,48	5,03	2,96	6,91	4,28	4,9	1,2	23,9
40	5,96	5,41	4,44	6,78	5,14	6,57	7,35	5,65	5,9	1,0	16,1
80	8,51	8,28	5,39	7,59	8,27	6,39	9,11	6,46	7,5	1,3	17,2
Испытуемый образец											
20	4,71	3,74	2,71	5,03	4,00	4,22	6,07	6,54	4,6	1,2	27,0
40	7,27	4,75	6,00	6,26	5,15	5,52	7,02	6,29	6,0	0,9	14,4
80	6,04	6,50	6,75	6,47	5,27	6,32	8,75	7,45	6,7	1,0	15,4
Интактные мыши											
--	1,62	2,52	2,67	3,08	3,8	2,71	2,46	3,29	2,8	0,65	23,3

Дозозависимое увеличение количества ретикулоцитов от активности эритропоэтина представлено на рисунке 23.

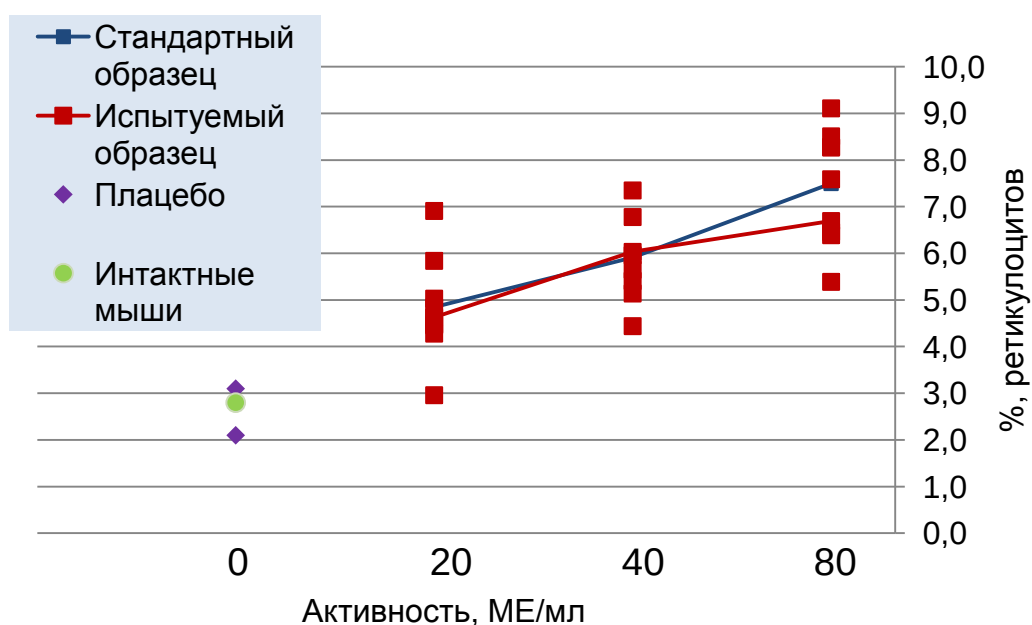


Рисунок 23 – Дозозависимое увеличение количества ретикулоцитов от активности эритропоэтина

Количество ретикулоцитов при введении раствора плацебо 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.

Проверку критериев приемлемости метода и результатов испытания проводили дисперсионным анализом. Достоверность различий проверяли

сравнением экспериментального числа $F_{эксп}$ с табличным $F_{крит}$ при ($P=0,95$), результаты представлены в таблице 29.

Таблица 29 – Результаты дисперсионного анализа

Источник отклонений	Степень свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат отклонения	$F_{эксп}$	$F_{табл}$	Вывод
Линейная регрессия*	1	44,49	44,49	36,57	4,07	Соответствует
Параллельность**	1	0,68	0,68	0,56	4,07	Соответствует
Неисключенная погрешность	42	51,10	1,22	--	--	--
Суммарная ошибка	47	98,47	--	--	--	--

Примечание: * – наклон линии в координатах «логарифм дозы – ответ» существенно отличается от нуля; ** – различия между наклоном прямых испытуемого и стандартного образцов статистически незначимы

Предположение, что стандартный и испытуемый образцы содержат одно и то же действующее вещество, то есть подобны с биологической точки зрения, проверили по различию угла наклона прямых линий зависимости ответов от концентраций. В качестве подтверждения предположения использовали статистический критерий подобия – параллельность прямых «доза-эффект» для испытуемого и стандартного образцов.

Дисперсионный анализ показал, что различия между наклоном прямых линий статистически незначимы. Вероятность случайно получить такие различия не превышает 5 %, $F_{эксп} = 0,56 < F_{табл} = 4,07$ ($f_{меж} = 1$, $f_{внутр} = 42$, при $P=0,95$). Следовательно, прямая линия испытуемого образца, построенная по средним в серии двукратных разведений параллельна прямой стандартного образца. По статистическому подобию можно сделать предположение о биоподобии, т.е. испытуемый и стандартный образцы содержат одно и то же действующее вещество – Эпоэтин. Однако стандартный образец эритропоэтина Европейской фармакопеи состоит из равных количеств Эпоэтина альфа и бета (50:50 эпоэтин альфа и бета), а испытуемый препарат – Эпоэтин альфа, т.е. методика не способна обнаружить различия между разными, но родственными биофармацевтическими молекулами.

Таким образом, по результатам испытания специфичности методики установлено:

1. отсутствие специфической активности раствора плацебо по отношению к раствору стандартного образца;
2. стандартный образец обладает специфической активностью;
3. прямая испытуемого образца, построенная по средним значениям в серии двукратных разведений параллельна аналогичной прямой для стандартного образца (при $P=0,95$).

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

4.2 Изучение правильности

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 %.

В качестве опорного значения использовали средневзвешенное значение специфической активности, полученное при аттестации стандартного образца. Активность выражали в процентах относительно опорного значения, результаты представлены в таблице 30.

Таблица № 30 – Результаты определения активности разработанного стандартного образца относительно опорного значения

Аналитик*	СО относительно	Линия мышей	Активность относительно опорного значения, %
1	3 nd IS	Balb/C	96
		F1(CBAxC57Bl)	106
	BRP # 3	Balb/C	102
		F1(CBAxC57Bl)	106

Продолжение таблицы 30

Аналитик*	СО относительно	Линия мышей	Активность относительно опорного значения, %
2	3 nd IS	Balb/C	85
		F1(CBAxC57Bl)	94
	BRP # 3	Balb/C	120
		F1(CBAxC57Bl)	118
3	3 nd IS	Balb/C	107
		F1(CBAxC57Bl)	103
	BRP # 3	Balb/C	84
		F1(CBAxC57Bl)	92

Примечание: аналитик - группа сотрудников одной лаборатории, за каждым из которых закреплены постоянные функции воспроизведения методики в течение выполнения 4х экспериментов

Результаты оценки правильности методики представлены на рисунке 24.

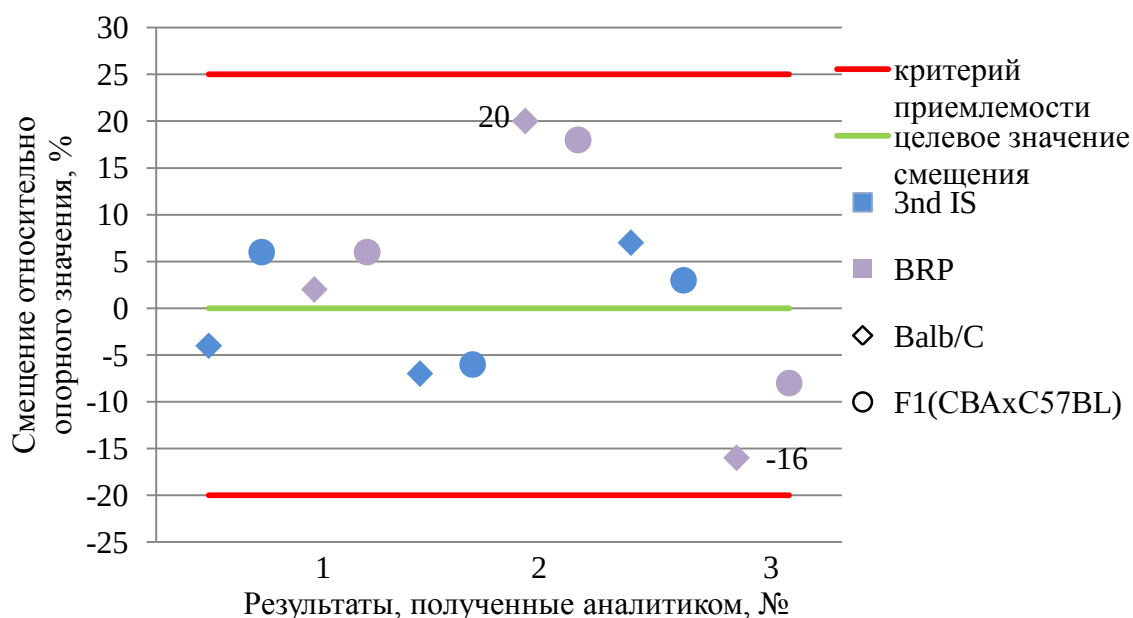


Рисунок 24 – Оценка правильности

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

4.3 Оценка прецизионности

Исследуемая схема методики предполагает 8 параллельных испытаний в трех сериях двукратных разведений (20, 40 и 80 МЕ/мл). Чтобы рассчитать

конечный результат, необходимо провести сравнение со стандартным образцом на всех уровнях и между уровнями, при этом учитывая степень разброса результатов стандартного образца. Метод параллельных линий, позволяет рассчитать активность относительно стандартного образца с доверительным интервалом. Доверительный интервал в данном случае характеризует степень разброса 48 независимых результатов определения. Однако, использование доверительного интервала в качестве меры прецизионности неудобно, поскольку это не одна цифра, а диапазон «от и до». Кроме того, полученные доверительные интервалы имеют правостороннюю асимметрию, так как при расчете используют логнормальное преобразование результатов. Поэтому мы предлагаем в качестве меры прецизионности использовать антилогарифм полуширины доверительного интервала, который лишен данных недостатков и характеризует доверительный интервал в виде одного цифрового значения, устраняя асимметричность, но при этом сохраняя преемственность логнормально преобразованных первичных данных.

Ниже представлены варианты расчета антилогарифма полуширины доверительного интервала ($\text{AntiLn } I_{95}/2$), с использованием верхней или нижней его границы:

$$\text{AntiLn } I_{95}/2 = 156 \% / 100 \% = 1,56 \quad (4)$$

$$\text{AntiLn } I_{95}/2 = 100 \% / 64 = 1,56 \quad (5)$$

Верхняя граница доверительного интервала – 156 %;

Активность всегда равна 100 %;

Нижняя граница доверительного интервала – 64 %.

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

Прецизионность методики в условиях повторяемости

Схема экспериментов по повторяемости включала определение степени близости друг к другу результатов 8 независимых параллельных испытаний в трех сериях двукратных разведений (20, 40 и 80 МЕ/мл), полученных одним

аналитиком на одном и том же оборудовании в течение одного дня, в сравнении со стандартным образцом, приготовленным таким же способом.

