

Разработка метода определения биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro*

Н. А. Гаврилова¹, С. А. Черепушкин², Н. В. Рыкалина², Ю. И. Обухов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Министерства образования и науки Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 03.03.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

Разработан метод оценки биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro* на культуре чувствительных клеток TF-1. Исследованы особенности измерения и расчета биологической активности эритропоэтинов с различным уровнем гликозилирования в тестах *in vivo* и *in vitro*. Диапазоны линейного ответа клеточной линии на эритропоэтин и его гипергликозилированный аналог отличались и составляли (0,39–0,56 нг/мл) и (3,1–12,5 нг/мл) соответственно. Проведенный анализ полученных результатов показывает возможность применения клеточного теста для сопоставления и количественной оценки активности аналогов эритропоэтина в международных единицах стандарта биологической активности (МЕ), принятых для эритропоэтина.

Ключевые слова: биологическая активность; эритропоэтин; дарбэпоэтин; клеточная линия TF-1; пролиферативный ответ.

Библиографическое описание: Гаврилова НА, Черепушкин СА, Рыкалина НВ, Обухов ЮИ. Разработка метода определения биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro*. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (2): 120–124.

Препараты рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) и его аналогов до сих пор являются одними из наиболее распространенных в медицинской практике биотехнологических лекарственных средств [1]. В последнее десятилетие были получены и нашли широкое применение так называемые пролонгированные формы эритропоэтина с повышенной биологической активностью [2–5]. Активно разрабатываются аналоги эритропоэтина в виде гибридных молекул, обладающие рядом других, в том числе цитопротекторных функций [5, 6]. Биологические функции препаратов эритропоэтинового ряда определяются, прежде всего, способностью взаимодействовать с рецепторами клеток-предшественников эритроидного ряда и стимулировать их дифференцировку, а также структурой молекул, которая определяет конечную эффективность препарата, способствуя оптимизации его фармакокинетических параметров.

Биологическая активность является одним из основных параметров качества эритропоэтина и определяется в соответствии с рекомендациями Европейской фармакопеи *in vivo* путем измерения числа ретикулоцитов в крови экспериментальных животных [7]. Активность эритропоэтина определяется в единицах международного стандарта, распространяемого Европейским директором по качеству медицинских препаратов [8]. В то же время, в нормативных документах РФ в настоящее время метод определения биологической активности препаратов эритропоэтинового ряда не регламентирован. Серьезную проблему представляет также отсутствие в России собственного государственного стандартного образца (ГСО) на эритропоэтин [9]. Кроме того, зарегистрированные за рубежом и на российском рынке препараты аналогов эритропоэтина, такие как Аранесп фирмы «Амджен Европа Б. В» (Нидерланды), имеют дозировки без указания величины гемопозитической активности. Таким образом, ряд препаратов одной терапевтической группы в отсутствии единой системы из-

мерений невозможно сопоставить по основному параметру качества — биологической активности.

С другой стороны, трудоемкость и вариабельность результатов определения активности *in vivo*, связанная с объективными трудностями воспроизводимости результатов в живом организме, диктует необходимость разработки других способов измерения активности белков эритропоэтинового ряда, например, с использованием культур клеток, более легко стандартизуемых по параметрам воспроизводимости и надежности, и не менее чувствительных. Применение этих методов особенно актуально на этапе получения новых рекомбинантных молекул, описания их свойств, а также выбора клонов продуцентов и разработки технологических процессов [5, 10, 11]. Несмотря на невозможность полноценной оценки биологических функций белков, эти методики позволяют определить подлинность и антигенную структуру белка по его способности взаимодействия с рецептором-мишенью. Кроме того, зависимость скорости пролиферации чувствительных клеток от количества ЭПО, добавленного в ростовую среду может быть оценена с помощью колориметрического теста. В зарубежной практике примером использования теста *in vitro* являются Аранесп («Амджен Европа Б. В», Нидерланды) [4], гибридные молекулы ЕРО-Fc [12, 13] и другие.

