

Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца активности филграстима

Е. В. Мотузова¹, Н. А. Алпатова¹, Л. А. Гайдерова¹, О. Б. Рунова¹, Р. А. Волкова¹, Е. Д. Мыца¹,
В. П. Бондарев¹, А. А. Вайнсон², В. В. Мещеринова², Р. А. Хамитов³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации России, Москва, Россия

³ ООО Международный биотехнологический центр «Генериум»

Поступила 29.01.2016. Принята к публикации 22.08.2016.

Представлены материалы по аттестации отраслевого стандартного образца (ОСО) активности филграстима. Для характеристики качества кандидата в ОСО проведены испытания по оценке показателей: биологическая активность, описание, подлинность, прозрачность, цветность, стерильность, pH, посторонние примеси, содержание бактериальных эндотоксинов, количественное определение: Филграстим; Ацетат-ион; Полисорбат 80, остаточные белки штамма-продуцента, остаточная ДНК штамма-продуцента. Полученные результаты полностью отвечают требованиям, предъявляемым к образцам филграстима. Аттестуемой характеристикой стандартного образца является биологическая активность. Назначение ОСО активности филграстима – это оценка приемлемости результатов определения биологической активности при контроле качества субстанций и лекарственных препаратов на основе филграстима. Показатель «Биологическая активность» кандидата в ОСО оценивали по результатам межлабораторных исследований в сравнении со вторым международным стандартом NIBSC-09/136. Установлено аттестованное значение показателя «Биологическая активность» ОСО активности филграстима: (32,2±5,35) млн. МЕ/мл. Срок годности, установленный при условии хранения от 2 до 8 °С, — 2 года. Результаты мониторинга долгосрочного изучения стабильности ОСО подтверждают его стабильность за период наблюдения.

Ключевые слова: филграстим; отраслевой стандартный образец; биологическая активность; стабильность; срок годности; статистическая обработка.

Библиографическое описание: Мотузова ЕВ, Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Рунова ОБ, Волкова РА, Мыца ЕД, Бондарев ВП, Вайнсон АА, Мещеринова ВВ, Хамитов РА. Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца активности филграстима. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16 (3): 172–178.

В клинической практике с 1990-х годов применяются препараты на основе Г-КСФ, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток *Escherichia coli* (филграстим) или в системе клеток яйчников китайского хомячка (ленограстим). Филграстим в качестве действующего вещества входит в состав лекарственных препаратов, предназначенных для снижения продолжительности, выраженности нейтропении и фебрильных осложнений у больных онкологическими заболеваниями, получающих цитостатическую химиотерапию или миелоаблативную терапию с последующей трансплантацией костного мозга [1–4].

В Российской Федерации на сегодняшний день зарегистрировано более 15 зарубежных и отечественных препаратов на основе филграстима, в которых одним из основных показателей качества является оценка специфической биологической активности. Количественное определение активности филграстима проводят с использованием биологического метода *in vitro* по оценке его влияния на пролиферацию клеток, рост которых зависит от гемopoэтических факторов. Испытание проводят с использованием соответствующей линии клеток, чувствительной к филграстиму. Оптимальной культурой являются клетки линии NFS-60 (клетки мышины миелоидной лейкемии, CLS), а также менее чувствительные к Г-КСФ клетки линии M-NFS-60 (ATCC No. CRL-1838) [5]. Активность лекарственных препаратов на основе филграстима опре-

деляют путем сопоставления активности разведений испытуемого препарата и разведений Международного Стандарта филграстима или стандартного препарата, калиброванного по Международному Стандарту в международных единицах. Учет результатов испытания проводят по интенсивности флуоресценции (использование красителя аламарового синего) или измерении степени окрашивания раствора с помощью спектрофотометрии (при использовании МТТ, ХТТ/MTS и др.).

Определение специфической биологической активности данной группы препаратов невозможно без использования стандартных образцов с известной активностью. Для определения биологической активности препаратов на основе филграстима ВОЗ аттестовала и рекомендовала к использованию следующие стандарты:

1-й Международный стандарт — негликолизированный рекомбинантный белок Г-КСФ (Granulocyte colony stimulating factor, human, recombinant, Lyophilized, 10,000 IU/ampoule. 1st International Standard, 1992 NIBSC 88/502). Исследования по его аттестации проводились ВОЗ в 1992 г. в 29 лабораториях 11 стран биологическим методом с использованием различных клеточных линий (первичных клеток костного мозга, клеток миелолейкоза). Аттестованное значение активности стандартного образца в этих исследованиях составило 10000 МЕ/ампулу [6].