При совершенствовании методики были установлены границы доверительного интервала: от 64 до 156 % при вероятности 95 %. Исходя из этого, для оценки результатов прецизионности в условиях сходимости установили следующий критерий приемлемости: антилогарифм полуширины доверительного интервала рассчитанной специфической активности ($P=0,95$) не должен превышать величину 1,56.

Доверительный интервал активности рассчитывали методом параллельных линий. Полученные результаты представлены в таблице № 31.

Таблица 31 – Оценка приемлемости доверительных интервалов

Аналитик	СО относительно	Линия мышей	Доверительный интервал, %		Оценка*
			Результат	Установленные границы	
1	3 nd IS	Balb/C	85-118	64-156	+
		F1(CBAxC57Bl)	83-120		+
	BRP # 3	Balb/C	78-128		+
		F1(CBAxC57Bl)	79-127		+
2	3 nd IS	Balb/C	76-130		+
		F1(CBAxC57Bl)	71-139		+
	BRP # 3	Balb/C	76-134		+
		F1(CBAxC57Bl)	77-131		+
3	3 nd IS	Balb/C	70-145		+
		F1(CBAxC57Bl)	82-124		+
	BRP # 3	Balb/C	74-134		+
		F1(CBAxC57Bl)	79-128		+

Примечание: * – оценка на соответствие критерию приемлемости результатов по доверительному интервалу: + соответствие; – несоответствие

По формуле № 4 рассчитали полуширину доверительного интервала, результаты представлены на рисунке 25.

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 сходимости соответствуют установленному критерию приемлемости.

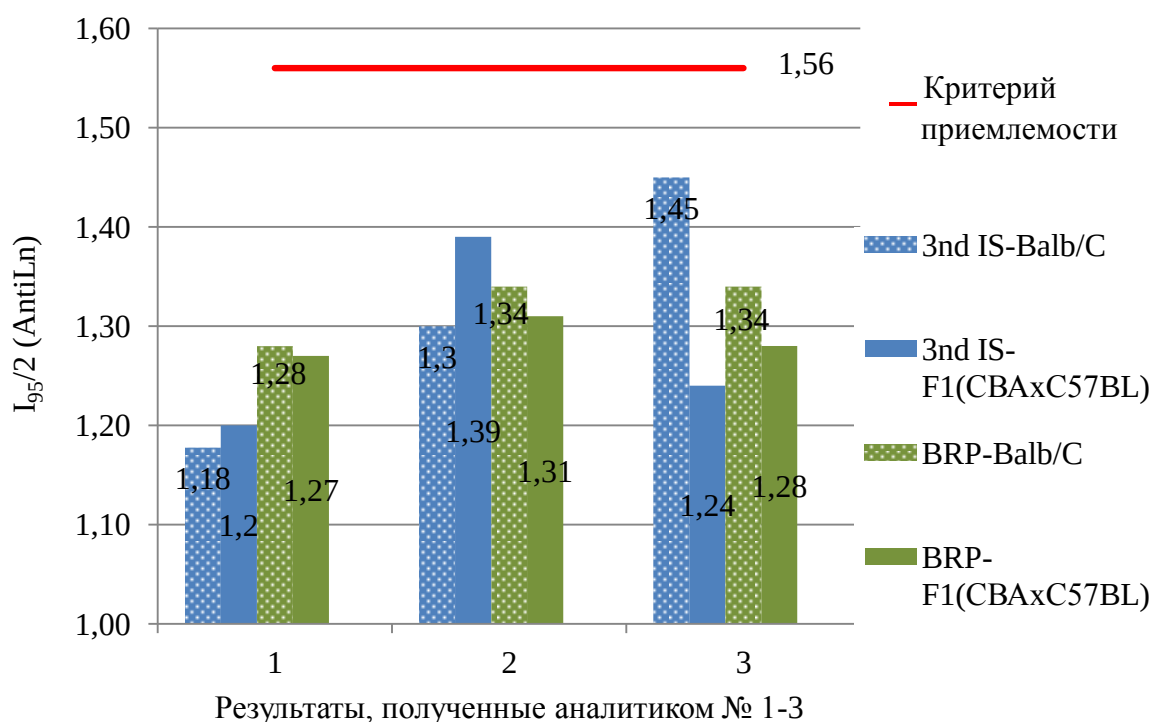


Рисунок 25 – Оценка прецизионности в условиях повторяемости

Прецизионность методики в условиях воспроизводимости

Прецизионность методики в условиях воспроизводимости оценивали по степени близости друг к другу независимых результатов определения специфической активности, полученных при аттестации СО в результате межлабораторных исследований с участием трех лабораторий. Каждая лаборатория провела по 6 испытаний: 4 на мышах линии Balb/C ($n=192$), и два – на мышах линии F1(CBAxC57BL) ($n=96$). Валидация методики проводилась с использованием кандидата в стандартный образец, поэтому требования к критерию приемлемости воспроизводимости увеличили в 3 раза по сравнению с требованиями ЕФ – антилогарифм полуширины доверительного интервала результатов, полученных не менее чем в трех лабораториях, не должен превышать $\sqrt[3]{1,25}=1,077 \approx 1,08$.

Результаты определения специфической активности относительно опорного значения, принятого за единицу, представлены на рисунке 26.

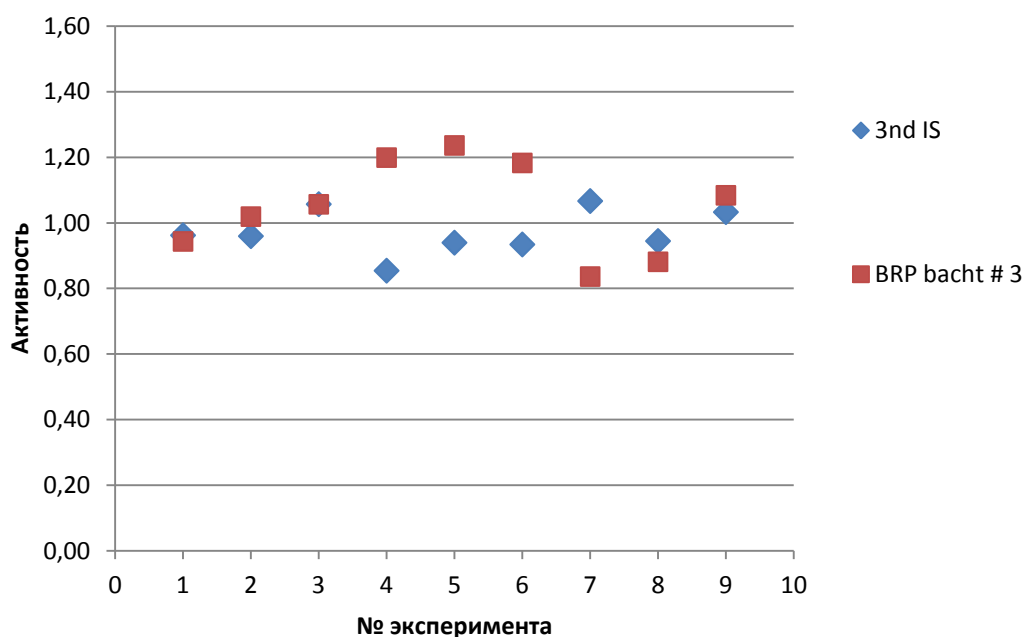


Рисунок 26 – Результаты определения специфической активности, полученные при аттестации ОСО

По результатам 18 определений рассчитали антилогарифм полуширины доверительного интервала, результаты представлены на рисунке 27.

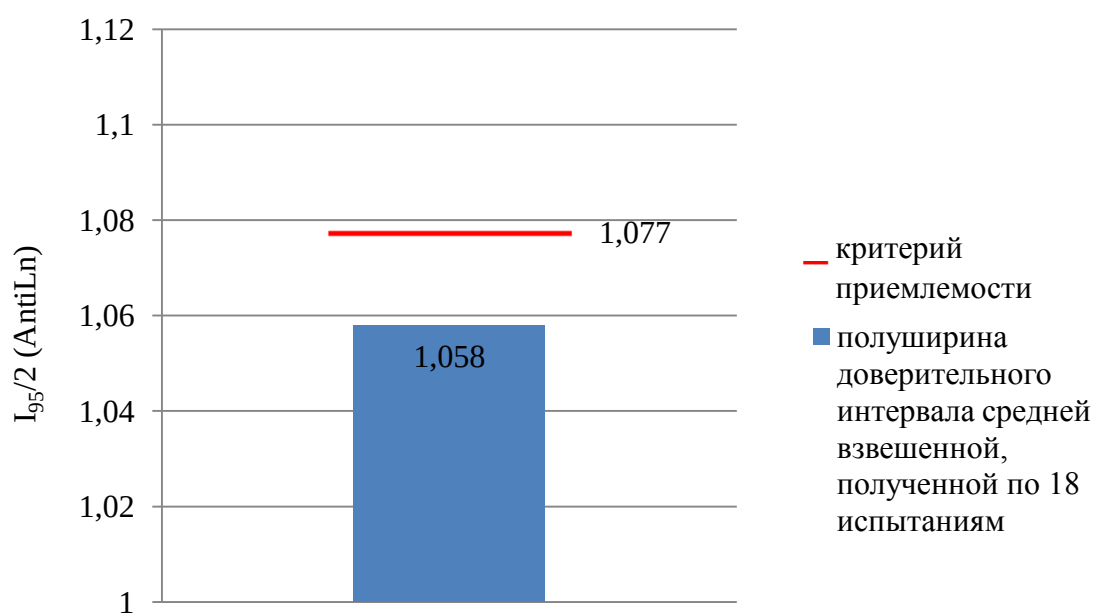


Рисунок 27 – Соответствие критерию приемлемости результатов по оценке прецизионности в условиях воспроизводимости

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 мышах линий Balb/C и F1(CBAxC57BL).

Результатом совершенствования методики и проведения ее валидации стало документальное оформление стандартизированной методики определения специфической активности эритропоэтина в виде двух ОФС: ««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.

ГЛАВА 5. Аттестация стандартного образца специфической активности эритропоэтина

5.1 Установление значений аттестуемой характеристики стандартного образца и ее доверительных интервалов

Аттестация кандидата в СО 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 Научного центра экспертизы средств медицинского применения (НЦЭСМП МЗ РФ). Все лаборатории-участницы регулярно проводят экспертизу на соответствие требованиям нормативной документации в рамках заданий Минздрава России, а также при обязательной сертификации. Испытания проводили биологическим методом *in vivo* по уровню стимуляции эритропоэза у нормоцитемических мышей линий *Balb/c* ($n=576$) и *F1(CBAxC57BL)* ($n=288$) с массой тела 18-24 г. Из общего количества ампул отобрали 18 штук. Каждая лаборатория выполнила 6 испытаний, три – относительно международного стандартного образца и три – относительно европейского стандартного образца. Испытание включало 3 уровня дозы по 8 повторов ($n=48$). Первичные данные проверяли на выбросы по тесту Граббса. В одной из лабораторий на уровне 80 МЕ/мл в стандартном и испытуемом образцах выявлено по одному выскакивающему значению, которые были исключены из общего массива данных. Специфическую активность рассчитывали методом параллельных линий. Необходимые критерии параллельности и линейности соблюдены при уровне $P=0,95$, таким образом, средние значения активности можно считать валидными. Результаты представлены в таблице 32.