Во ФГУП ГосНИИгенетики разработан метод определения биологической активности ЭПО и его аналогов в культуре клеток *in vitro* с использованием клеточной линии TF-1 ATCC CRL-2003. Целью настоящего исследования была оценка возможности использования клеточного теста для определения биологической активности ЭПО, а также разработка формата методики для определения биологической активности эритропоэтинов с различным уровнем гликозилированности.

Материалы и методы

Стандартные и исследуемые белки. В качестве стандартного образца использовали препарат эталонного рекомбинантного эритропоэтина человека Erythropoietin BRP (EPO(BRP) E1515000), распространяемый Европейским директором по качеству медицинских препаратов. Измерение биологической активности проводили в образцах коммерческих препаратов Эпостим (ООО «Фармапарк», Россия) и Аранесп («Амджен Европа Б. В», Нидерланды).

Биологическую активность *in vivo* для препаратов Аранесп и Эпостим определяли в экспериментах с лабораторными мышами BALB/c (питомник ГУ НЦБТ РАМН «Столбовая», самки, 20–22 г), которые проводили в соответствии с методическими рекомендациями Европейской фармакопеи [7]. Эксперименты выполняли с использованием проточного гемоцитометра-анализатора ADVIA 120 (Bayer Diagnostics («Simens»), Германия) и программы обработки данных Multispecies Software 2120. В качестве стандартного образца использовали препарат эталонного рекомбинантного эритропоэтина человека Erythropoietin BRP (EPO(BRP) E1515000), распространяемого Европейским директором по качеству медицинских препаратов. Для определения биологической активности (стимуляция генерации ретикулоцитов у нормоцитемических мышей) животным вводили подкожно по 0,5 мл раствора, содержащего 80, 40 или 20 МЕ/мл стандарта EPO(BRP) или по 0,5 мл двукратных разведений анализируемых белков. В предварительных экспериментах был найден диапазон разведений, позволяющий получать линейный ретикулоцитарный ответ. По истечении четырех суток со дня инъекции в крови подопытных животных инструментально измеряли число ретикулоцитов и их процентное соотношение с количеством зрелых эритроцитов (RET %).

Биологическую активность *in vitro* определяли в культуре чувствительных к эритропоэтину клеток линии TF-1 ATCC CRL-2003.

Клетки линии TF-1 (ATCC CRL-2003) культивировали при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂, в среде RPMI (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («GE Healthcare Life Sciences HyClone Laboratories», США), гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия) до концентрации 1 мг/мл и гранулоцитарно-макрофагального колонистимулирующего фактора (ГМ-КСФ) («ReproTech EC Ltd», Великобритания) в конечной концентрации 2 нг/мл. Пересев клеток выполняли каждые 2–3 сут. Концентрация клеток в культуре составляла от 30 до 500 тыс. кл/мл и не превышала 700 тыс. кл/мл. Для проведения использовали клетки, подготовленные по особой схеме (описание в тексте). Подготовленные клетки вносили в лунки 96-луночного планшета, содержащие по 50 мкл приготовленных разведений стандартного или испытуемого образца ЭПО (максимальная концентрация 50 нг/мл, каждая концентрация в 4 повторах), а также ростовой среды, в качестве контроля. Планшет инкубировали в течение 68–72 ч при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂. После окончания инкубации в каждую ячейку планшета, включая ячейки для контроля среды, прибавляли по 10 мкл субстратной смеси WST-1 («Roche Diagnostics», США). Далее инкубировали планшет при температуре 37°C, в атмосфере 5% CO₂ в течение не менее 2 и не более 5 ч при визуальном контроле развития окраски. Затем измеряли оптическую плотность в лунках планшета при длине волн 450 нм на планшетном спектрофотометре.

Для расчета специфической активности для стандартного и испытуемых образцов по результатам тестов *in vivo* или *in vitro* в программе Microsoft Excel строили зависимость между логарифмом концентрации (в нг/мл) испытуемого и стандартного растворов и специфическим ответом в виде пролиферативного (оптическая плотность) или гемопозитического (количество ретикулоцитов, %) ответа. Полученная для стандартного и испытуемого препарата зависимость имела вид:

$$A = a \cdot \lg C + b,$$

где A — уровень биологического сигнала; C — концентрация раствора в нг/мл; b — угол наклона регрессионной прямой; a — свободный член уравнения регрессии.

