

Этапы стандартизации препаратов эритропоэтинов

А.К. Яковлев, Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова, Т.Н. Лобанова, Т.А. Батуашвили,
Л.В. Симутенко, Е.Л. Постнова, Е.И. Юрчикова

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

The stages in standardizing erythropoietin preparations

A.K. Yakovlev, L.A. Gayderova, N.A. Alpatova, T.N. Lobanova, T.A. Batuashvili,
L.V. Simutenko, E.L. Postnova, E.I. Yurchikova

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Препараты рекомбинантных эритропоэтинов человека (рчЭПО) входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения. При оценке качества препаратов ЭПО в процессе производства, при государственной регистрации и сертификации для подтверждения их качества по таким показателям, как количественное определение (специфическая активность), подлинность, димеры и высокомолекулярные родственные вещества, сиаловые кислоты, необходимы стандартные образцы эритропоэтина. В работе приведены сведения об этапах разработки различных стандартных образцов эритропоэтина. Дано сравнительное описание существующих методов оценки качества препаратов эритропоэтина с использованием стандартных образцов. Показана необходимость разработки и аттестации отечественного стандартного образца эритропоэтина.

Ключевые слова: препараты эритропоэтина; показатели качества; биологическая активность; метод оценки; точность определения; разработка и аттестация стандартного образца.

Библиографическое описание: Яковлев АК, Гайдерова ЛА, Алпатова НА, Лобанова ТН, Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ, Постнова ЕЛ, Юрчикова ЕИ. Этапы стандартизации препаратов эритропоэтинов. Биопрепараты 2015; (4): 17–20.

Preparations of recombinant human erythropoietin (rhEPO) are included in the list of vital and essential drugs for medical use. When evaluating the quality of EPO preparations during the manufacturing process, under the state marketing authorization and certification procedures, in order to confirm their quality in terms of assay (specific activity), identification, dimer and high-molecular related substances content, sialic acids, it is required to use erythropoietin reference standard. The present article describes various stages of the development of erythropoietin reference standards. It provides the comparative description of the existing methods for evaluating the quality of erythropoietin preparations using reference standards. The necessity of the development and validation of national erythropoietin reference standard is justified.

Key words: erythropoietin preparations; quality indicators; biological activity; methods of evaluation; accuracy of determination; development and certification of a reference standard.

Bibliographic description: Yakovlev AK, Gayderova LA, Alpatova NA, Lobanova TN, Batuashvili TA, Simutenko LV, Postnova EL, Yurchikova EI. The stages in standardizing erythropoietin preparations. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (4): 17–20.

Препараты рекомбинантных эритропоэтинов человека (рчЭПО) являются одними из первых успешно применяемых в медицинской практике биотехнологических лекарственных средств. Препараты этой группы входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения [1]. За последние два десятилетия они были использованы более чем у миллиона пациентов [2], преимущественно с хронической почечной недостаточностью (ХПН) [3–5]. Применение препаратов эритропоэтинов позволяет устранить анемический синдром, уменьшить потребность в гемотрансфузиях, снизить инфекционную заболеваемость, повысить качество жизни [6–8].

У больных с анемией при ХПН лекарственные препараты эритропоэтина применяются практически пожизненно. В свя-

зи с этим к качеству препаратов данной группы следует уделять особые требования. Одним из основных показателей качества, эффективности и безопасности лекарственных препаратов на основе рчЭПО является биологическая (специфическая) активность. Точность ее оценки – необходимое условие обеспечения качества препаратов эритропоэтинов, поскольку ошибка в сторону завышения значения биологической активности отразится на эффективности препарата, а в сторону занижения – может привести к развитию нежелательных реакций у пациентов. В результате клинических исследований препаратов эритропоэтина было установлено, что их передозировка может привести к гипертонии и тромбоцитозу с дальнейшим развитием ишемии, инфаркта миокарда, инсульта, тромбозов вен и артерий [9, 10]. Следовательно, точ-

ность при определении биологической активности обеспечивает безопасность применения препаратов эритропоэтинов.