В связи с появлением в последние несколько лет большого количества препаратов Г-КСФ (в том числе не-

скольких биоаналогичных/биоподобных препаратов), которые получены с использованием систем экспрессии преимущественно в клетках *E. coli* и имеют активность на несколько порядков выше, чем активность 1-го Международного стандарта, возникла необходимость в создании более узко специализированного стандартного образца [7].

Для решения поставленных задач в 13 лабораториях были исследованы пять кандидатов во 2-ой Международный стандартный образец (МСО) с целью оценки их пригодности для замены 1-го МСО на основании результатов изучения их биологической активности и стабильности. Активность оценивали в реакции пролиферации клеток миелолейкоза мышей линий NFS-60 и M-NFS-60. По результатам исследования биологической активности и стабильности выбран один из кандидатов в стандартный образец для определения биологической активности различных лекарственных препаратов на основе Г-КСФ (потери при рекомендуемой температуре хранения минус 20 °С в течение года составили менее 0,01 %). 2-й Международный стандарт представляет собой негликолизированный белок рекомбинантный Г-КСФ (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, human, recombinant, lyophilized, 1000 ng/ampoule. 2nd International Standard, 2010 NIBSC 09/136). Аттестованное значение активности, оцененное по пролиферации в культуре клеток NFS-60 в сравнении с 1-м МСО составило 95000 МЕ/амп., статистическую обработку результатов проводили методом параллельных линий [7–9].

Анализ нормативной документации лекарственных препаратов на основе рекомбинантных филграстимов разных производителей показал, что в качестве референс-образца для оценки показателя «Биологическая активность» используют 2-й МСО 09/136 или стандартные образцы предприятия, калиброванные по Международному стандарту в МЕ. Отсутствие в России национального стандартного образца филграстима и использование стандартных образцов предприятия, процедура аттестации которых в настоящее время не регламентирована, не позволяют корректно сопоставить характеристики препаратов различных производителей. Таким образом, стала актуальна разработка национального стандартного образца филграстима.

Целью данной работы была разработка и аттестация ОСО активности филграстима.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать показатели качества кандидата в ОСО активности филграстима.
2. Установить аттестованное значение активности кандидата в ОСО.
3. Оценить стабильность кандидата в ОСО активности филграстима в режиме реального времени (срок наблюдения в течение 1,5 лет).

Материалы

1. Образцы кандидата в ОСО активности филграстима. Кандидат в Отраслевой стандартный образец был приготовлен в ЗАО «Генериум», Россия и представляет собой негликолизированный белок гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ), получаемый с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе клеток генетически модифицированной культуры *Escherichia coli* BL(DE3)/pES3-7 с последующей хроматографической очисткой. Образец розлит во флаконы по 1,0 мл. Один флакон содержит: филграстим — 0,3 мг (30 млн. МЕ/мл); вспомо-

гательные вещества: сорбитол (Eur. Ph.) — 50 мг; полисорбат 80 — стабилизатор (Eur. Ph.) — 0,04 мг; натрия ацетата тригидрат (Eur. Ph.) — 1,36 мг, 1 М раствор уксусной кислоты (Eur. Ph.) — до pH 3,5–4,5; вода для инъекций (ФС 42-2620-97) — до 1 мл.

2. Международные стандарты: 2nd International Standard for Granulocyte colony stimulating factor (Human rDNA derived) (Национальный институт биологической стандартизации и контроля (NIBSC), Великобритания, код 09/136), с активностью 95000 МЕ в ампуле.

3. Культура клеток миелолейкоза мышей линия NFS-60 (CLS No. 400301).