Далее вычисляли концентрацию испытуемого белка, которая вызывает такое же биологическое действие, как и каждая доза стандартного белка с известной величиной биологической активности.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования было проведено измерение биологической активности двух коммерческих препаратов Эпостим («ООО Фармапарк», Россия) и Аранесп («Амджен Европа Б. В», Нидерланды) в тесте *in vivo* относительно стандарта гемопозитической активности EPO(BRP). Измеренная биологическая активность препарата эритропоэтина (Эпостим) соответствовала заявленной производителем спецификации и составляла 1005 МЕ/мл. Препарат дарбэпоэтина с указанной производителем дозировкой 500 мкг/мл разводили до концентраций 0,05; 0,1; 0,2 мкг/мл в соответствии с определенным в более ранних исследованиях диапазоном линейной зависимости ретикулоцитарного ответа от концентрации пролонгированных форм эритропоэтина [5, 6]. Рассчитанное значение активности препарата Аранесп составляло около 523767 МЕ/мл или 1047534 МЕ/мг белка. Полученное значение согласуется с данными других исследователей, которые оценивали гемопозитическую активность дарбэпоэтина как в 5 и более раз превосходящую активность эритропоэтина [4, 12]. На рисунке 1 представлены графики, характеризующие полученные линейные зависимости для стандартного белка, образцов коммерческих эритропоэтина и дарбэпоэтина.

Полученные результаты были использованы при постановке клеточного теста *in vitro*. Перед использованием в тесте по определению специфической активности клетки проходили так называемую стадию «голодания»: инкубацию в течение 22–26 ч в среде с минимальным содержанием сыворотки без добавления ГМ-КСФ и других факторов роста. Клетки, прошедшие стадию голодания, отмывали от культуральной среды путем центрифугирования при 1200 об/мин, отбора супернатанта и ресуспендирования осадка клеток в холодном растворе Хенкса без фенолового красного. Процедуру повторяли три раза. После третьей процедуры центрифугирования клеточный осадок суспендировали в таком объеме ростовой среды (без ГМ-КСФ), чтобы получившаяся концентрация клеток была в пределах 600–800 тыс. кл/мл. Данный формат метода подготовки клеточной суспензии был разработан в результате отдельного исследования по выбору оптимальных условий проведения эксперимента с соотношением уровней сигналов фона и максимального пролиферативного ответа не менее 1.

