

А. К. Яковлев, Р. А. Волкова, Л. В. Симутенко, Е. Л. Постнова,  
Т. А. Батуашвили, А. А. Воропаев, Н. А. Алпатова,  
В. А. Томили, Е. Д. Мыца, В. П. Бондарев, В. А. Меркулов

## РАЗРАБОТКА ОТРАСЛЕВОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭРИТРОПОЭТИНА

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2; e-mail: YAK. Aleksey@gmail.com

Основываясь на рекомендациях ВОЗ и разработанных принципах стандартизации эритропоэтинов, в качестве материала для кандидата в стандартный образец выбрана одна из фармацевтических субстанций эпоэтина альфа, внесенных в Государственный реестр лекарственных средств. По результатам контроля производителя выбранная фармацевтическая субстанция соответствовала требованиям нормативной документации, дополнительный контроль подлинности методом капиллярного зонного электрофореза показал присутствие 8 изоформ, что соответствует требованиям Европейской фармакопеи. Разработаны условия получения отраслевого стандартного образца в лиофилизированной форме. Аттестацию отраслевого стандартного образца провели в межлабораторных исследованиях, значение аттестованной характеристики — специфической активности — составило 2400 МЕ в 1 ампуле, доверительный интервал от 94,5 до 105,8 %. Изучение стабильности разработанного отраслевого стандартного образца позволило установить срок годности 5 лет при температуре хранения – 20 °С с возможностью его продления по результатам мониторинга стабильности.

**Ключевые слова:** эритропоэтин; специфическая активность; стандартный образец; аттестованное значение; доверительный интервал.

Лекарственные препараты рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) применяют при лечении симптоматической анемии при хроническом заболевании почек у больных, находящихся на диализе, симптоматической анемии почечного генеза, симптоматической анемии, вызванной химиотерапией солидных и гематологических немиелоидных опухолей, а также для увеличения объема донорской крови, предназначенной для последующей аутоотрансфузии.

В РФ по данным государственного реестра лекарственных средств Министерства здравоохранения [1], зарегистрировано 7 отечественных лекарственных препаратов первого поколения рчЭПО, представляющих эпоэтины альфа и бета, и 7 зарубежных препаратов 3 поколений, представляющих эпоэтины альфа, бета, тета и дарбэпоэтин.

Точное определение специфической активности необходимо для обеспечения эффективности и безопасности применения лекарственных препаратов рчЭПО, поскольку завышение значения биологической активности отразится на эффективности препарата, а занижение может привести к нежелательным осложнениям. Передозировка препаратов эритропоэтина опасна развитием гипертонии и тромбоцитоза с ишемией и инфарктом миокарда, инсультом, тромбозами вен и артерий [2].

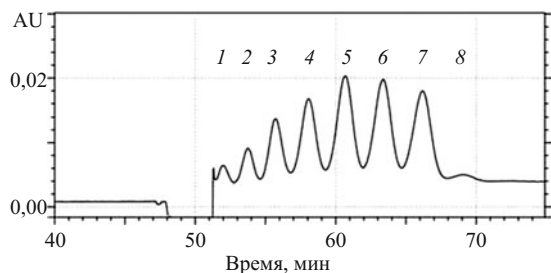
Определение качества лекарственных препаратов рчЭПО по показателям "специфическая активность" и "подлинность" проводится биологическим методом и требует использования стандартного образца [3].

В РФ было зарегистрировано 2 стандартных образца — эпоэтин бета [4] и эпоэтин альфа [1], срок действия которых в настоящее время истек. Отсутствие отечественного стандартного образца эритропоэтина ставит российских производителей препаратов рчЭПО в зависимость от импортных стандартных образцов и увеличивает себестоимость данных препаратов.

Стандартизация методики определения специфической активности и разработка отечественного отраслевого стандартного образца (ОСО) необходимы для гармонизации отечественных требований с международными, что позволит получать сопоставимые результаты при контроле качества препаратов разных производителей в различных лабораториях и будет способствовать обеспечению эффективности и безопасности лекарственных препаратов рчЭПО при клиническом применении [5].