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 $\chi^2_{\text{эксп}} = 13,326 < \chi^2_{\text{крит}} (95\%; df=17) = 27,587$, что свидетельствует об однородности,

полученных результатов. После чего рассчитали среднее взвешенное значение аттестованной характеристики СО, которое составило 2401 МЕ/амп. (коллегиально было принято решение округлить результат до 2400 МЕ/амп), доверительный интервал – от 94,5 до 105,8 %.

Таблица 32 – Результаты аттестации разработанного СО специфической активности эритропоэтина

Наименование лаборатории	№ испытания	СО относительно 3 rd IS		СО относительно BRP batch # 3	
		Активность, МЕ	Доверительный интервал (P=0,95), %	Активность, МЕ	Доверительный интервал (P=0,95), %
Лаборатория иммунологии	1	2311	85-118	2266	66-149
	2	2305	76-130	2448	79-128
	3	2539	83-120	2538	79-127
Лаборатория фармакологии	1	2052	84-119	2880	77-134
	2	2257	76-130	2969	76-137
	3	2244	71-139	2841	78-131
Лаборатория вирусных вакцин	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			

Характеристики качества аттестованного СО специфической активности эритропоэтина в сравнении с международным и Европейским стандартными образцами представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Сравнение разработанного СО с международным и Европейским стандартными образцами

Наименование	Значение показателя		
	3 rd IS	BRP # 4	Разработанный СО
Активность, МЕ	1650	13000	2400
Доверительный интервал, %	94,8-105,5	94,3-106,0	94,5-105,8

Аттестованное значение специфической активности разработанного СО сравнимо с активностью международного стандартного образца (1650 МЕ), и по сравнению с Европейским стандартным образцом (13000 МЕ) требует меньшего

разведения, обеспечивая меньшую ошибку и исключает излишние потери стандартного образца. Доверительный интервал активности не превышает таковой Европейского стандартного образца.

Разработанный СО специфической активности эритропоэтина был апробирован в исследованиях по оценке специфической активности зарегистрированных лекарственных препаратов рчЭПО (альфа и бета), произведенных ФГУП «ГосНИИ ОЧБ», ЗАО «ФармФирма «Сотекс», ООО «ЛЭНС-Фарм», ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», ЗАО «Биофарм». Результаты представлены в таблице 34.

Таблица 34 – Результаты определения специфической активности зарегистрированных лекарственных препаратов эритропоэтина при использовании разработанного стандартного образца

Производитель препарата	МНН	Специфическая активность, %		Доверительный интервал, %
		Паспортные данные	Результат	
1	α	118	112	81-123
2	α	98	92	79-126
3	β	104	110	66-152
4	β	101	86	78-128
5	β	105	116	66-153

Проведенные исследования показали, что разработанный СО позволяет получать сопоставимые результаты в разных лабораториях, что обеспечивает стандартность дозирования лекарственных препаратов эритропоэтина при их клиническом применении.

5.2 Обоснование срока годности и разработка документации на стандартный образец специфической активности эритропоэтина

Стабильность стандартного образца – одна из важнейших его характеристик, которая указывает на неизменность активности от даты выпуска до окончания срока годности. За более, чем 50 летнюю историю разработки стандартных образцов эритропоэтина накоплено достаточно данных по их стабильности при температуре от минус 20 °С и выше. Опыт изучения стабильности 2^{ого} международного стандартного образца эритропоэтина [134, 135]

показал его стабильность при температуре от плюс 4 до плюс 37 °С в течение 13,7 лет. Данный стандартный образец был использован в течение 24 лет с 1988 по 2012 гг. при температуре хранения минус 20 °С. В паспорте на международный стандартный образец рекомбинантного эритропоэтина человека в разделе стабильность приведена формулировка: «срок годности действителен до отзыва или замены стандартного образца».

Изучение стабильности разработанного СО специфической активности эритропоэтина проводили в долгосрочных испытаниях при температуре хранения минус 20 °С. Образцы подвергали исследованию по показателю специфическая активность каждые три месяца в течение первого года, а затем с периодичностью каждые 6 месяцев, результаты представлены на рисунке 28 (мониторинг изучения стабильности проводится и далее).

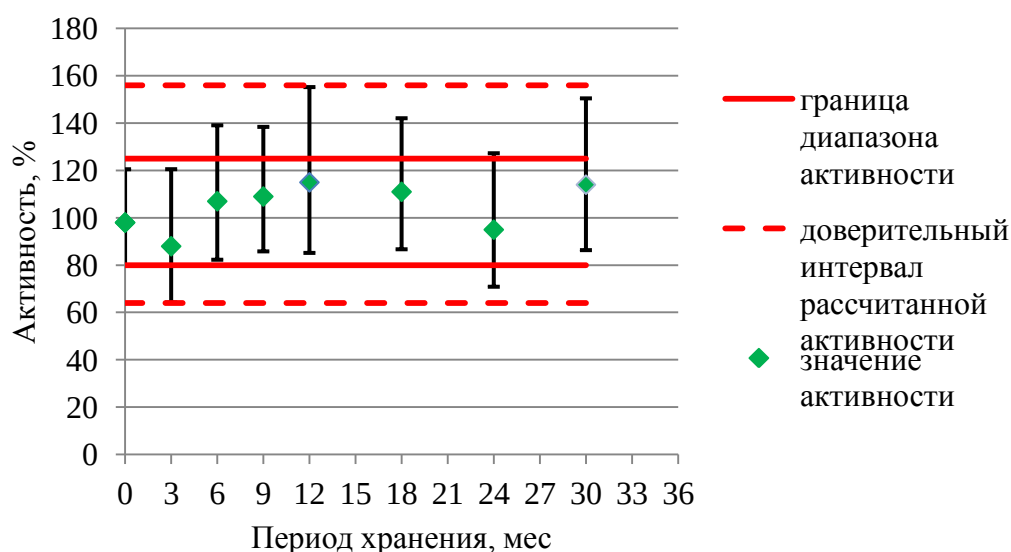


Рисунок 28 — Долгосрочные испытания по изучению стабильности разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина

В результате проведенных исследований активность и ее доверительные интервалы находятся в допустимом диапазоне.

Для подтверждения срока годности наряду с долгосрочными испытаниями стабильности проведены испытания методом «ускоренного старения». Образцы СО специфической активности, подверженные повышенным температурам,

сравнивали относительно образцов, хранящихся при температуре минус 20 °С, результаты представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Результаты изучения стабильности разработанного СО специфической активности эритропоетина методом «ускоренного старения»

Температура хранения, °С	Период хранения (дни)	Активность, %	Доверительный интервал, %
80±0,2	2*	--	--
	5**	--	--
50±0,2	1***	103	57 - 177
	7**	--	--
37±0,2	270	108	78 - 129
28±0,2	270	97	78 - 127
4±1,0	270	107	76 - 132
минус 20±1,0	270	109	80 - 127

Примечания: * - отсутствует линейность и параллельность;

** - изменение цвета и формы таблетки;

*** - доверительный интервал превышает допустимый диапазон

У образцов, хранившихся при температуре 50 и 80 °С, отмечали изменение цвета и формы таблетки, поэтому далее проводили испытания при температурах от 4 до 37 °С срок наблюдения 9 мес. Активность составила 108, 97, 107 и 109 % соответственно. Достоверных отличий активности образцов, хранившихся при положительных температурах от активности образцов, хранившихся при температуре минус 20 °С, не выявлено, что позволило перейти к следующему этапу определения срока годности.

Вычисление срока годности (С) провели в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0009.15 по формуле:

$$C=K \cdot C_{\text{э}}, \quad (6)$$

где: $C_{\text{э}}$ – срок годности при повышенной температуре

K – коэффициент соответствия, вычисляется по формуле:

$$K=A^{\frac{t_{\text{э}}-t_{\text{хр}}}{10}}, \quad (7)$$

где: A – температурный коэффициент скорости химической реакции принят равным 2,5;

$t_{\text{э}}$ – температура экспериментального хранения;

$t_{\text{хр}}$ – температура хранения

В результате проведенного расчета коэффициент соответствия при температуре 37 °С составил 185. Подставив полученный результат в формулу (7) получаем прогнозируемый срок годности разработанного СО, который при температуре хранения минус 20 °С составил 147 лет. Полученные результаты соответствует опыту изучения стабильности 2^{ого} международного стандартного образца эритропоэтина.

Результаты, полученные в долгосрочных исследованиях, а также с использованием методики ускоренного старения и опыта применения международного стандартного образца позволили установить срок годности разработанного СО 5 лет при температуре хранения минус 20 °С, с возможностью его продления по результатам мониторинга стабильности.

По результатам аттестации разработанного СО специфической активности эритропоэтина и установления его сроков годности разработан и зарегистрирован комплект документации на ОСО 42-28-437-2017: Паспорт, Инструкция на научно-техническую продукцию отраслевой стандартный образец специфической активности эритропоэтина, Макеты этикеток первичной и вторичной упаковки (Приложение 1-4). Разработанный комплект документации устанавливает порядок и условия применения СО специфической активности эритропоэтина, предназначенного для определения специфической активности эритропоэтина методом *in vivo*.

Результатом совершенствования методики и проведения ее валидации стало документальное оформление стандартизированной 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.

На основании стандартизации отечественной методики определения специфической активности препаратов эритропоэтина обоснованы нормативы для показателей специфической и удельной активности препаратов эритропоэтина, гармонизированные с ЕФ, и определена область применения методики. В результате стандартизации методики определения специфической активности препаратов эритропоэтина в РФ до более высокого европейского уровня, обоснована возможность распространения ее основных общих положений, нормативных требований и ограничений на отечественную методику в виде конкретизированного к условиям РФ текста ОФС 1.2.4.0017.18 «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина». Биологический метод определения специфической активности в условиях *in vivo* основан на способности эритропоэтина стимулировать эритропоэз у нормоцитемических мышей. Активность препарата сравнивают с активностью стандартного образца (СО) эритропоэтина и выражают в международных единицах (МЕ). Рассчитанная специфическая активность должна быть от 80 до 125 % от заявленной активности, доверительный интервал ($P=0,95$) в диапазоне от 64 до 156 %. Специфическую активность и доверительный интервал рассчитывают методом параллельных линий.

В качестве стандартного образца может быть использован международный стандартный образец эритропоэтина для количественного определения специфической активности, стандартный образец эритропоэтина Европейской Фармакопеи, ФСО/ОСО или стандартный образец предприятия специфической активности эритропоэтина, откалиброванные в Международных единицах (МЕ).

Важным для стандартизации является подготовка к испытаниям:

Испытания проводят с использованием мышей линий B6D2F1, F1(CBA*C57BL) или линии Balb/c весом от 18-24 г. Использование беспородных мышей не позволяет получить необходимую точность результатов испытания.

Мышей предварительно взвешивают, если совокупность экспериментальных объектов однородна (разница не более $\pm 0,5$ г), их распределение в группы проводят случайным образом, животных распределяют в 6 клеток, по 8 особей в каждую. Если разница более $\pm 0,5$ г, но не более ± 2 г, животных вначале распределяют на группы с колебаниями массы тела не более $\pm 0,5$ г, помещая каждую группу в отдельную клетку. Затем из каждой весовой группы по одному животному помещают в одну из 6 клеток (по количеству вводимых растворов), пока в клетке не будет 8 особей. Животным в каждой из 6 клеток наносят определенную метку (пикриновой кислотой или выстриганием шерсти) в зависимости от дозы (Таблица 36).