Методы

Испытания кандидата в ОСО по показателям: «Подлинность», «Прозрачность», «Цветность», «Специфическая активность», «Стерильность», «рН», «Содержание бактериальных эндотоксинов», «Посторонние примеси», «Количественное определение: Филграстим; Ацетат-ион; Полисорбат 80», «Остаточные белки штамма-производителя», «Остаточная ДНК штамма-производителя» проведены методами, изложенными в нормативной документации на «Филграстим, субстанция 30 млн. МЕ/мл» [10]. Специфическую активность определяли биологическим методом в плоскостонных 96-луночных планшетах, в которых предварительно отмытую от ростового фактора (мышинного интерлейкина-3) суспензию клеток NFS-60 инкубировали с филграстимом в разных концентрациях в течение 52 ч в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ и относительной влажности не менее 95 %. Степень стимулирующего действия филграстима на рост клеток выявляли с помощью их дальнейшей инкубации в течение 14 ч в присутствии красителя аламара синего, изменяющего цвет при метаболизировании клетками. Изменение интенсивности окрашивания содержимого лунок оценивали по флуоресценции при возбуждении 530 нм и измерении сигнала при 590 нм.

Экспериментальные данные обрабатывали автоматически методом эквивалентных доз с построением в линейном диапазоне графика зависимости интенсивности флуоресценции содержимого лунок планшета от содержания филграстима в разведениях испытуемого раствора и стандартного раствора филграстима с помощью программы статистической обработки данных «PLA версия 2.0». Оценку однородности выборочных данных проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа (F-критерия) [11].

Оценку стабильности кандидата в ОСО активности филграстима проводили по анализу данных результатов долгосрочного изучения стабильности в течение 18 месяцев с целью установления прогнозируемого срока годности.

Результаты и обсуждение

Аттестуемой характеристикой кандидата в ОСО является биологическая активность. Назначение ОСО — оценка приемлемости результатов определения биологической активности филграстима в коммерческих сериях препаратов. Значение аттестованной характеристики установлено по результатам межлабораторных исследований — как наиболее предпочтительного способа аттестации стандартного образца [7–9].

Для определения среднего значения и доверительных границ результатов определения активности кандидата в ОСО калибровку проводили в 3 независимых исследованиях с использованием 22 образцов. Активность определяли в двух лабораториях разные операторы с использованием культуры клеток NFS-60 на разных пассажных уровнях и разной концентрацией клеток в суспензии. В качестве образцов, подтверждающих приемлемость результатов, использовали 2-ой МС 09/136. Статистическую обработку результатов проводили методом параллельных линий, основанном на линейной зависимости кривых доза/ответ для кандидата в стандартный образец и 2-го МС 09/136. Для этого стандарт разводили до концентраций 37,5; 18,7; 9,37; 4,69; 2,34; 1,17; 0,58; 0,29 МЕ/мл и исследовали относительно таких же концентраций международного стандарта. Результаты исследования представлены в таблице 1. Как следует из приведенных в таблице 1 данных, величина активности кандидата в ОСО во всех постановках в разных лабораториях имела сопоставимые значения и находилась в пределах критерия приемлемости результатов, рекомендованного Eur. Ph. 6.3 и USP, а именно: рассчитанное значение активности филграстима в образце должно быть не менее чем 80 % и не более чем 125 % от аттестованного значения и доверительный интервал (при $P = 0,95$) должен быть не менее чем 74 % и не более чем 136 % от значения активности [12, 13]. Значение коэффициента Фишера, рассчитанное по экспериментальным данным, меньше, чем табличное для доверительной вероятности $P \geq 0,95$ (рис. 1–3). На этом основании выборки следует считать однородными, и, следовательно, для расчета аттестованного значения кандидата в ОСО можно использовать результаты, полученные в обеих лабораториях. Таким образом, среднее значение специфической активности, рассчитанное по результатам всех испытаний, составило 32,2 млн. МЕ/мл. Интервал аттестованного значения активности кандидата в ОСО при доверительной вероятности $P \leq 0,95$, рассчитанный как $\pm 2 S$, составил $\pm 5,35$ млн. МЕ/мл. Аттестованное значение специфической активности ОСО было установлено равным (32,2 \pm 5,35) млн. МЕ/мл.