### *Экспериментальная химическая часть*

Основываясь на рекомендациях ВОЗ [6] к кандидатам в стандартные образцы и в соответствии с принципами стандартизации эритропоэтинов [7], в качестве материала для кандидата в стандартный образец специфической активности эритропоэтина была выбрана фармацевтическая субстанция отечественного производства Рэпоэтин-СП, срок годности которой в 1,5 раза больше по сравнению с субстанциями других производителей. Качество субстанции Рэпоэтин-СП соответствовало требованиям нормативной документации НД № PN003458/01-050609 по результатам контроля производителя (18 показателей). Дополнительно



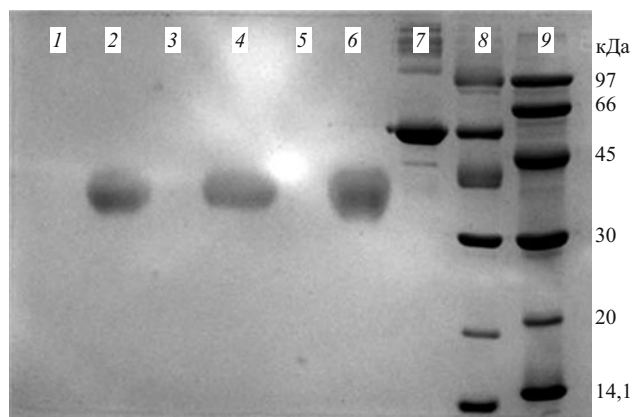
**Рис. 1.** Типичная электрофореграмма материала для кандидата в ОСО специфической активности эритропоэтина. Капиллярный зонный электрофорез. Номерами обозначены 8 изоформ эритропоэтина.

качество субстанции оценено методом капиллярного зонного электрофореза (рис. 1) на оборудовании PA 800 plus (Beckman Coulter, USA), в сравнении со стандартным образцом для физико-химических испытаний (Erythropoietin for physicochemical tests CRS batch 1) (далее — CRS). Выявлено 8 изоформ, соответствующих 8 изоформам CRS, что соответствует требованиям ЕФ [8].

Проведены также испытания методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS по ГФ XIII ОФС 1.2.1.0023.15. Выявлена 1 диффузная полоса, соответствующая полосе CRS (рис. 2).

Для приготовления лиофилизированной формы ОСО разработали схему, состоящую из следующих этапов: разведение фармацевтической субстанции средой высушивания, состав которой оптимизирован в отношении трегалозы (табл. 1); тщательное перемешивание и розлив полученного раствора в ампулы из боросиликатного стекла вместимостью 1 мл из расчета около 2500 МЕ/амп (для определения специфической активности препарата эритропоэтина *in vivo* необходим стандартный образец с активностью не менее 1000 МЕ в 1 ампуле); лиофилизация в отработанных условиях на установке для лиофильной сушки Advantage XL, (VirTis, США); запайка ампул под вакуумом; изучение свойств полученного кандидата в ОСО специфической активности эритропоэтина — средней массы, однородности дозирования, герметичности, подлинности методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS с последующим иммуноблоттингом; установление значения аттестованной характеристики ОСО — специфической активности, исследование стабильности.

Оценку средней массы содержимого 1 ампулы проводили в соответствии с ОФС.1.4.2.0008.15 [9] с использованием электронных аналитических весов CP-225D класса точности  $\pm 0,05$  мг в диапазоне от



**Рис. 2.** Типичная электрофореграмма материала для кандидата в ОСО специфической активности эритропоэтина (Рэпоэтин-СП). Электрофорез в полиакриламидном геле с SDS. Лунки: 1, 3, 5 — буферный раствор для образцов; 2 — CRS, нагрузка на лунку 10 мкг; 4 — эритропоэтин, препарат, нагрузка на лунку 10 мкг; 6 — материал для кандидата в ОСО (Рэпоэтин-СП), нагрузка на лунку 10 мкг; 9 — маркеры молекулярных масс, Amersham, Low molecular weight.

0,001 до 5 г (Sartorius GmbH). Средняя масса лиофилизированной таблетки составила 2,19 мг (CV 2,7 %;  $n = 75$ ).

Контроль качества запаивания (герметичность) оценили в соответствии с МУК 4.1/4.2.588-96 [10] по возбуждению газовой среды на приборе “Искра-1”, отмечали свечение ампул голубым или розово-голубым светом, что свидетельствовало об абсолютном остаточном давлении от 10 до 1000 Па. Ампулы без свечения и с фиолетовым свечением отбраковывали.

Испытания по оценки подлинности проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом в соответствии с ОФС 1.7.2.0022.15 и ОФС 1.2.1.0023.15. [9, 11] с использованием поликлональных кроличьих антител против эритропоэтина человека (Sigma Aldrich, США). По результатам электрофореза в полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом выявлен основной компонент с молекулярной массой, соответствующей основному компоненту Рэпоэтина-СП и стандартного образца CRS (рис. 3).