При оценке качества препаратов ЭПО в процессе производства, при государственной регистрации и сертификации для подтверждения их качества по таким показателям, как количественное определение (специфическая активность, биологический метод *in vivo*), подлинность, димеры и высокомолекулярные родственные вещества, сиаловые кислоты, необходимы стандартные образцы эритропоэтина [11].

Стандартные образцы – вещества, посредством сравнения с которыми осуществляется контроль качества исследуемых 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 [12].

Разработка стандарта для оценки количественного определения биологической активности эритропоэтина началась в 1959–1960 гг, когда было указано на необходимость использования общепринятых и легкодоступных стандартов для определения специфической активности эритропоэтина. Вся историю разработки стандартных образцов можно условно разделить на 2 этапа:

1. Первый этап (эмпирический) – с 1961 по 1990 гг. В этот период эритропоэтин получали путем выделения из естественных доступных источников (плазмы крови и мочи). Основные трудности при исследовании эритропоэтина в этот период были связаны с его низким содержанием в биологических материалах. В 1961 г. был разработан первый стандарт эритропоэтина (стандарт А), исходным материалом для которого послужила плазма анемичных овец. Активность этого стандарта составляла 10 единиц на ампулу. За единицу активности приняли так называемую кобальтовую единицу, которая была эквивалентна действию 5 мМ CoCl_2 [13]. Избыточное поступление хлорида кобальта в организм сопровождается состоянием гипоксии [14], поскольку кобальт вытесняет атом железа из гема сенсорной 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), калибровку которого проводили 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 трех лабораториях. Международная единица установлена как активность, содержащая 1,48 мг стандарта В, что эквивалентно биологической активности одной единицы Стандарта А [13].

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,

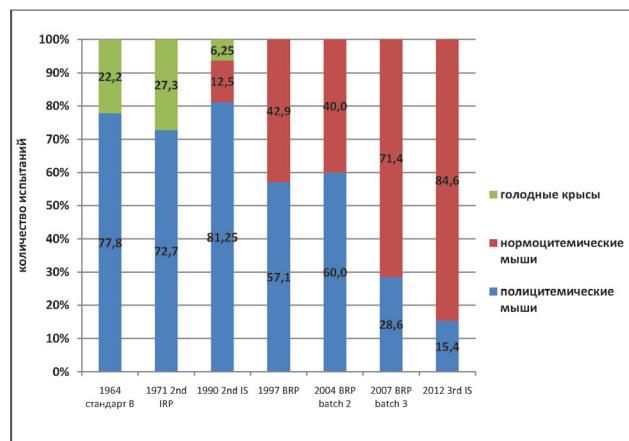


Рис. 1. Частота использования методов при определении специфической активности эритропоэтинов.

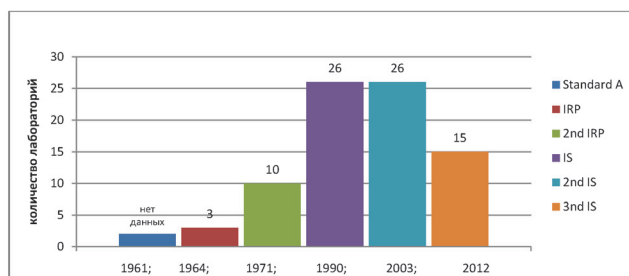


Рис. 2. Количество лабораторий, принимавших участие в межлабораторных исследованиях.

что изученные препараты можно использовать при разработке внутрилабораторных стандартов [15].

Биологическую активность стандартных образцов эритропоэтина в межлабораторных исследованиях до 1971 г. включительно проводили биологическим методом *in vivo* на полицитемических мышцах и голодных крысах. Частота использования разных методов в этих исследованиях представлена на рисунке 1.

Полицитемию вызывали понижением атмосферного давления, кровопусканием или понижением атмосферного давления с последующим кровопусканием. Активность препарата оценивали по стимулированию включения ^{59}Fe 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 крови овец и кроликов. По этой же причине невозможно было провести расширенные межлабораторные исследования. Сведения о количестве лабораторий, принимавших участие в этих исследованиях, представлены на рисунке 2.