Для оценки других характеристик качества кандидата в ОСО, потенциально влияющих на значение и стабильность аттестуемой характеристики, проведены исследования по показателям: описание, подлинность, прозрачность, цветность, стерильность, рН, посторонние примеси,

содержание бактериальных эндотоксинов, количественное определение: Филграстим; Ацетат-ион; Полисорбат 80, остаточные белки штамма-производителя, остаточная ДНК штамма-производителя. Работы по оценке всех показателей качества кандидата в ОСО проведены с использованием аттестованного и поверенного оборудования. Результаты определения биологических и физико-химических показателей, а также требования к ним, рекомендованные Европейской и Американской фармакопеями, представлены в таблице 2.

Из представленных данных следует, что кандидат в ОСО стерилен, содержание бактериальных эндотоксинов менее 0,3 ЕЭ/мл, изозлектрическая точка филграстима 6,2; посторонние примеси в виде дезамидированных форм не обнаружены, положение основной полосы на электрофореграмме испытуемого раствора соответствовало положению основной полосы на электрофореграмме раствора стандартного образца Filgrastim CRS, молекулярная масса соответствовала 19,5 кДа. Полученные результаты полностью отвечают требованиям, предъявляемым к образцам филграстима [12, 13].

Проведен мониторинг стабильности кандидата в ОСО по результатам использования его с начала 2015 г. по настоящее время в двух лабораториях (общее время с начала наблюдения — 1,5 года). Результаты оценки стабильности активности ОСО в реальном времени в двух лабораториях не выходят за пределы границ доверительного интервала аттестованного значения ОСО. Активность ОСО за период наблюдения соответствовала (30,15 млн. МЕ/мл). Различия между аттестованным значением ОСО (32,2 \pm 5,35) млн. МЕ/мл и значением, полученным в результате наблюдений в реальном времени, были статистически незначимы, так как значение t -критерия, рассчитанное по экспериментальным данным $t_{\text{эксп}}$, равное 1,5, не превышает табличное $t_{\text{табл}} = 2,0$. Это позволяет сделать вывод о стандартности проведения испытаний и стабильности ОСО.

Выводы

На основании данных по изучению кандидата в ОСО активности филграстима сделан вывод о соответствии изучаемого препарата требованиям, предъявляемым к стандартным образцам филграстима как по метрологическим характеристикам, так и по процессу изготовления и испытания качества

Таблица 1. Результаты определения специфической активности кандидата в ОСО активности филграстима

Выборка (количество образцов)	Лаборатория	Дата испытания	Среднее значение активности кандидата в ОСО относительно 2-го МС 09/136, МЕ/мл	Относительная активность кандидата в ОСО, %	Доверительный интервал (при $P = 0,95$) активности кандидата в ОСО, %
8	2	8–11.01.2015	30750000	102,5	79–128
8	2	8–11.01.2015	30900000	103	81–131
8	2	30.01–2.02.2015	30312000	101,04	79–129
8	2	30.01–2.02.2015	30942000	103,14	79–136
8	2	30.01–2.02.2015	30870000	102,9	81–131
6	1	5–8.12.2015	29916282	99,7	88,9–111,8
6	1	5–8.12.2015	30332632	101,1	85,7–119
6	1	5–8.12.2015	36499666	121,7	107,9–136
6	1	5–8.12.2015	35840653	119,5	110,4–129,3
6	1	5–8.12.2015	35840653	119,5	110–129
6	1	5–8.12.2015	35840653	119,5	110–129