### Экспериментальная биологическая часть

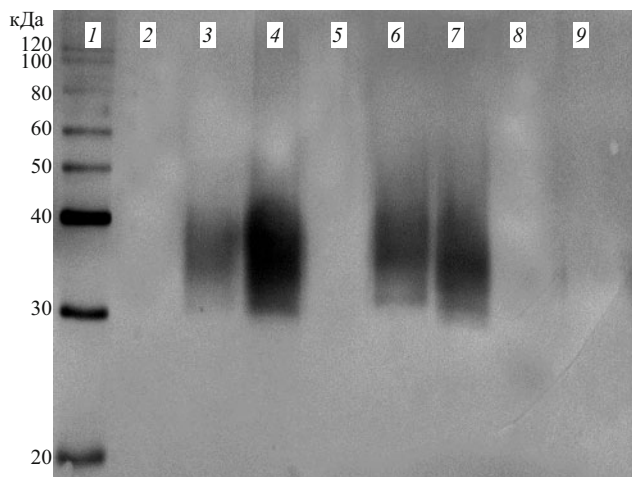
Оценка качества субстанции Рэпоэтин-СП по показателю “специфическая активность” проведена биологическим методом на нормоцитических мышцах [8]. По результатам экспертизы активность составила 298168 МЕ/мл, что подтвердило соответствие материала требованиям нормативной документации.

Аттестацию ОСО специфической активности эритропоэтина проводили в межлабораторных испытаниях с участием 3 лабораторий Испытательных центров ФГБУ “НЦЭСМП” МЗ РФ в соответствии с [8] биологическим методом *in vivo* по уровню стимуляции эритропоэза у мышей линии Balb/C ( $n = 1014$ ) массой тела 18 – 24 г, выбранной по результатам изучения условий стандартизации методики [12]. Животные полу-

Т а б л и ц а 1

#### Состав среды высушивания

Реагент	Концентрация, об. %
Бычий сывороточный альбумин	0,24
D-(+)-трегалоза дигидрат	4,84
Натрия хлорид	0,15



**Рис. 3.** Результаты испытаний ОСО специфической активности эритропоэтина методом Вестерн-блот. Лунки: 1 — маркеры молекулярных масс, MagicMark XP Western protein standard, Invitrogen; 2, 5, 8, 9 — буферный раствор для образцов; 3 — кандидат в ОСО, нагрузка на лунку 0,2 мг; 4 — материал для кандидата в ОСО (Рэпоэтин-СП), нагрузка на лунку 1 мг; 6 — CRS, нагрузка на лунку — 1 мг; 7 — эритропоэтин, препарат, нагрузка на лунку 1 мг.

чены из питомника Филиала “Андреевка” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, содержание и уход проводили в соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными [13 – 15].

Особое внимание было уделено стандартизации условий испытаний по оценке активности. Животных содержали группами по 6 – 8 особей 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 ис-

кусственное, 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.

Кандидат в ОСО специфической активности эритропоэтина (так же как стандартные образцы) хранили при температуре – 20 °С, размораживали в день испытания, неиспользованный материал уничтожали. Каждая лаборатория выполнила по 3 независимых определения специфической активности относительно международного стандартного образца (3rd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant for bioassay) и по 3 испытания — относительно стандартного образца эритропоэтина Европейской Фармакопеи (European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP batch 3). В каждом испытании исследовали 3 дозы (80, 40, 20 МЕ/мл) в 8 повторах. Животные и исследуемые образцы были рандомизированы для уменьшения влияния случайных источников вариабельности. Взятие крови производили из ретроорбитального синуса мышей в пробирки с дикалиевой солью этилендиамина тетрауксусной кислоты. Количество ретикулоцитов в образце крови определяли на проточном цитофлуориметре (Navios, Beckman Coulter, США). В качестве красителя использовали 5 мкМ раствор акридинового оранжевого (Sigma-Aldrich, США).