Таким образом, первый этап разработки стандартного образца ЭПО можно считать подготовительным и охарактеризовать его как период сбора данных, отработки и оптимизации методики оценки биологической активности препаратов ЭПО.

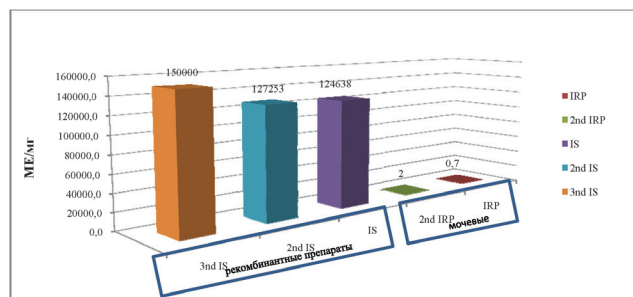


Рис. 3. Изменение удельной активности стандартных образцов эритропоэтина в процессе совершенствования их разработки и применения.

2. **Второй этап** разработки международного стандартного образца эритропоэтина охватывает период с 1990 г. по настоящее время. Этот период характеризуется достижениями в области очистки белков, расшифровкой нуклеотидной последовательности гена, кодирующего молекулу эритропоэтина, созданием рекомбинантного эритропоэтина. Использование технологии рекомбинантной ДНК позволило получать рекомбинантный белок ЭПО с более высоким значением биологической активности. Динамика увеличения удельной активности представлена на рисунке 3.

Появление препаратов на основе рчЭПО потребовало создания соответствующих стандартов. Так, в 1990 г. в Национальном институте биологических стандартов и контроля (NIBSC) аттестован международный стандарт эритропоэтина человеческого рекомбинантного, с активностью 86 МЕ/амп [16]. В 2003 г. аттестован 2-й международный стандарт эритропоэтина человеческого рекомбинантного с активностью 120 МЕ/амп. (2nd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant, 2nd IS), в 2012 г. – 3-й международный стандарт эритропоэтина рекомбинантного для количественного определения биологической активности (3rd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant for bioassay, 3rd IS). Активность этого стандарта составляла 1650 МЕ/амп. При аттестации 3rd IS Фармакопейная конвенция США получила разрешение Национального института биологических стандартов и контроля использовать указанный стандарт в качестве своего национального.

В результате совершенствования технической оснащенности исследований стало возможным повысить требования к качеству препаратов и оценивать их по таким показателям, как содержание димеров и высокомолекулярных родственных веществ, силовых кислот и др. В связи с этим возникла необходимость разработки специального стандарта для оценки этих показателей. Физико-химическими методами было установлено, что характеристики эритропоэтинов альфа и бета отличаются [16–18], поэтому в качестве стандарта для физико-химических методов было предложено использовать их смесь. В 1997 г. аттестовали стандарт эритропоэтина человеческого рекомбинантного Европейской фармакопеи – European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRR, который предназначен не только для определения специфической активности, но и для определения подлинности, содержания белка, димеров и высокомолекулярных родственных соединений, силовых кислот [19]. Данный стандарт состоял из равных количеств (50:50 %) эритропоэтина альфа и бета разных производителей, в отличие от международного стандартного образца, который содержит только эритропоэтин альфа. Позднее Европейский директорат принял реше-

ние о необходимости разделения функций стандартных образцов. В 2014 г. [20] аттестованы стандартный образец эритропоэтина BRP 4 (Erythropoietin BRP 4, 15 mg, E1515000) для оценки биологической активности и новый сертифицированный стандартный образец эритропоэтина для оценки физико-химических показателей (Erythropoietin for physicochemical tests CRS batch 1, Y0001725).

В России Государственный стандартный образец эритропоэтина был аттестован в 1995 г., однако в 2009 г. закончился срок действия фармакопейной статьи [21].

Анализ нормативной документации лекарственных препаратов на основе рекомбинантных эритропоэтинов отечественных производителей показал, что для оценки качества указанных препаратов применяют Международный стандартный образец биологической активности, Европейский биологический референс-препарат или откалиброванные по Международному или Европейскому стандартам стандартные образцы предприятия.