Таблица 36 – Пример нанесения метки (идентификации) животных

Наименование образца	Доза, МЕ/мл	Количество мышей	Место нанесения метки
Стандартный образец	80	8	Хвост
	40	8	Спина
	20	8	Голова
Испытуемый образец	80	8	Задняя нога
	40	8	Бок
	20	8	Передняя нога

Приготовление разведений стандартных и испытуемых образцов проводят в соответствии со следующей процедурой или в соответствии с указаниями, приведенными в нормативной документации.

Готовят три разведения стандартных и испытуемых образцов 80, 40 и 20 МЕ.

Испытуемый раствор (a). Испытуемый препарат разводят фосфатно-альбуминовым забуференным физиологическим раствором pH 7,2 до концентрации 80 МЕ/мл (ориентируясь на данные, указанные в сертификате анализа).

Испытуемый раствор (b). Смешивают равные объемы испытуемого раствора (a) и фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора pH 7,2.

Испытуемый раствор (c). Смешивают равные объемы испытуемого раствора (b) и фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора pH 7,2.

Стандартный раствор (a). Стандартный образец эритропоэтина восстанавливают в соответствии с инструкцией по применению, разводят в фосфатно-альбуминовом забуференном физиологическом растворе pH 7,2 до получения концентрации 80 МЕ/мл.

Стандартный раствор (b). Смешивают равные объемы стандартного раствора (a) и фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора pH 7,2.

Стандартный раствор (c). Смешивают равные объемы стандартного раствора (b) и фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора pH 7,2.

При проведении испытания необходимо соблюдать правила и условия:

Каждому животному в одной из 6 клеток подкожно вводят по 0,5 мл одной дозы (одно из разведений испытуемого препарата или стандартного образца). Затем с целью рандомизации животных распределяют в 8 новых клеток по одному животному с определенной дозой. Таким образом, в каждой клетке должны содержаться мыши, получившие все шесть растворов (3 испытуемых и 3 стандартных).

Отбор крови у лабораторных животных

Через 96 ч после введения препаратов у животных из ретроорбитального синуса отбирают образцы крови (200-300 мкл) в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой дикалиевой или трикалиевой соли и определяют количество ретикулоцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Учет результатов испытания с помощью проточного цитофлуориметра

Образцы крови окрашивают флуоресцентным красителем, например, 5 мкМ раствором акридинового оранжевого, в соотношении 1/500 (1000 мкл 5 мкМ раствора акридинового оранжевого и 2 мкл отобранной крови). Пробирки помещают в проточный цитофлуориметр и проводят подсчет ретикулоцитов.

Примечания

Приготовление 0,001 М раствора акридинового оранжевого (флуоресцентный краситель). 3,7 мг акридинового оранжевого вносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида, доводят

объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 мес.

Приготовление 5 мкМ раствора акридинового оранжевого (флуоресцентный краситель). 0,5 мл 0,001 М раствора акридинового оранжевого вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки 0,9 % раствором натрия хлорида и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным, непосредственно перед использованием.

Процедура разведения образцов, используемые дозы и флуоресцентный краситель могут быть изменены, о чем должно быть указано в нормативной документации.

В ОФС 1.7.1.0016.18 «Эритропоэтины» на основании результатов исследований оформлены разделы **специфическая активность** и **удельная активность**:

Настоящая ОФС распространяется на эритропоэтины (эпоэтины), представляющие собой гликопротеин с аминокислотной последовательностью, включающей 165 аминокислот и углеводные цепи, присоединённые в участках гликозилирования с образованием трёх N-связей и одной O-связи, с прикреплением сиаловых кислот в терминальных отделах углеводородных цепочек. Сайты N-гликозилирования: asn (24), asn (38), asn (83); сайт O-гликозилирования: thr (134). Трёхмерная структура сформирована за счёт двух дисульфидных связей между цистеинами в положении 7-161 и 29-33, которые необходимы для проявления биологической активности. Углеводная часть составляет 40–50 % массы молекулы гликопротеина, из которых около 17 % приходится на сиаловые кислоты. Аминокислотная последовательность эпоэтина идентична эндогенному человеческому эритропоэтину, продуцируемому клетками почек человека и различается профилем гликозилирования (α , β и др.).

Настоящая ОФС включает требования к эритропоэтинам, полученным с использованием технологии рекомбинантной ДНК с применением в качестве экспрессионной системы клеток млекопитающих.

Требования, приведенные в настоящей фармакопейной статье, могут быть дополнены с учетом специфических свойств лекарственного средства и технологии его производства.

Данная ОФС не распространяется на эритропоэтины с изменённой аминокислотной последовательностью (дарбэпоэтин) и модифицированные эритропоэтины (пегилированные эритропоэтины).

Специфическая активность. Содержание активного вещества должно составлять не менее 80 % и не более 125 % от заявленного содержания. Доверительные интервалы ($P = 0,95$) рассчитанной активности должны быть не ниже 64 % и не более 156 % от заявленной величины.

Определение специфической активности проводят биологическим методом *in vivo*, оценивая стимуляцию продукции ретикулоцитов у нормоцитемических мышей. Активность субстанции сравнивают с активностью фармакопейного стандартного образца эритропоэтина BRP и выражают в международных единицах (МЕ). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности эритропоэтина».

Удельная активность. Расчетная величина, вычисляется по формуле, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

Должна быть не менее 100000 МЕ/мг. Удельная активность является расчетной величиной, она равна отношению специфической активности в МЕ/мл на содержание белка эритропоэтина в мг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненного исследования проведен научный анализ и обобщение особенностей структуры, свойств и механизма действия эритропоэтина, проблемы современного состояния стандартизации препаратов рекомбинантного эритропоэтина, методики определения специфической активности и достижений в области разработки стандартных образцов рчЭПО и технологии их получения. Несмотря на более, чем вековую историю изучения эритропоэтина, ежегодно публикуется более 800 статей, посвященных изучению новых биологических свойств эритропоэтина, отличных от стимуляции гемопоеза, и разработке лекарственных препаратов эритропоэтина новых поколений, что указывает на интерес к данной теме и ее актуальность. Теоретический анализ структуры, функции и механизма действия рекомбинантного эритропоэтина, опыт стандартизации в Европе и РФ позволяет заключить, что рекомбинантный эритропоэтин человека представляет собой смесь изоформ с различной биологической активностью, процентное соотношение которых в конечном итоге определяет фармакологическую (специфическую) активность, фармакокинетику, фармакодинамику и терапевтическую эффективность лекарственного средства. Множественность и разнонаправленность активности эритропоэтина (стимуляция эритропоеза и неоангиогенеза, блокирование апоптоза) в целом повышают эритропоез и патогенетически устраняют анемический синдром в организме, уменьшая потребность в гемотрансфузиях, снижая инфекционную заболеваемость и повышая качество жизни. Поэтому, несмотря на плейотропность эффектов эритропоэтина препараты рчЭПО контролируются по способности стимулировать эритропоез, по которой дозируются и применяются.

Лекарственные препараты рекомбинантного эритропоэтина человека являются обязательным элементом патогенетической терапии заболеваний и патологических состояний сопровождающихся развитием анемии. У больных с анемией при хронической почечной недостаточности лекарственные препараты эритропоэтина применяются практически пожизненно. Одним из основных

показателей качества, эффективности и безопасности лекарственных препаратов рчЭПО служит специфическая активность, точность результатов определения которой зависит от качества стандартных образцов, а именно от правильности и прецизионности результатов, полученных при их разработке.

Специфическую активность эритропоэтина согласно ведущим фармакопеям мира определяют по стимуляции гемопоэза у полицитемических и нормоцитемических мышей относительно стандартного образца и выражают в международных единицах. В РФ отечественный стандартный образец эритропоэтина отсутствует с 2009 г. Для оценки качества препаратов отечественные производители применяют стандартный образец эритропоэтина Европейской фармакопеи или откалиброванные по международному и европейскому стандартам стандартные образцы предприятия. Импорт зарубежных стандартных образцов ставит российских производителей в зависимость от владельцев данных препаратов и курса валюты, что увеличивает себестоимость производства препаратов эритропоэтина. Поэтому для государственного мониторинга обращения препаратов рчЭПО необходим отечественный стандартный образец, гармонизированный с требованиями ЕФ и рекомендациями ВОЗ.

В качестве кандидатов в СО специфической активности эритропоэтина рассмотрены две субстанции российских производителей: Рэпоэтин-СП (эпоэтин альфа) и Эритропоэтин человека рекомбинантный (эпоэтин бета). По показателям качества и результатам дополнительного контроля (содержание белка, подлинность методом капиллярного зонного электрофореза – процентное соотношение 8 изоформ, специфическая активность, удельная активность), основываясь на рекомендациях ВОЗ к стандартным образцам в качестве материала для СО выбрана отечественная субстанция Рэпоэтин-СП, МНН - Эпоэтин альфа, ФСП Р № 003458/01-050609, серия № 1320914. Субстанция Рэпоэтин-СП фармакокинетически и фармакодинамически сопоставима с препаратами, зарегистрированными в РФ.

В результате проведенных теоретических и экспериментальных

исследований разработана технология получения лиофилизированного отечественного стандартного образца, обеспечивающего адекватный государственный мониторинг качества Российских и зарубежных препаратов при их обращении и проведена стандартизация по основному показателю качества – специфической активности, определяющему эффективное и безопасное дозирование. На основе обобщения опыта приготовления международного и европейского стандартных образцов оптимизирован состав стабилизирующего буфера применительно к отечественному сырью, подобрана оптимальная концентрация трегалозы – 4 %, благодаря чему обеспечивается макроструктура лиофилизата и обоснован объем наполнения ампул. Усовершенствованы условия лиофильного высушивания применительно к задачам стандартного образца. По оптимальным эвтектическим параметрам обоснован режим лиофилизации. Определена продолжительность завершающего этапа досушивания, обеспечивающего остаточную влажность в диапазоне $1,5 \pm 0,5$ %.

Для приготовления лиофилизированной формы СО разработана технологическая схема, состоящая из следующих стадий: прием и входной контроль субстанции Рэпоэтин-СП (экспертиза паспорта на соответствие требованиям нормативной документации и проведение испытаний по показателям подлинность, содержание белка и специфическая активность); приготовление материала для СО – разведение фармацевтической субстанции стабилизирующим буфером, состав которого оптимизирован в отношении трегалозы, тщательное перемешивание и розлив полученного раствора в ампулы из боросиликатного стекла вместимостью 1 мл, контроль однородности дозирования; лиофилизация СО в отработанных условиях, запайка ампул под вакуумом; контроль и изучение свойств (контроль качества запаивания, испытания на однородность дозирования, массы содержимого, потеря в массе при высушивании, подтверждение подлинности); аттестация СО и оформление документации (установление значения аттестуемой характеристики СО – специфической активности и ее доверительного интервала, исследование стабильности); маркировка, упаковка и хранение. В результате получено 250 ампул СО, каждая ампула содержит:

рекомбинантный Эпоэтин альфа человека – 18,7 мкг, бычий сывороточный альбумин – 0,1 мг, трегалоза – 2 мг и натрия хлорид – 0,06 мг.