Результаты определения специфической активности ОСО проверили на выпадающие значения, после чего провели статистическую обработку данных методом параллельных линий [8] с применением программы для анализа биологических испытаний (PLA 2.0, Германия). Критерии параллельности и линейности были соблюдены при  $p = 0,05$ , что позволило рассчитать

Таблица 2

**Результаты аттестации ОСО специфической активности эритропоэтина**

Лаборатория	Испытание	ОСО относительно			
		WHO 3rd IS		BRP batch 3	
		активность, МЕ/амп	доверительный интервал ( $p = 0,95$ ), %	активность, МЕ/амп	доверительный интервал ( $p = 0,95$ ), %
1	1	2311	85 – 118	2266	66 – 149
	2	2305	76 – 130	2448	79 – 128
	3	2539	83 – 120	2538	79 – 127
2	1	2052	84 – 119	2880	77 – 134
	2	2257	76 – 130	2969	76 – 137
	3	2244	71 – 139	2841	78 – 131
3	1	2562	71 – 145	2009	72 – 134
	2	2269	70 – 144	2117	77 – 129
	3	2481	80 – 124	2604	80 – 128
Среднее взвешенное значение активности, МЕ/амп		2400			
Доверительный интервал рассчитанной активности ( $p = 0,95$ ), %		94,5 – 105,8 ( $n = 18$ )			

Таблица 3  
**Специфическая активность стандартных образцов эритропоэтина**

Наименование стандартного образца	Специфическая активность эритропоэтина	
	активность, МЕ	доверительный интервал, %
3rd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant for bioassay	1650	94,8 – 105,5
European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP batch 4	13000	94,3 – 106,0
ОСО 42-28-437-2017	2400	94,5 – 105,8

средние значения активности для каждого испытания (табл. 2).

Результаты, полученные в 3 лабораториях, после проверки на однородность объединили и рассчитали значение аттестованной характеристики ОСО как среднее взвешенное значение специфической активности (табл. 2). В соответствии с требованиями Европейской фармакопии проверку на однородность [8] объединяемых значений провели с помощью критерия Хи-квадрат:

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

что свидетельствует об однородности полученных результатов. Значение аттестованной характеристики ОСО составило 2400 МЕ/ампула, доверительный интервал — от 94,5 до 105,8 %. Специфическая активность разработанного ОСО сравнима с активностью международного стандартного образца (1650 МЕ) [16] и требует меньшего разведения по сравнению с Европейским стандартным образцом (13000 МЕ) [17], обеспечивая меньшую ошибку и исключая излишние потери стандартного образца. Доверительный интервал активности не превышает таковой для международного и Европейского стандартных образцов (табл. 3).

Стабильность разработанного ОСО специфической активности эритропоэтина изучали в реальном времени и методом ускоренного старения в соответствии с ОФС.1.1.0009.15. [11] при температурах от – 20 °С до + 37 °С в течение 9 мес (срок наблюдения). В результате проведенных исследований достоверных отличий активности образцов, хранившихся при положитель-

ных температурах от активности образцов, хранившихся при температуре –20 °С, не выявлено (табл. 4).

Полученные результаты и опыт использования международного стандартного образца в условиях хранения при температуре –20 °С в течение 24 лет [16, 18, 19] позволили установить срок годности для ОСО 5 лет при температуре –20 °С с возможностью продления срока годности на основании результатов мониторинга стабильности.

Разработанный ОСО специфической активности рчЭПО был использован в качестве стандартного образца в исследованиях по оценке специфической активности зарегистрированных лекарственных препаратов рчЭПО (альфа и бета), произведенных ООО “ЛЭНС-Фарм”, ЗАО “ФармФирма “Сотекс”, ОАО “Фармстандарт-УфаВИТА”, ЗАО “Биофарм”. Результаты представлены в табл. 5.

Полученные результаты сопоставимы с паспортными данными, специфическая активность и доверительный интервал при ( $p = 0,95$ ) соответствуют требованиям ЕФ.

Таким образом, субстанция Рэпоэтин СП отечественного производства приемлема в качестве материала для кандидата в ОСО по показателям качества и результатам дополнительного контроля. Разработанные условия получения ОСО в лиофилизированной форме с применением в качестве стабилизатора 4 % трегалозы позволили получить ОСО со сроком годности не менее 5 лет при температуре хранения –20 °С. ОСО специфической активности эритропоэтина (ОСО 42-28-437-2017) аттестован по результатам исследований в 3 лабораториях: значение специфической активности составило 2400 МЕ в ампуле, установленный доверительный интервал (94,5 – 105,8) % сопоставим с доверительным интервалом международного и Европейского стандартных образцов (94,8 – 105,5 % и 94,3 – 106,0 % соответственно). Применение ОСО специфической активности рчЭПО позволяет получать сопоставимые результаты при оценке специфической активности препаратов различных производителей в различных лабораториях, что обеспечивает стандартность дозирования лекарственных препаратов эчЭПО при клиническом применении.