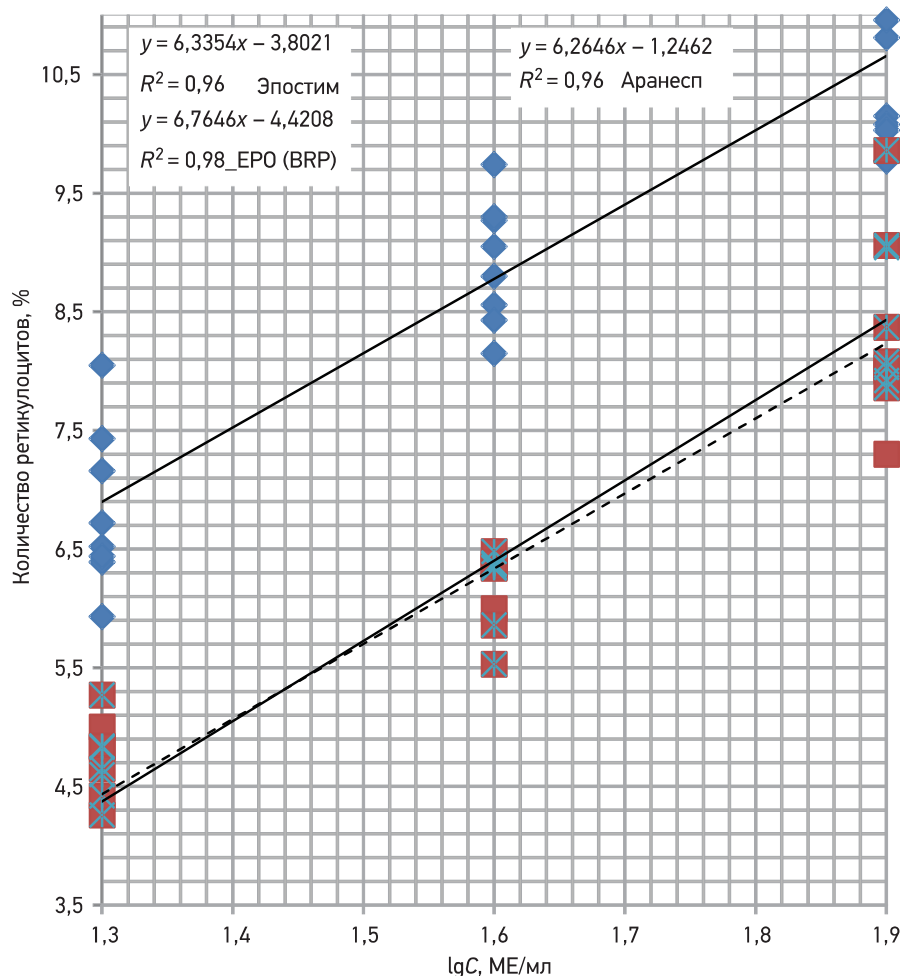


Рис. 1. Графическая зависимость уровня биологического ответа у мышей от концентрации стандартного образца эритропоэтина (EPO(BRP)), исследуемого образца препарата Эпостим и образца препарата Аранесп.

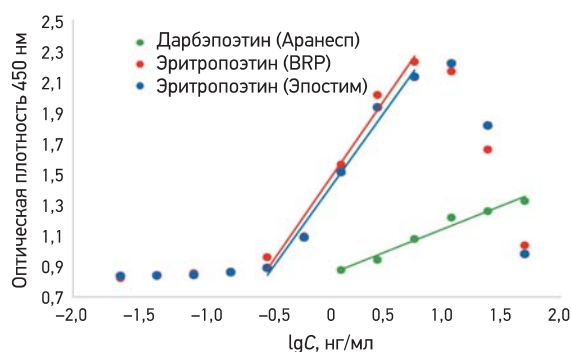


Рис. 2. Графическая зависимость уровня биологического ответа клеточной линии TF-1 от концентрации стандартного образца эритропоэтина (EPO(BRP)), исследуемого образца препарата Эпостим и образца препарата Аранесп.

Оба исследуемых препарата Эпостим и Аранесп были разведены кратно в соответствии с их биологической активностью до концентраций, соответствующих линейному диапазону пролиферативной активности, определенной

Таблица 1. Изменение активности препарата Аранесп при ускоренном хранении при температуре 25°C

Длительность хранения препарата, сутки	Активность, МЕ/мг	Активность, % от исходного результата определения
0	1047534	100,0
1	876785	83,7
7	675659	64,5
14	677754	64,7

Примечание. В графе активность указано среднее значение, полученное по результатам трех повторностей одного эксперимента.

ранее для EPO(BRP) и составляющей (0,39–6,25 нг/мл). Графические зависимости уровня пролиферативного ответа от логарифма концентрации белка представлены на рисунке 2.

Концентрация эритропоэтина, необходимая для инициации пролиферативного ответа чувствительной линии TF-1, почти в 10 раз ниже, чем для дарбэпоэтина. Этот результат полностью соответствует данным литературы о более слабой аффинности дарбэпоэтина к рецептору-мише-

ни, что обусловлено структурными изменениями белка и, прежде всего, его гипергликозилированием [12], а также результатам, полученным для обоих белков в экспериментах *in vivo*.