В настоящее время в Российской Федерации нет национальных стандартных образцов эритропоэтина как для определения биологической активности, так и для оценки физико-химических показателей. Производители вынуждены использовать внутренние стандартные образцы, процедура аттестации которых не регламентирована. Все это не позволяет корректно сопоставлять характеристики препаратов разных производителей. Кроме того, использование международных стандартных образцов ставит российских производителей в зависимость от держателей данных стандартов и от курса валюты.

Таким образом, актуальность разработки и аттестации отечественных стандартных образцов для определения биологической активности и оценки физико-химических показателей лекарственных препаратов эритропоэтинов обусловлена значимостью данных препаратов в клинической практике, необходимостью точной оценки специфической активности и отсутствием стандартных образцов в Российской Федерации.

Литература:

1. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 30 декабря 2014 г. № 2782-р.
2. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6 (6): 484–94.
3. Ahmad R, Hand M. Recombinant erythropoietin for the anemia of chronic renal failure. *N Engl J Med.* 1987; 317(3): 169–70.
4. Zehnder C, Blumberg A. Treatment of renal anemia using human erythropoietin. *Dtsch Med Wochenschr.* 1987; 112(23): 938–9.
5. Ostrvica E, Mesic E, Ostrvica D, Delic J, Delic-Custendil S, Hukic F. Effectiveness of treating the renal anemia in chronic hemodialyzed patients by epoietin alpha and beta. *Med Arh.* 2010; 64(1): 4–6.
6. Меркулов ВА, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Аллатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Медуницын НВ. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика. *Биопрепараты 2013;* (3): 4–11.
7. Бабичева ЛГ, Поддубная ИВ. Лечение анемии в онкологии: роль нового стимулятора эритропоэза Аранесп (дарбэпоэтин альфа). *Современная онкология 2007;* 9(3): 69–74.
8. Милованов ЮС, Козловская ЛВ, Николаев АО, Милованова ЛЮ. Анемия у больных с хронической почечной недостаточностью: принципы терапии. *Лечащий врач 2005;* (10): 18–24.
9. Henry DH, Dahl NV, Auerbach MA. 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. *Am J Hematol.* 2012; 87(3): 308–10.
10. Casati S, Passerini P, Campise MR, Graziani G, Cesana B, Perisic M, Ponticelli C. Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having haemodialysis. *Br Med J.* 1987; 295(6605): 1017–20.
11. *European Pharmacopoeia 7.0 «Erythropoietin Concentrated Solution».* 2008; 1946–1950.
12. Об обращении лекарственных средств. *Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 13.07.2015).*
13. Cotes PM, Bangham DR. The international reference preparation of erythropoietin. *Bull World Health Organ.* 1966; 35: 751–60.

14. Bruck RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev.* 2003; 17: 2614–23.
15. Annable L, Cotes PM, Mussett MV. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull World Health Organ.* 1972; 47: 99–112.
16. Storring PL, Gaines Das RE. The International standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol.* 1992; 134: 459–84.
17. Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Rafferty B, Mistry YG. Lectin-binding assays for the isoforms of human erythropoietin: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. *J Endocrinol.* 1996; 150(3): 401–12.
18. Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Stenning BE, Lamikanra A, Rafferty B, Lee J. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Haematol.* 1998; 100(1): 79–89.
19. Bristow AF. Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. *Pharmeuropa Bio.* 1996; 97(2): 31–48.
20. Annual report 2014 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM).
21. Государственный реестр лекарственных средств. Available from: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%D0%AD%D0%BF%D0%BE%D1%8D%D1%82%D0%B8%D0%BD&f=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=-1&order=RegDate&orderType=desc&RegType=&pageNum=4>.
17. Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Rafferty B, Mistry YG. Lectin-binding assays for the isoforms of human erythropoietin: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. *J Endocrinol.* 1996; 150(3): 401–12.
18. Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Stenning BE, Lamikanra A, Rafferty B, Lee J. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Haematol.* 1998; 100(1): 79–89.
19. Bristow AF. Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. *Pharmeuropa Bio.* 1996; 97(2): 31–48.
20. Annual report 2014 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM).
21. State Register of medicines. Available from: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%D0%AD%D0%BF%D0%BE%D1%8D%D1%82%D0%B8%D0%BD&f=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=-1&order=RegDate&orderType=desc&RegType=&pageNum=4> (in Russian).