Таблица 4  
**Результаты изучения стабильности ОСО специфической активности эритропоэтина**

Температура хранения, °С	Период хранения, дни	Активность, %	Доверительный интервал, %
37 ± 0,2	270	108	84 – 139
28 ± 0,2	270	97	76 – 123
4 ± 1,0	270	107	81 – 141
– 20 ± 1,0	270	109	87 – 138

Таблица 5  
**Результаты определения специфической активности относительно ОСО 42-28-437-2017 в сравнении с паспортными данными**

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств; [Электронный ресурс] URL: <https://grls.rosminzdrav.ru> (Дата обращения 27.10.2017).
2. D. H. Henry, N. V. Dahl, and M. A. Auerbach, *Am. J. Hematol.*, **87**(3), 308 – 310 (2012).
3. Н. А. Алпатова, Л. А. Гайдерова, А. К. Яковлев и др., *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*, **17**(1), 13 – 27 (2017).
4. Приказ Министерства Здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации № 212, Москва (1995).
5. В. П. Бондарев, И. В. Борисевич, Р. А. Волкова и др., *Ведомости научного центра экспертизы средств мед. применения*, № 2, 28 – 32 (2013).
6. WHO Expert Committee on biological standardization, 40th report, No 800, annex 4, 181 – 215 WHO, Geneva (1990).
7. А. К. Яковлев, Л. А. Гайдерова, Н. А. Алпатова и др., *Станд. образцы*, **1**, 8 – 20 (2016).
8. European Pharmacopoeia 9th Ed.; [Электронный ресурс], URL: <http://online6.edqm.eu/ep901/#> (Дата обращения 27.10.2017).
9. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд., Т. 2, Москва (2015).
10. МУК 4.1 / 4.2.588 – 96 (1996).
11. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд., Т. 1, 638 – 657, Москва (2015).
12. А. К. Яковлев, Н. А. Алпатова, Е. Л. Постнова и др., *Мед. иммунол. журн.*, **19**, 77 – 78 (2017).
13. ГОСТ 33215-2014. Стандартиформ, Москва (2016).
14. ГОСТ 33216-2014. Стандартиформ, Москва (2016).
15. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes, Council of Europe, Strasbourg (1986).
16. C. Burns, R. Tiplady, and J. Hockley, *WHO*, Geneva (2012); [Электронный ресурс]. URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/96601/1/WHO BS 2012.2195 eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/96601/1/WHO%20BS%202012.2195%20eng.pdf) (Дата обращения 27.10.2017).
17. C. Burns, A. F. Bristow, A. Daas, et al., *Pharmeuropa Bio*, 246 – 253 (2015).
18. P. L. Storrington and Das R. E. Gaines, *J. Endocrinol.*, **134**(3), 459 – 484 (1992).
19. P. L. Storrington, R. J. Tiplady, Das R. E. Gaines, et al., *J. Endocrinol.*, **150**(3), 401 – 412 (1996).

Поступила 04.12.17

## DEVELOPMENT OF INDUSTRIAL REFERENCE SAMPLE OF THE SPECIFIC ACTIVITY OF ERYTHROPOIETIN

A. K. Yakovlev, R. A. Volkova, L. V. Simutenko, E. L. Postnova, T. A. Batuashvili, A. A. Voropaev, N. A. Alpatova, V. A. Tomilin, E. D. Mytsa, V. P. Bondarev, and V. A. Merkulov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

Based on WHO recommendations and elaborated principles of standardization of erythropoietin (EPO) related drugs, one candidate reference EPO alpha standard has been selected from substances introduced in the Russian State Register of Medicines. The manufacturer's control tests demonstrated that the selected pharmaceutical substance satisfied the requirements of the regulatory documents. Additional identification testing by capillary zone electrophoresis showed the presence of 8 isoforms, which complies with the European Pharmacopoeia requirements. Conditions were established for the production of a lyophilized form of the industrial reference sample. Certification of the candidate reference sample of EPO was carried out in the course of an inter-laboratory collaboration study. The certified characteristic of specific drug activity was estimated at 2400 IU per ampule, the confidence interval being 94.5 – 105.8%. Evaluation of the proposed reference sample stability allowed the shelf life to be established as 5 years at a storage temperature of -20°C with the possibility of extending the shelf life based on the results of stability monitoring.

**Keywords:** erythropoietin; specific activity; reference sample; certified value; confidence interval.