Таким образом, величина биологической активности препаратов эритропоэтинового ряда с разным уровнем гликозилирования не может быть прямо рассчитана по активности ЕРО(BRP) в рамках одного теста. Требуется наличие соответствующего стандартного образца, с тем же уровнем взаимодействия с рецептором чувствительных клеток или внутреннего стандартного образца, предварительно оцененного в единицах МЕ.

Тем не менее, с целью подтверждения возможности использования клеточного пролиферативного теста для оценки биологической активности препаратов эритропоэтинового ряда с различным уровнем гликозилирования, было проведено исследование с ускоренным хранением коммерческого препарата Аранесп и мониторингом в клеточном тесте изменения его активности. Результаты представлены в таблице 1. В условиях хранения, несоответствующих специфицированным, при температуре 25°C в течение 14 суток, активность препарата Аранесп изменялась с 1047534 до 677754 МЕ/мл. Конечный результат был подтвержден соответствующим измерением активности в тесте на мышах.

Заключение

Таким образом, эритропоэтин и его гликозилированный аналог взаимодействуют с рецептором, вызывая пролиферацию чувствительных клеток TF-1, что позволяет проводить сопоставление биологической активности белков эритропоэтинового ряда с различным уровнем гликозилирования.

Диапазоны линейного ответа клеточной линии на эритропоэтин и его гипергликозилированный аналог различаются и составляют (0,39–1,56 нг/мл) и (3,1–12,5 нг/мл) соответственно.

Результат клеточного пролиферативного теста может быть оценен количественно в единицах биологической активности, аналогично результатам метода *in vivo*. Разработанный метод позволяет сопоставить активность препарата эритропоэтина со стандартным образцом с аттестованной активностью и произвести расчет его активности в МЕ/мл. Препараты гипергликозилированных аналогов эритропоэтина, таких как Аранесп также могут быть оценены в соответствии с принятой для эритропоэтинов системой единиц измерения. Дальнейшие исследования и оценка основных валидационных характеристик клеточ-

ного теста позволят оценить возможность его применения не только для исследовательских целей, но и для оценки качества и стандартизации препаратов ЭПО.

Литература

1. Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007; **109**(3): 868–3.
2. Macdougall IC, Eckardt K-U. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential treatments for anaemia. *Lancet* 2006; **368**(9539): 947–53.
3. Cossar JD, Lawrence M, Donald S. Pegylated erythropoietic compounds. WO2004009627; 2004.
4. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater *in vivo* potency than recombinant erythropoietin. *Exp Hematol*. 2003; **31**(4): 290–9.
5. Joung CH, Shin JY, Koo JK, Linn JJ, Wang JS, Lee SJ, et al. Production and characterization of long-acting recombinant human albumin-EPO fusion protein expressed in CHO cell. *Protein Expr Purif*. 2009; **68**(2): 137–45.
6. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**(41): 14907–12.
7. European Pharmacopoeia 8.0 / 8.4. «Erythropoietin Concentrated Solution».
8. List of European Pharmacopoeia Reference Standards. Available from: <http://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-ordere-catalogue>.
9. Яковлев АК, Гайдарова ЛА, Алпатова НА, Лобанова ТН, Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ. и др. Этапы стандартизации препаратов эритропоэтинов. *Биопрепараты* 2015; (4): 17–20.
10. Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, et al. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol*. 1989; **140**(2): 323–34.
11. Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, et al. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol*. 2004; **32**(12): 1146–55.
12. Гаврилова НА, Черемных АМ, Бобренёва РА, Аскерова ЕВ, Калинин ТИ, Булушова НВ и др. Гемопоэтическая активность и фармакокинетика гибридных белков ЕРО-Fc, ЕРО-Fcneo и Alb-EPO — производных эритропоэтина человека. *Биотехнология* 2012; (5): 38–49.
13. Черемных АМ, Аскерова ЕВ, Бобренёва РА, Гаврилова НА, Калинин ТИ. Гибридный белок на основе рекомбинантного эритропоэтина человека, обладающий пролонгированным действием (варианты), и способ его получения. Патент Российской Федерации, № 2515914; 2013.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Гаврилова Наталья Андреевна. Аналитик 1-й категории Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Обухов Юрий Иванович. Начальник Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Министерства образования и науки Российской Федерации. Российская Федерация, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

Черепушкин Станислав Андреевич. Научный сотрудник отдела медицинской биотехнологии.