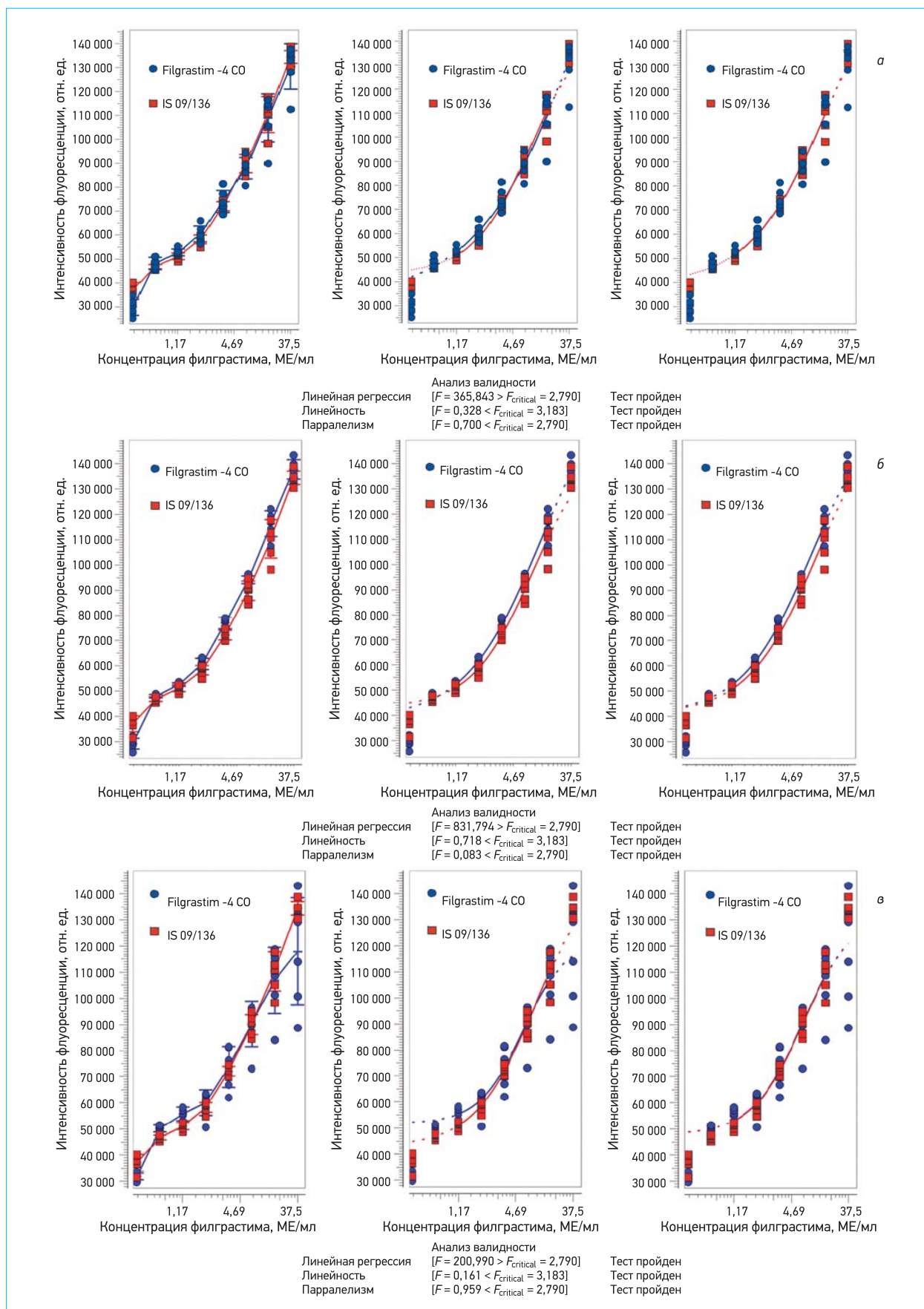


Рис. 1. Результаты статистической обработки данных методом параллельных линий, кривых зависимости флуоресценции от концентрации филграстима кандидата в стандартный образец и 2-го MS09/13.

Таблица 2. Результаты определения биологических и физико-химических показателей кандидата в ОСО активности филграстима