В результате проведенных экспериментальных исследований усовершенствован и стандартизован биологический метод определения специфической активности препаратов рекомбинантного эритропоэтина в РФ, который с помощью разработанного СО, гармонизированного с международным и европейским стандартами рчЭПО, воспроизводит основные элементы клинического применения препаратов и соответствует методическому принципу их стандартизации.

При совершенствовании методики определения специфической активности эритропоэтина экспериментальные результаты, полученные на мышах линий B6D2F1, Balb/c и F1 (CBA^xC57BL), соответствуют допустимым интервалам, установленным требованиями ЕФ. Результаты, полученные на беспородных мышах, не соответствуют требованиям ЕФ по величине специфической активности и ее доверительному интервалу. Линия мышей Balb/c наиболее удобна и предпочтительна для рандомизации испытаний.

Показано, что в отличие от световой микроскопии регистрация эритропоэза на проточном цитометре наиболее стандартна, обеспечивает необходимую точность и гармонизацию метода с требованиями ЕФ и международными рекомендациями. Результаты, полученные методом проточной цитометрии, отличаются большей воспроизводимостью в сравнении с микроскопией. Большая дисперсия результатов, полученных при использовании световой иммерсионной микроскопии, связана с недостаточным количеством подсчитываемых клеток из-за высокой трудоемкости метода. Предположение сделано на основании анализа зависимости стандартного отклонения от количества подсчитанных клеток при использовании проточного цитометра. Обратная зависимость дисперсии от количества подсчитанных клеток на проточном цитометре свидетельствует о возможности повышения прецизионности метода световой иммерсионной микроскопии путем увеличения общего числа подсчитываемых клеток.

Установлено, что результаты обоих способов подсчета ретикулоцитовотягощены систематической ошибкой. Однако, результаты, полученные проточной цитометрией, обладают большей точностью по сравнению с результатами, полученными световой иммерсионной микроскопией. Методика определения специфической активности препаратов эритропоэтинов с использованием проточной цитометрии соответствует требованиям ЕФ по характеристикам точности (правильности и прецизионности). При отсутствии проточного цитометра использование менее точной световой микроскопии требует отработки оптимальных условий (установление валидационных характеристик, обоснованием дизайна методики и определением достаточного количества подсчитываемых клеток), что позволит соответствовать требованиям ЕФ как по величине рассчитанной активности, так и по доверительному интервалу полученных результатов.

В результате стандартизации и гармонизации методики определения специфической активности эритропоэтина изучена пригодность мышей разных линий и способов подсчета ретикулоцитов, теоретически и экспериментально обоснован формат методики, ограниченный тремя уровнями доз, и статистическая обработка результатов методом параллельных линий. Показана необходимость расчета доверительного интервала результата определения специфической активности для гармонизации методики с требованиями ЕФ.

Проведена валидация усовершенствованной методики определения специфической активности эритропоэтина, в результате которой были использованы новые подходы. Общепринятый подход к оценке прецизионности по стандартному отклонению для биологической методики схема, которой предполагает определение на трех уровнях в каждом 8 параллельных испытаний в сравнении со стандартным образцом не позволяет провести оценку с учетом на разных уровнях. Поэтому в качестве меры прецизионности мы предложили использовать антилогарифм полуширины доверительного интервала, который характеризует степень разброса полученных результатов. По результатам валидации установили, что рабочие характеристики процедуры и лежащий в ее

основе метод отвечают установленным требованиям, что позволило признать усовершенствованную нами методику пригодной для определения специфической активности эритропоэтина с использованием мышей линий Balb/C и F1(CBAxС57BL), и разработанного стандартного образца. Достигнутый уровень стандартизации свидетельствует о гармонизации усовершенствованной методики с требованиями ЕФ, обоснованности ее нормативов, предложенных методических подходов и критериев оценки валидационных характеристик методики определения специфической активности рчЭПО. Результатом совершенствования методики и проведения ее валидации было документальное оформление стандартизованной методики определения специфической активности эритропоэтина. На основании изучения факторов робастности методики и проведения ее валидации разработаны две ОФС: «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 лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина с использованием нормоцитемических мышей (включены в ГФ РФ XIV, введенную в действие приказом Минздрава России от 30.10.2018). Достигнутый уровень стандартизации свидетельствует о гармонизации усовершенствованной методики с требованиями ЕФ и обоснованности введения нормативов по показателю «Специфическая активность».

На основании стандартизации отечественной методики определения специфической активности препаратов эритропоэтина обоснованы нормативы для показателей специфической и удельной активности препаратов эритропоэтина, гармонизированные с ЕФ, и определена область применения методики. В результате стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина в РФ до более высокого европейского уровня, обоснована возможность распространения ее основных общих положений, нормативных требований и ограничений на отечественную методику в виде

конкретизированного к условиям РФ текста ОФС «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина».

Аттестация СО специфической активности эритропоэтина проведена в трех лабораториях федерального Научного центра экспертизы средств медицинского применения (НЦЭСМП МЗ РФ). Результаты всех лабораторий после проверки на однородность объединили и рассчитали значение аттестованной характеристики СО как среднее взвешенное значение специфической активности. В соответствии с требованиями ЕФ проверку на однородность объединяемых значений провели с помощью критерия Хи-квадрат. По результатам межлабораторных исследований аттестован лиофилизированный СО специфической активности эритропоэтина (ОСО 42-28-437-2017): значение специфической активности составило 2400 МЕ/амп., установленный доверительный интервал (94,5-105,8 %). Специфическая активность разработанного СО сравнима с активностью международного стандартного образца (1650 МЕ), и требует меньшего разведения по сравнению с Европейским стандартным образцом (13000 МЕ), обеспечивая меньшую ошибку и исключая излишние потери.

Полученный СО специфической активности эритропоэтина аттестован по результатам межлабораторных испытаний и гармонизирован по действующим международному и европейскому стандартам, как по специфической активности, так и по впервые введенному в РФ показателю – доверительному интервалу рассчитанной активности. Отечественный СО по доверительному интервалу сопоставим с международным и европейским стандартными образцами (94,8-105,5 % и 94,3-106,0 % соответственно).

Стабильность разработанного СО специфической активности эритропоэтина изучали в режиме реального времени. Образцы исследовали каждые три месяца в течение первого года и каждые 6 месяцев в течение второго года. В результате проведенных исследований установлено, что активность и ее доверительные интервалы находятся в допустимом диапазоне. Наряду с долгосрочными испытаниями стабильности провели испытания методом «ускоренного старения» в соответствии с ОФС.1.1.0009.15 при температурах от

минус 20 °С до +37 °С в течение 9 мес. (срок наблюдения). Образцы СО специфической активности, подверженные повышенным температурам, сравнивали относительно образцов, хранящихся при минус 20 °С. В результате проведенных исследований достоверных отличий активности образцов, хранившихся при положительных температурах, от активности образцов, хранившихся при температуре минус 20 °С, не выявлено. Прогнозируемый срок годности разработанного СО при температуре хранения минус 20 °С составил более 20 лет. Полученные результаты, позволили установить срок годности приготовленного СО 5 лет при температуре хранения минус 20 °С и возможностью его продления по результатам мониторинга стабильности.

Разработанный ОСО 42-28-437-2017 специфической активности эритропоэтина использован в качестве стандартного образца при оценке качества зарегистрированных лекарственных препаратов рчЭПО (альфа и бета), произведенных ФГУП «ГосНИИ ОЧБ», ООО «ЛЭНС-Фарм», ЗАО «ФармФирма «Сотекс», ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», ЗАО «Биннофарм». Полученные результаты сопоставимы с паспортными данными, а доверительный интервал рассчитанной активности при ($P=0,95$) соответствуют требованиям ЕФ. Применение ОСО 42-28-437-2017 специфической активности эритропоэтина позволяет получать сопоставимые результаты при оценке препаратов различных производителей в разных лабораториях, что обеспечивает стандартность дозирования лекарственных препаратов эритропоэтина при их клиническом применении.

На зарегистрированный отечественный ОСО 42-28-437-2017 разработан комплект документации (паспорт, «Инструкция на научно-техническую продукцию отраслевой стандартный образец специфической активности эритропоэтина», макет первичной и вторичной упаковок). Разработанный комплект документации устанавливает порядок и условия применения СО специфической активности эритропоэтина, предназначенного для определения специфической активности эритропоэтина методом *in vivo*.

Важным требованием к регламентированному обращению препаратов рчЭПО на территории РФ в сложившихся условиях появления новых препаратов второго и третьего поколений рчЭПО, а также наличия 50 % зарубежных среди зарегистрированных в РФ препаратов рчЭПО является их стандартизация и гармонизация с международными требованиями.

Отсутствие в Государственной фармакопее РФ ОФС, которая регламентирует определение специфической активности эритропоэтина, привело к ряду различий в методике у отечественных производителей. Разработка ОФС и ее гармонизация с ЕФ позволит контролировать основное качество препаратов в соответствии с международными требованиями, обеспечит эффективность и повысит безопасность при их клиническом применении.

Таким образом, на основании обобщенного анализа публикаций и проведенных теоретических и экспериментальных исследований по стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина получены результаты и сделаны выводы, практически важные для обеспечения гармонизированного обращения в РФ лекарственных препаратов рчЭПО.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина, 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 эритропоэтина. Обоснован диапазон применения методики, вид и количество используемых в испытании животных (по 8 мышей линии Balb/C или F1(CBAxC57BL) для каждого уровня), введен критерий приемлемости результатов – доверительный интервал рассчитанной активности.

3. Результаты валидации усовершенствованной методики подтверждают ее пригодность для определения специфической активности эритропоэтина 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 рчЭПО 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 рчЭПО отличной 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 СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ЕФ – Европейская фармакопея;

ИФА – иммуноферментный анализ;

МЕ – международная единица;

МНН – международное непатентованное название;

СО – стандартный образец;

ОФС – общая фармакопейная статья;

рчЭПО – рекомбинантный эритропоэтин человека;

BRP (Biological Reference Preparation) – биологический референс-препарат (стандартный образец эритропоэтина Европейской фармакопеи);

CD – кластер дифференцировки;

EPOR – рецептор эритропоэтина;

IS – международный стандартный образец;

I₉₅ – доверительный интервал рассчитанной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабичева, Л.Г. Лечение анемии в онкологии: роль нового стимулятора эритропоэза Аранесп (дарбэпоэтин альфа) / Л.Г. Бабичева, И.В. Поддубная // Современная онкология. – 2007. – № 9 (3). – С. 69–74.
2. Бондарев, В.П. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов / В.П. Бондарев, И.В. Борисевич, Р.А. Волкова, Фадейкина О.В. // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. – № 2 – С. 28-32.
3. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] URL: <http://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 17.10.2018).
4. Государственный стандарт РФ ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3 Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. – М.: Стандартиформ, 2002. – 39 с.
5. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. 11-е изд. Общие методы анализа / МЗ СССР. – М.: Медицина. –1987. – 336 с., ил.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд., в 3-х т., М.: Медицина. – 2015.
7. Ермоленко, В.М. Уремия и эритропоэтин / В.М. Ермоленко, М.А. Иващенко. – М. – 2000.– С. 104.
8. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Рекормон ПН 014262/02-140314.
9. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Мирцера ЛСР-002182/08-171016.
10. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Аранесп ЛСР-001710/07-260514.
11. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Аэприн ЛСР-006430/10-30014.

12. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Бинокрит ЛП 001466-211014.

13. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Эпокрин РN003686/01 от 29.05.2009.

14. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Эпоратио ЛП-003157-310815.

15. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Эпостим ЛСР-002490/07 от 28.08.2007.

16. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Эпрекс ЛС-002439-070616.

17. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Эральфон ЛСР-006663/08.

18. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Эритропоэтин ЛС-001854-101014.

19. Кетлинский, С.А. Цитокины. / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев // СПб.: ООО «Издательство Фолиант». – 2008. – 552с.

20. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. – М.: Стандартиформ, 2016. – 12 с.

21. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. – М.: Стандартиформ, 2016. – 9 с.

22. Милованов, Ю.С. Анемия у больных с хронической почечной недостаточностью: принципы терапии / Ю.С. Милованов, Л.В. Козловская, А.Ю. Николаев, В. В. Фомин, Л. Ю. Милованова // Лечащий врач. – 2005. – № 10. – С. 18–24.

23. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. Стандартные образцы для проведения доклинических

исследований иммунобиологических лекарственных препаратов / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, В.Г. Петухов // М.: Гриф и К. – 2013. – С. 323-333.

24. Петухов, В.Г. Определение срока годности стандартных образцов ускоренным методом / В.Г. Петухов // Биопрепараты. – 2006. – № 4 (24). – С. 5-8.

25. Распоряжение Правительства РФ от 23.10.2017 N 2323-р. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2018 год, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи.

26. Супотницкий, М.В. Стандартные образцы иммунобиологических лекарственных препаратов как объекты интеллектуальной собственности / М.В. Супотницкий, А.Н. Миронов, А.А. Елапов, Фадейкина О.В. // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2013. – № 3. – С. 36-39.

27. Федеральный закон N 61-ФЗ от 12.04.2010 г. «Об обращении лекарственных средств».

28. Федеральный закон N 429-ФЗ от 22.12.2014 (ред. от 13.07.2015) "О внесении изменений в Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств".

29. Шило, В.Ю. Анемия при хронической болезни почек: патогенез, диагностика и лечение / В.Ю. Шило, Н.Н. Хасабов, В.М. Ермоленко // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 28-35.

30. Шило, В.Ю. Рекормон (эпоэтин-бета) в лечении анемии у больных, находящихся на программном диализе / В.Ю. Шило, А.Ю. Денисов // Врач. – 2005. – № 2. – С. 37-40.

31. [Электронный ресурс] // Wikimedia [сайт]. URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Erythropoietin#/media/File:EPO.png> (дата обращения 18.10.2018).

32. Achord, D.T. Human f3-Glucuronidase: In Vivo clearance and In Vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells / D.T. Achord, F.E. Brot, C.E. Bell, W.S. Sly. // Cell. – 1978. – N 15. – P. 269-278.
33. Ahmad, R. Recombinant erythropoietin for the anemia of chronic renal failure / R. Ahmad, M. Hand // N. Engl. J. Med. – 1987. – 317. – P. 169-170.
34. Akimoto, T. Erythropoietin regulates vascular smooth muscle cell apoptosis by a phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway / T. Akimoto, E. Kusano, T. Inaba, O. Iimura, H. Takahashi, H. Ikeda, C. Ito, Y. Ando, K. Ozawa, Y. Asano // Kidney Int. – 2000. – N 58. – V. 1. – P. 269-282.
35. Akimoto, T. Involvement of erythropoietin-induced cytosolic free calcium mobilization in activation of mitogen-activated protein kinase and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells / T. Akimoto, E. Kusano, C. Ito, S. Yanagiba, M. Inoue, M. Amemiya, Y. Ando, Y. Asano. // J. Hypertens. – 2001. – N 19. – V. 2. – P. 193-202.
36. Anagnostou, A. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells / A. Anagnostou, E.S. Lee, N. Kessimian, R. Levinson, M. Steiner // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1990. – N 87. – V. (15). – P. 5978-5982.
37. Anagnostou, A. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells / A. Anagnostou, Z. Liu, M. Steiner, K. Chin, E.S. Lee, N. Kessimian, C.T. Noguchi // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1994. – N 91. – V. 9. – P. 3974-3978.
38. Annable, L. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay / L. Annable, P.M. Cotes, M.V. Mussett // Bull .World Health. Organ. – 1972. – N 47 (1). – P. 99-112.
39. Annual report 2014 / European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare EDQM // Strasbourg/ – 2015. – 53 p.
40. Ammarguella, F. Low doses of EPO activate MAP kinases but not JAK 2-STAT 5 in rat vascular smooth muscle cells / F. Ammarguella, M. Llovera, P.A. Kelly, V. Goffin // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – N 284. – V. 4. – P. 1031-1038.
41. Babitt, J.L. Mechanisms of Anemia in CKD / J.L. Babitt, H.Y. Lin // J. Am. Soc. Nephrol. – 2012. – N 23. – P. 1631-1634.

42. Bahlmann, F.H. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells / F.H. Bahlmann, K. De Groot, J.M. Spandau, A.L. Landry, B. Hertel, T. Duckert, S.M. Boehm, J. Menne, H. Haller, D. Fliser // *Blood*. – 2004. – N 103. – V. 3. – P. 921-926.
43. Bastos, K. C.E.R.A. maintains stable hemoglobin in Latin American patients on dialysis / K. Bastos, L.A. Lucarelli, E. De Francesco-Daher, R.P. Filho, C. Henriquez, B. Espinoza, I. Villanueva, E. Schwedt, R. Schiavelli, R. Correa-Rotter // *Int. Urol. Nephrol.* – 2013. – V. 45. – P. 1355-1364.
44. Bazan J.F. Haemopoietic receptors and helical cytokines // *Immunol. Today*. – 1990. – N 11 (10). – P. 350-354.
45. Baynes, J.W. Effect of glycosylation on the in vivo circulating half-life of ribonuclease / J.W. Baynes, F. Wold // *J. Biol. Chem.* – 1976. – N 251. – P. 6016-6024.
46. Brines, M. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system /M. Brines, A. Cerami // *Nature Rev. Neurosci.* – 2005. – V. 6. – P. 484-494.
47. Bristow, A.F. Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin /A.F. Bristow // *Pharmeuropa Bio.* –1996. – N 97 (2). – P. 31 – 48.
48. Broxmeyer, H.E. Erythropoietin multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration / H.E. Broxmeyer // *J. Exp. Med.* – 2013. – N 210. – V. 2. – P. 205-208.
49. Bruik, R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor / R.K. Bruik // *Genes. Dev.* – 2003. – V. 17. – P. 2614-2623.
- 50 Casati, S. Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having haemodialysis / S. Casati, P. Passerini, M.R. Campise // *Br. Med. J.* – 1987. – N 295 (6605). – P. 1017-1020.
51. Chronic Kidney Disease [Электронный ресурс] // URL: www.worldkidneyday.org/faqs/chronic-kidney-disease/ (дата обращения: 04.05.2018).

52. Cody, J.D. Recombinant human erythropoietin versus placebo or no treatment for the anaemia of chronic kidney disease in people not requiring dialysis/ J.D. Cody, E.M. Hodson // Cochrane Database Syst. Rev. – 2016. – N. 1. – CD003266.

53. Cotes, P.M. The International Reference Preparation of Erythropoietin / P.M. Cotes, D.R. Bangham // Bull. World Health Organ. – 1966. – N 35 (5). – P. 751–760.

54. Davis, J.M. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells / J.M. Davis, T. Arakawa, T.W. Strickland, D.A. Yphantis // Biochemistry. – 1987. – N 26 (9). – P. 2633-2638.

55. De Luisi, A. Erythropoietin is involved in the angiogenic potential of bone marrow macrophages in multiple myeloma / A. De Luisi, L. Binetti, R. Ria, S. Ruggieri, S. Berardi, I. Catacchio, V. Racanelli, V. Pavone, B. Rossini, A. Vacca, D. Ribatti // Angiogenesis. – 2013. – V. 16. – P. 963-973.

56. Dordal, M.S. The role of carbohydrate in erythropoietin action / M.S. Dordal, F.F. Wang, E. Goldwasser // Endocrinology. – 1985. – V.116. – P. 2293-2299.

57. Egrie, J.K. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) / J.K. Egrie, J.K. Brawne // Br. J. Cancer. – 2001. – V. 84. – P. 3-10.

58. Eggold, J.T. Erythropoiesis, EPO, macrophages, and bone / J.T. Eggold, E.B. Rankin // Bone. – 2018. – S8756-3282(18). – P. 30121-30122.

59. Elliott, S. Erythropoietins: a common mechanism of action / S. Elliott, E. Pham, I.C. Macdougall // Exp. Hematol. – 2008. – N 36 (12). – P. 1573-1584.

60. Erythropoietin bioassays <124> / USP 40-NF 35 2 S. – 2017. – P. 213-214.

61. «Erythropoietin Concentrated Solution» 01/2008:1316 European Pharmacopoeia 8.0. – 2013. – V. 2. – P. 2162-2166.

62. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes Strasbourg, 18. III. 1986. – 11 p.

63. Falck, D. Affinity purification of erythropoietin from cell culture supernatant combined with MALDI-TOF-MS analysis of erythropoietin N-glycosylation / D. Falck,

M. Habberger, R. Plomp, M. Hook, P. Bulau, M. Wuhler, D. Reusch // Sci Rep. – 2017. – V. 7. – P. 5324-5335.

64. Fandrey, J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression / J. Fandrey // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2004. – V. 286 (6). – R 977-988.

65. Fernando, G. Neuroprotective Effects of neuroEPO Using an In Vitro Model of Stroke / G. Fernando, R. Yamila, G.J. Cesar, R. Ramón // Behav. Sci. – 2018. – V. 8(2). – P. 26-36.

66. Franco, R.C. The measurement and importance of red cell survival / R.C. Franco // Am. J. Hematol. – 2009. – V. 84 (2). – P 109-114.

67. Goh, J.B. Impact of host cell line choice on glycan profile / J.B. Goh, S.K. Ng // Crit. Rev. Biotechnol. – 2018. – 38 (6): – P. 851-867.

68. Goh, J.S. Producing recombinant therapeutic glycoproteins with enhanced sialylation using CHO-gmt4 glycosylation mutant cells / J.S. Goh, Y. Liu, K.F. Chan, C. Wan, G. Teo, P. Zhang, Y. Zhang, Z. Song // Bioengineered. – 2014. – V. 5(4). – P. 269-273.

69. Goldwasser, E. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action / E. Goldwasser, C.K. Kung, J. Eliason // J. Biol. Chem. – 1974. – N 249 (13). – P. 4202-4206.

70. Gregory, C.J. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses / C.J. Gregory, A.C. Eaves // Blood. – 1977. – N 49. – V. 6. – P. 855-864.

71. Gregory, C.J. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties / C.J. Gregory, A.C. Eaves // Blood. – 1978. – N 51. – V. 3. – P. 527-537.

72. Gross, A.W. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) / A.W. Gross, H.F. Lodish // J. Biol. Chem. – 2006. – N 281. – P. 2024-2032.