References

1. Order of the Government of the Russian Federation № 2782-p, 30.12.2014 (in Russian).
2. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(6): 484–94.
3. Ahmad R, Hand M. Recombinant erythropoietin for the anemia of chronic renal failure. *N Engl J Med.* 1987; 317(3): 169–70.
4. Zehnder C, Blumberg A. Treatment of renal anemia using human erythropoietin. *Dtsch Med Wochenschr.* 1987; 112(23): 938–9.
5. Ostrvica E, Mesic E, Ostrvica D, Delic J, Delic-Custendil S, Hukic F. Effectiveness of treating the renal anemia in chronic hemodialyzed patients by epoetin alpha and beta. *Med Arh.* 2010; 64(1): 4–6.
6. Merkulov VA, Soldatov AA, Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Medunitsyn NV. Recombinant erythropoietin preparations and their characterization. *Biopreparaty* 2013; (3): 4–11 (in Russian).
7. Babicheva LG, Poddubnaya IV. Treatment of anemia in oncology: the role of a new stimulator of erythropoiesis Aranesp (darbepoetin alfa). *Sovremennaya onkologiya* 2007; 9(3): 69–74 (in Russian).
8. Milovanov YuS, Kozlovskaya LV, Nikolaev AYU, Milovanova LYU. Anemia in patients with chronic renal failure: treatment guidelines. *Lechaschiy vrach* 2005; (10): 18–24 (in Russian).
9. Henry DH, Dahl NV, Auerbach MA. 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. *Am J Hematol.* 2012; 87(3): 308–10.
10. Casati S, Passerini P, Campise MR, Graziani G, Cesana B, Perisic M, Ponticelli C. Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having haemodialysis. *Br Med J.* 1987; 295(6605): 1017–20.
11. European Pharmacopoeia 7.0 «Erythropoietin Concentrated Solution». 2008; 1946–1950.
12. On circulation of medicines. Federal Law № 61-FZ, 12.04.2010 (red. 13.07.2015) (in Russian).
13. Cotes PM, Bangham DR. The international reference preparation of erythropoietin. *Bull World Health Organ.* 1966; 35: 751–60.
14. Bruck RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev.* 2003; 17: 2614–23.
15. Annable L, Cotes PM, Mussett MV. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull World Health Organ.* 1972; 47: 99–112.
16. Storring PL, Gaines Das RE. The International standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol.* 1992; 134: 459–84.

Authors:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Yakovlev AK. Leading microbiologist of Laboratory of immunology of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Gayderova LA. Head of Laboratory of immunology of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Alpatova NA. Chief expert of Laboratory of immunology of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Lobanova TN. Leading expert of Laboratory of immunology of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Batuashvili TA. Chief expert of Laboratory of pharmacology of Test Center of Quality Expertise of medicines. Candidate of Biological Sciences.

Simutenko LV. Leading expert of Laboratory of pharmacology of Test Center of Quality Expertise of medicines. Candidate of Biological Sciences.

Postnova EL. Leading expert of Laboratory of viral vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Yurchikova EI. Engineer technician of Laboratory of viral vaccines of Test Center of Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 126051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Яковлев Алексей Константинович. Ведущий микробиолог лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Гайдерова Лидия Александровна. Начальник лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Алпатова Наталья Александровна. Главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Лобанова Татьяна Николаевна. Ведущий эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Батуашвили Тамара Ариеловна. Главный эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.

Симутенко Людмила Васильевна. Ведущий эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.

Постнова Евгения Леонидовна. Ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Юрчикова Евгения Игоревна. Инженер-лаборант лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Адрес для переписки: Яковлев Алексей Константинович; YAK.Aleksey@gmail.com

Поступила 15.10.2015 г.
Принята 06.11.2015 г.