Рыкалина Наталия Владимировна. Научный сотрудник лаборатории иммунологии.

Адрес для переписки: Гаврилова Наталья Андреевна; GavriloVA@expmed.ru

The development of a method for determining the biological activity of erythropoietin preparations *in vitro*

N. A. Gavrilova¹, S. A. Cherepushkin², N. V. Rykalina², Yu. I. Obukhov¹

¹ Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² State Research Institute of Selection of Industrial Microorganisms of The Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Moscow, Russia

The method for the assessment of biological activity of erythropoietin preparations *in vitro* on TF-1 sensitive cells culture has been developed. The special characteristics of measurements and calculations of the biological activity of erythropoietin with different levels of glycosylation *in vivo* and *in vitro*. Linear response ranges for cell lines to erythropoietin and its hyperglycosylated analogue differ and make (0.39–0.56 ng/ml) and (3.1–12.5 ng/ml), respectively. The results have shown the possibility of using cellular test for comparing and assaying the activity of erythropoietin analogues in standard international units of biological activity (IU) set for erythropoietin.

Key words: biological activity; erythropoietin; darbepoetin; cell line TF-1; proliferative response.

For citation: Gavrilova NA, Cherepushkin SA, Rykalina NV, Obukhov Yul. The development of a method for determining the biological activity of erythropoietin preparations *in vitro*. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 120–124.

References

1. Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007; **109**(3): 868–3.
2. Macdougall IC, Eckardt K-U. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential treatments for anaemia. *Lancet* 2006; **368**(9539): 947–53.
3. Cossar JD, Lawrence M, Donald S. Pegylated erythropoietic compounds. *WO2004009627*; 2004.
4. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater *in vivo* potency than recombinant erythropoietin. *Exp Hematol.* 2003; **31**(4): 290–9.
5. Joung CH, Shin JY, Koo JK, Linn JJ, Wang JS, Lee SJ, et al. Production and characterization of long-acting recombinant human albumin-EPO fusion protein expressed in CHO cell. *Protein Expr Purif.* 2009; **68**(2): 137–45.
6. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**(41): 14907–12.
7. European Pharmacopoeia 8.0/8.4. «Erythropoietin Concentrated Solution».
8. List of European Pharmacopoeia Reference Standards. Available from: <http://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-orders-catalogue>.
9. Yakovlev AK, Gayderova LA, Alpatova NA, Lobanova TN, Batuashevili TA, Simutenko LV, et al. The stages in standardizing erythropoietin preparations. *Biopreparaty* 2015; (4): 17–20 (in Russian).
10. Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, et al. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol.* 1989; **140**(2): 323–34.
11. Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, et al. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol.* 2004; **32**(12): 1146–55.
12. Gavrilova NA, Cheremnykh AM, Bobreneva RA, Askerova EV, Kalinina TA, Bulushova NV, et al. The haemopoietic activity and pharmacokinetics of EPO-Fc, EPO-Fcneo and Alb-EPO fused proteins, derivatives of human erythropoietin. *Biotechnologiya* 2012; (5): 38–49 (in Russian).
13. Cheremnykh AM, Askerova EV, Bobreneva RA, Gavrilova NA, Kalinina TA, Jurin VL. Hybrid protein based on recombinant human erythropoietin, having prolonged action (versions), and method of its production. Patent RF, № 2515914; 2013 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky Boulevard, 8-2, Moscow, 127051, Russian Federation.

Gavrilova NA. Analyst of Office of expertise of antibacterial medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Obukhov Yul. Head of Office of expertise of antibacterial medical immunobiological preparations of Center of expertise and control of medical immunobiological preparations.

Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 1st Dorozhnyj Proezd, 1, Moscow, 117545, Russian Federation.

Cherepushkin SA. Researcher of Department of medical biotechnology.

Rykalina NV. Researcher of Laboratory of immunology.