73. Hardee, M.E. Erythropoietin biology in cancer / M.E. Hardee, M.O. Arcasoy, K.L. Blackwell, J.P. Kirkpatrick, M.W. Dewhirst // Clin. Cancer. Res. – 2006. – V. 12. – P. 332-339.

74. Heeschen, C. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization / C. Heeschen, A. Aicher, R. Lehmann, S. Fichtlscherer, M. Vasa, C. Urbich, C. Mildner-Rihm, H. Martin, A.M. Zeiher, S. Dimmeler // Blood. – 2003. – N 102. – V. 4. – P. 1340-1346.

75. Henry, D.H. Thrombocytosis and venous thromboembolism in cancer patients with chemotherapy induced anemia may be related to ESA induced iron restricted erythropoiesis and reversed by administration of IV iron / D.H. Henry, N.V. Dahl, M.A. Auerbach // Am. J. Hematol. – 2012. – N 87 (3). – P. 308-310.

76. Hiram-Bab, S. Context-Dependent Skeletal Effects of Erythropoietin / S. Hiram-Bab, D. Neumann, Y. Gabet // Vitam. Horm. – 2017. – V. 105. – P. 161-179.

77. Hua, S. Technologies for glycomic characterization of biopharmaceutical erythropoietins/S. Hua, M.J. Oh, S. Ozcan, Y.S. Seo, R. Grimm, H.J. An // Trends Anal. Chem. – 2015. – V. 68. – P. 18-27.

78. Jacobs, K. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin / K. Jacobs, C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neill, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S.S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsch, M. Kawakita, T. Shimizu, T. Miyake // Nature. – 1985. – N 313. – P. 806–810.

79. Jacobson, L.O. Role of the Kidney in Erythropoiesis / L.O. Jacobson, E. Goldwasser, W. Fried, L. Plzak // Nature. – 1957. – N 179. – P. 633-634.

80. Jefferis, R. Biologics: structural heterogeneity and immunogenicity / R. Jefferis // Br. J. Hosp. Med. – 2017. – V. 78(8). – P. 443-447.

81. Jelkmann, W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever / W. Jelkmann // Eur. J. Haematol. – 2007. – N 78 (3). – P. 183-205.

82. Jelkmann, W. Physiology and Pharmacology of Erythropoietin / W. Jelkmann // Transfus. Med. Hemother. – 2013. – N 40. – P. 302 - 309.

83. Jelkmann, W. Regulation of erythropoietin production / W. Jelkmann // J. Physiol. – 2011. – N 589 (Pt 6). – P. 1251-1258.

84. Jelkmann, W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of there combinant drugs rhEpo and NESP / W. Jelkmann // Eur. J. Haematol. – 2002. – V. 69. – P. 265-274.
85. Kato, H. Erythropoiesis and blood pressure are regulated via AT1 receptor by distinctive pathways / H. Kato, J. Ishida, T. Matsusaka, T. Ishimaru, K. Tanimoto, F. Sugiyama, K. Yagami, M. Nangaku, A. Fukamizu // J. PLoS. One. – 2015. – 10(6). – P. 1-15.
86. Kelley, L.L. Apoptosis in erythroid progenitors deprived of erythropoietin occurs during the G1 and S phases of the cell cycle without growth arrest or stabilization of wild-type p53 / L.L. Kelley, W.F. Green, G.G. Hicks, M.C. Bondurant, M.J. Koury, H.E. Ruley // Mol. Cell Biol. – 1994. – N 14. – V. 6. – P. 4183-4192.
87. Kim, Y.-C. Erythropoietin Regulation by Angiotensin II / Y.C. Kim, O. Mungunsukh, R.M. Day // Vitam. Horm. – 2017. – V. 105. – P. 57-77.
88. Kim, Y.-C. Mechanism of Erythropoietin Regulation by Angiotensin II / Y.-C. Kim, O. Mungunsukh, E.A. McCart, P.J. Roehrich, D.K. Yee, R.M. Day // J. Mol. Pharmacol. – 2014. – N 85. – P. 898-908.
89. Kimakova, P. Erythropoietin and its angiogenic activity / P. Kimakova, P. Solar, Z. Solarova, R. Komel, N. Debeljak // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – 18 (7). – P. 14.
90. Kochling J. Regulation of human erythropoietin gene induction by upstream flanking sequeces in transgenic mice / J. Kochling, P.T. Curtin, A. Madan // Br. J. Heamatol. – 1998. – N 103. – P. 960-968.
91. Korzeniewski, S.J. Endogenous Erythropoietin / S.J. Korzeniewski, A. Pappas // Vitam. Horm. – 2017. – V. 105. – P. 39-56.
92. Koury, M.J. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells / M.J. Koury, M.C. Bondurant // J. Cell Physiol. – 1988. – N 137. – V. 1. – P. 65-74.
93. Krantz, S.B. Erythropoietin / S.B. Krantz // Blood. – 1991. – V. 77 (3). – P. 419-434.

94. Krantz, S.B. Erythropoietin and the Regulation of Erythropoiesis / S.B. Krantz, L.O. Jacobson // *Ann. Intern. Med.* – 1970. – N 73 (6). – P. 330.
95. Kwak, C.Y. Enhancing the sialylation of recombinant EPO produced in CHO cells via the inhibition of glycosphingolipid biosynthesis / C.Y. Kwak, S.Y. Park, C.G. Lee, N. Okino, M. Ito, J.H. Kim // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – P. 13059-13067.
96. Lai, P.H. Structural characterization of human erythropoietin / P.H. Lai, R. Everett, F.F. Wang, T. Arakawa, E. Goldwasser // *J. Biol. chem.* – 1986. – N 261 (7). – P. 3116-3121.
97. Lamanuzzi, A. Role of erythropoietin in the angiogenic activity of bone marrow endothelial cells of MGUS and multiple myeloma patients / A. Lamanuzzi, I. Saltarella, A. Ferrucci, R. Ria, S. Ruggieri, V. Racanelli, L. Rao, T. Annese, B. Nico, A. Vacca, D. Ribatti // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – P. 14510-14521.
98. Lee, J.S. Current state and perspectives on erythropoietin production / J.S. Lee, T.K. Ha, S.J. Lee, G.M. Lee // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – V. 95. – P. 1405-1416.
99. Lin, F.-K. Cloning and expression of the human erythropoietin gene / F.-K. Lin, S. Suggs, C.-H. Lin, J.K. Browne, R. Smalling, J.C. Egrie, K.K. Chen, G.M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, S.M. Badrawi, P.-H. Lai, E. Goldwasser // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – V. 82. – P. 7580-7584.
100. Lin, F.K. The molecular biology of erythropoietin / F.K. Lin // *NATO ASI Series.* – 1987. – V. H8. – P. 26-36.
101. Mac Dougall, I.C. Novel erythropoiesis stimulating protein / I.C. Mac Dougall // *Semin. Nephrol.* – 2000. – V.20. – P. 375-381.
102. Mac Dougall, I.C. CERA (New Erythropoietin Receptor Activator): A New Erythropoiesis-Stimulating Agent for the Treatment of Anemia / I.C. Mac Dougall // *Curr. Hematol. Rep.* – 2005. – V. 4. – P. 436-440.
103. Mac Dougall, I.C. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator) for the treatment of renal anemia: an innovative agent with unique receptor binding characteristics and prolonged serum half-life / I.C. Mac Dougall, P. Bailon, N. Tare, W. Pahlke, J. Pill, M. Brandt // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – V. 14. – P. 769A.

104. Mulders, J.W. Prediction of the in vivo biological activity of human recombinant follicle stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing / J.W. Mulders, M. Derksen, A. Swolfs, F. Maris // *Biologicals Sep.* – 1997. – V. 25 (3). – P. 269-281.

105. Macdougall, I.C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease / I.C. Macdougall, R. Robson, S. Opatrna, X. Lioqier, A. Pannier, P. Jordan, F.C. Douqherty, B. Reiqner // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2006. – N 1 (6). – P. 1211-1215.

106. Mallet, R.T. Erythropoietin: Endogenous Protection of Ischemic Brain / R.T. Mallet, M.G. Ryou // *Vitam. Horm.* – 2017. – V. 105. – P. 197-232.

107. Metta, M.K. Development of an in vitro Bioassay for Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) Based on Proliferative Stimulation of an Erythroid Cell Line and Analysis of Sialic Acid Dependent Microheterogeneity: UT-7 Cell Bioassay / M.K. Metta, V. Malkhed, S. Tantravahi, U. Vuruputuri, R. Kunaparaju // *Protein J.* – 2017. – V. 36(2). – P. 112-122.

108. Mikhail, A. Renal association clinical practice guideline on Anaemia of Chronic Kidney Disease / A. Mikhail, C. Brown, J.A. Williams, V. Mathrani, R. Shrivastava, J. Evans, H. Isaac, S. Bhandari // *BMC Nephrol.* – 2017. – N 18(1). – P. 345-373.

109. Nekoui, A. Erythropoietin and Nonhematopoietic Effects / A. Nekoui, G. Blaise // *Am. J. Med. Sci.* – 2017. – V. 353(1). – P. 76-81.

110. Nguyen, A.Q. Erythropoietin: Powerful protection of ischemic and post-ischemic brain / A.Q. Nguyen, B.H. Cherry, G.F. Scott, M.-G. Ryou, R.T. Mallet // *Exp. Biol. Med.* – 2014. – V. 239. – P. 1461-1475.

111. Noguchi, C.T. Role of erythropoietin in the brain / C.T. Noguchi, P. Asavaritikrai, R. Teng, Y. Jia // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2007. – V. 64. – P. 159-171.

112. Ogawa, M. Human marrow erythropoiesis in culture: II. Heterogeneity in the morphology, time course of colony formation, and sedimentation velocities of the

colony-forming cells / M. Ogawa, M.D. Maceachern, L. Avila // Am. J. Hematol. – 1977. – N 3. – P. 29-36.

113. Ostrvica, E. Effectiveness of treating the renal anemia in chronic hemodialyzed patients by epoietin alpha and beta / E. Ostrvica, E. Mesic, D. Ostrvica // Med. Arh. – 2010. – V. 64 (1). – P. 4-6.

114. Parekh, R.B. Gene Expression – Glycosylation / R.B. Parekh // Biologicals. – 1994. – N 22. – P. 113-119.

115. Perreault, A.A. Epo reprograms the epigenome of erythroid cells / A.A. Perreault, M.L. Benton, M.J. Koury, S.J. Brandt, B.J. Venters // Exp. Hematol. – 2017. – V. 51. – P. 47-62.

116. Peter, J. Methods for in vitro determination of erythropoietin bioactivity / J. Peter, Lisi, K. Jeffrey Glenn, So. Chi-Kwong // Patent US, No. CA 2265989 C. – 1996.

117. Pharmacopeia of the people's republic of China. Appendix X B. Test for biological activity of recombinant erythropoietin. – 2005. – V. III. – 472 p.

118. Ponce, L.L. Erythropoietin Neuroprotection with Traumatic Brain Injury / L.L. Ponce, J.C. Navarro, O. Ahmed, C.S. Robertson // Pathophysiology. – 2013. – N 20 (1). – P. 31–38.

119. Qu, Z. Correlation of adrenomedullin with the erythropoietin receptor and microvessel density in hepatocellular carcinoma / Z. Qu, Y. Jiang, M. Xu, M.Z. Lu, B. Zhou, Y. Ding // Arch. Med. Sci. – 2015. – N 11. – P. 978-981.

120. Rangarajan, V. Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection / V. Rangarajan, S.E. Juul // Pediatr. Neurol. – 2014. – N 51. – P. 481-488.

121. Recommendation for euthanasia of experimental animals / Lab. Anim. – 1996. – V. 4. – P. 293-316.

122. Robertson, C.S. Treatment of Mild Traumatic Brain Injury with an Erythropoietin-Mimetic Peptide / C.S. Robertson, R. Garcia, S.S. Gaddam, R.J. Grill, H.C. Cerami, H.J. Hannay // J. of Neurotrauma. – 2013. – N 30. – P. 765–774.

123. Sanchis-Gomar, F. Erythropoietin and the heart: Physiological effects and the therapeutic perspective / F. Sanchis-Gomar, J.L. Garcia-Gimenez, H. Pareja-Galeano, M. Romagnoli, C. Perez-Quilis, G. Lippi // *Int. J. Cardiol.* – 2014. – N 171 (2). – P. 116-125.
124. Sasaki, H. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA / H. Sasaki, B. Bothner, A. Dell, M. Fukuda // *J. Biol. Chem.* – 1987. – N 262 (25). – P. 12059-12076.
125. Sawada, K. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors / K. Sawada, S.B. Krantz, C.H. Dai, S.T. Koury, S.T. Horn, A.D. Glick, C.I. Civin // *J. Cell Physiol.* – 1990. – N 142. – V. 2. – P. 219-230.
126. Sawyer, S.T. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta / S.T. Sawyer, S.B. Krantz, K. Sawada // *Blood.* – 1989. – N 74. – V. 1. – P. 103-109.
127. Skibeli, V. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin / V. Skibeli, G. Nissen-Lie, P. Torjesen // *Blood.* – 2001. – N 98 (13). – P. 3626-3634.
128. Spivak, J.L. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat / J.L. Spivak, B.B. Hogans // *Blood.* – 1989. – N 73 (1). – P. 90-99.
129. Stahl, P.D. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages / P.D. Stahl, J.S. Rodman, M.J. Miller, P.H. Schlesinger // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1978. – N 75 (3). – P. 1399-1403.
130. Statistical analysis of results of biological assays and tests 01/2008:50300 European Pharmacopoeia 8.0. – 2013. – V. 1. – P. 607-635.
131. Stauder, R. Anemia at older age: etiologies, clinical implications, and management/ R. Stauder, P. Valent, I. Theurl // *Blood.* – 2018. – N 131(5). – P. 505-514.

132. Steer, C.J. Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver / C.J. Steer, R. Clarenburg // J. Biol. Chem. – 1979. – N. 254. – P. 4457-4461.

133. Storing, P.L. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties / P.L. Storing, R.J. Tiplady, R.E. Gaines Das, B.E. Stenning, A. Lamikanra, B. Rafferty, J. Lee // Br. J. Haematol. – 1998. – N 100(1). – P. 79-89.

134. Storing, P.L. The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins / P.L. Storing, R.E. Gaines Das // J. Endocrinol. – 1992. – N 134 (3). – P. 459-484.

135. Storing, P.L. Lectin binding assays for the isoforms of human erythropoietin: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins / P.L. Storing, R.J. Tiplady, Das R.E. Gaines, B. Rafferty, Y.G. Mistry // J. Endocrinol. – 1996. – N 150 (3). – P. 401-412.

136. Su, J. The local HIF-2 α /EPO pathway in the bone marrow is associated with excessive erythrocytosis and the increase in bone marrow microvessel density in chronic mountain sickness / J. Su, Z. Li, S. Cui, L. Ji, H. Geng, K. Chai, X. Ma, Z. Bai, Y. Yang, T. Wuren, R.L. Ge, M.T. Rondina // High Alt. Med. Biol. – 2015. – N 16. – P. 318-330.

137. Sylvia, L.-H. Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in Escheria coli / L.-H. Sylvia // Pro. Natl. Acad. Sci. – 1984. – V. 81. – P. 2708-2712.

138. Sytkowsky, A.J. Denaturation and renaturation of human erythropoietin / A.J. Sytkowsky // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1980. – N 96 (1). – P. 143–149.

139. Tankiewicz-Kwedlo, A. Erythropoietin accelerates tumor growth through increase of erythropoietin receptor (EPOR) as well as by the stimulation of angiogenesis in DLD-1 and Ht-29 xenograft / A. Tankiewicz-Kwedlo, J. Hermanowicz, A. Surazynski, D. Rozkiewicz, A. Pryczynicz, T. Domaniewski, K. Pawlak, A. Kemonia, D. Pawlak // Mol. Cell. Biochem. – 2016. – N 421. – P. 1-18.

140. Tsuda, E. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin / E. Tsuda, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – N 188. – P. 405-411.
141. Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks / G. Walsh // *Nature Biotechnology.* – 2014. – N 32. – P. 992-1000.
142. Wang, F.F. Some chemical properties of human erythropoietin / F.F. Wang, CKH Kung, E. Goldwasser // *Endocrinology.* – 1985. – N 116 (6). – P. 2286-2292.
143. Webster, A.C. Chronic Kidney Disease / A.C. Webster, E.V. Nagler, R.L. Morton, P. Masson // *Lancet.* – 2017. – N 389(10075). – P. 1238-1252.
144. Winearls, C.G. Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience / C.G. Winearls // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 1998. – N 13 (2). – P. 3-8.
145. Wojchowski, D.M. Signal transduction in the erythropoietin receptor system / D.M. Wojchowski, R.C. Gregory, C.P. Miller, A.K. Pandit, T.J. Pircher // *Exp. Cell Res.* – 1999. – N 253. – V. 1. – P.143-56.
146. World Health Organization Drug information, annex 2. – 2017. – V. 31. – No. 2. – 233 p.
147. Yan, F. Erythropoietin improves hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats after short-term anoxia by enhancing angiogenesis / F. Yan, M. Zhang, Y. Meng, H. Li, L. Yu, X. Fu, Y. Tang, C. Jiang // *Brain Res.* – 2016. – V. 1651. – P. 104-113.
148. Yang, Z. VEGFA activates erythropoietin receptor and enhances VEGFR2-mediated pathological angiogenesis / Z. Yang, H. Wang, Y. Jiang, M.E. Hartnett // *Am. J. Pathol.* – 2014. – N 184. – P. 1230-1239.
149. Yuksel, I.O. Erythropoietin stimulates the coronary collateral development in patients with coronary chronic total occlusion / I.O. Yuksel, G. Cagirci, E. Koklu, A. Yilmaz, S. Kucukseymen, H.Y. Ellidag, S. Cay, N. Yilmaz, S. Arslan // *Neth. Heart J.* – 2016. – N 24. – P. 609-616.
150. Zehnder, C. Treatment of renal anemia using human erythropoietin / C. Zehnder, A. Blumberg // *Dtsch. Med. Wochenschr.* – 1987. – 112 (23). – P. 938-9.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»
 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350
 Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, тел. (499) 241-25-34

ПАСПОРТ
на научно-техническую продукцию
ОТРАСЛЕВОЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ СПЕЦИФИЧЕКОЙ АКТИВНОСТИ
ЭРИТРОПОЭТИНА
ОСО 42-28-437-2017

1. НАЗНАЧЕНИЕ: для экспертизы качества препаратов рекомбинантного эритропоэтина, по показателям «подлинность», «специфическая активность» (метод *in vivo* на нормоцитемических мышцах) и «удельная активность».

2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА: специфическая активность – 2400 МЕ/мл (95% доверительный интервал 94,5 – 105,8 %), установлена в межлабораторных исследованиях методом *in vivo* по стимуляции гемопоза у нормоцитемических мышей в ответ на введение им ОСО в сравнении с Международным Стандартным образцом рекомбинантного эритропоэтина (WHO International Standard 3rd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant, for bioassay NIBSC code: 11/170) и Стандартным образцом эритропоэтина Европейской Фармакопеи (Erythropoietin BRP, batch 3, European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard, E1515000).

3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ: препарат представляет собой кислый гликопротеин, который состоит из 165 аминокислотных остатков, с двумя внутренними дисульфидными связями между цистеинами в положении 7–161 и 29–33. Углеводная часть представлена тремя участками N-гликозилирования в положениях 24, 38 и 83 по аминокислотным остаткам аспарагина и одним участком O-гликозилирования в положении 126 по серину. Молекулярная масса около 34 кДа. Препарат получают с помощью технологии рекомбинантной ДНК на линии клеток CHO-ЭПО SP/M с последующей хроматографической очисткой. Страна происхождения – Россия.

Каждая ампула содержит остаток после лиофильного высушивания 50 мкл раствора содержащего:

Рекомбинантный Эпоэтин альфа человека – 20 мкг

Бычий сывороточный альбумин (свободный от пептидаз) – 100 мкг

Трегалоза – 2 мг

Натрия хлорид – 0,06 мкг

4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ: в соответствии с инструкцией по применению ОСО, прилагаемой к паспорту.

5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ: экземпляр ОСО, инструкция по применению.

6. СЕРИЯ: № 1.

7. ДАТА ВЫПУСКА: 01.08.2017 г.

8. СРОК ГОДНОСТИ: 01.08.2022 г.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ: Хранить при температуре: минус 20 °С, в темном месте. Восстановленный препарат использовать в течение рабочего дня, повторному замораживанию не подлежит. При транспортировке использовать хладореагенты.

10. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ: материал ОСО предназначен для лабораторных испытаний и не предназначен для введения людям. Особые условия не требуются.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА: гарантируется стабильность значений аттестованной характеристики в течение срока годности ОСО при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБИ
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Месет

В.П. Бондарев

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495)625-4350
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1, 3, тел. (499) 241-25-34

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Центра экспертизы и контроля МИБП

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

В.П. Бондарев

2017 г.



Инструкция

на научно-техническую продукцию

**ОТРАСЛЕВОЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА**

ОСО 42-28-437-2017

Москва 2017 г.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр 1, 3, тел. (499) 241-25-34

**ОСО ОТРАСЛЕВОЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА**

ОСО 42 – 28 – 437 – 2017

Макет этикетки первичной упаковки

ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ
ОСО 42-28-437-2017
специфической активности
эритропоэтина: 2400 МЕ
Серия № 1
Хранить при температуре минус 20°C
Дата выпуска: 01.08.2017 г.
Срок годности: 01.08.2022 г.

Директор Центра экспертизы и контроля МЧБП
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр. 2, тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350
Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1, 3, тел. (499) 241-25-34

**ОТРАСЛЕВОЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА**

ОСО 42 – 28 – 437–2017

Макет этикетки вторичной упаковки

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)**

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр.2,
тел. (495) 234-61-06, факс (495) 625-4350

Фактический адрес: 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, стр. 1, 3, тел. (499) 241-25-34

ОСО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА

ОСО 42 – 28 – 437 –2017

Серия № 1

Дата выпуска: 01.08.2017 г. Срок годности: 01.08.2022 г.

Количество _____ ампул

Хранить и транспортировать при температуре минус 20 °С

Директор Центра экспертизы и контроля МРБН
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Меев

В.П. Бондарев