Показатель	Требования к ОСО активности	Результаты оценки кандидата в ОСО
Описание	Бесцветная или слегка желтоватого цвета, прозрачная или слабо опалесцирующая жидкость	Бесцветная прозрачная жидкость
Подлинность	1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца филграстима. 2. Изоэлектрофокусирование. Изоэлектрическая точка филграстима должна быть от 5,7 до 6,3. Положение основных полос на электрофореграммах испытуемого раствора и стандартного образца должны совпадать 3. ВЭЖХ. Пептидное картирование. Хроматографические профили растворов триптических гидролизатов испытуемого образца и раствора стандартного образца филграстима должны совпадать	1. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора соответствует времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца 2. Изоэлектрическая точка филграстима 6,2. Положение основных полос на электрофореграммах испытуемого раствора и стандартного образца совпадают. 3. Хроматографические профили растворов испытуемого образца и стандартного образца филграстима совпадают
Прозрачность	ГФ XII, Визуальный. Раствор должен быть прозрачным или не превышать эталон сравнения I	Прозрачный
Цветность	ГФ XII, Визуальный. Раствор должен быть бесцветным или не превышать эталон В ₇	Бесцветный
Стерильность	ГФ XII, Метод прямого посева. Должен быть стерильным	Стерилен
pH	ГФ XII, Потенциометрический. От 3,5 до 4,5	4,0
Посторонние примеси:		
1. Димеры и полимеры	1. ВЭЖХ. Гель-фильтрация. Не более 4 % суммарно	0,1 %
2. Родственные белки	2. ВЭЖХ Обращенно-фазовая. Не более 6 %	2,4 %
3. Дезамидированные формы	3. Изоэлектрофокусирование. Не более 5 %	Не обнаружены
Содержание бактериальных эндотоксинов	ГФ XII, ЛАЛ-тест. Не более 2 ЕЗ/мл	Менее 0,3 ЕЗ/мл
Количественное определение:		
1. Филграстим	1. ВЭЖХ. Гель-фильтрация. От 0,27 до 0,33 мг в 1 мл	0,30 мг/мл
2. Ацетат-ион	2. ВЭЖХ Обращенно-фазовая. От 5,0 до 15,0 ммоль/л	9,4 ммоль/л
3. Полисорбат 80	3. Спектрофотометрия. От 0,002 до 0,006 %	0,002 %
Остаточные белки штамма-производителя	ИФА. Не более 10 нг/мг филграстима – не более 3 нг/мл	Менее 3,7 нг/мг филграстима
Остаточная ДНК штамма-производителя	Молекулярная гибридизация. Не более 30 пг/мг филграстима не более 10 пг/мл	Менее 4,3 пг/мг филграстима

препарата. Аттестованное значение специфической активности ОСО принято равным (32,2±5,35) млн. МЕ/мл. Результаты определения активности ОСО в реальном времени с 2015 г. по настоящее время свидетельствуют о стабильности ОСО на данном этапе и позволяют считать достоверными результаты испытания коммерческих серий препаратов филграстима по показателю «Биологическая активность» с помощью данного ОСО. Таким образом, разработан и аттестован отраслевой стандартный образец активности филграстима.

Литература

1. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Киселевский МВ, Лысинова СЛ, Бондарев ВП, Медуницын НВ, Мосягин ВД, Меркулов ВА, Миронов АН. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Оценка качества. *Биопрепараты* 2015; (1): 4–14.
2. Aapro MS, Cameron DA, Pettengell R, Bohlius J, Crawford J, Ellis M, et al. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 2433–53.
3. Clark OA, Lyman GH, Castro AA, Clark LG, Djulbegovic B. Colony stimulating factors for chemotherapy induced febrile neutropenia [Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews. The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons; 2008.*
4. Johnston E, Crawford J, Blackwell S, Bjurstrom T, Lockbaum P, Roskos L, et al. Randomized, dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18(13): 2522–8.
5. Nakoinz I, Lee MT, Weaver JF, Ralph P. Differentiation of the IL-3-dependent NFS-60 cell line and adaption to growth in macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Immunology* 1990; 145(3): 860–4.
6. Mire-Sluis AR, Das RG, Thorpe R. The international standard for granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). Evaluation in an international collaborative study. *Participants of the Collaborative Study. J Immunol Methods* 1995; 179(1): 117–26.
7. Wadhwa M, Bird C, Hamill M, Heath AB, Matejtschuk P, Thorpe R. The 2nd International Standard for human granulocyte colony stimulating factor. *J Immunol Methods* 2011; 367(1–2): 63–9.
8. Bristow AF, Bird C, Bolgiano B, Thorpe R. Regulatory requirements for therapeutic proteins: the relationship between the con-

- formation and biological activity of filgrastim. *Pharmeuropa Bio & Scientific Notes*. 2012, 2012: 103–17.
- Gao K, Rao C, Tao L, Han C, Shi X, Wang L, Fan W, Yu L, Wang J. Development and calibration of a standard for the protein content of granulocyte colony-stimulating factor products. *Biologicals* 2012; 40(2): 151–7.
 - Фармакопейная статья предприятия ЛСП-000598-091210 с изм. № 1, 2 на «Филграстим, субстанция 30 млн. МЕ/мл».
 - Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
 - The United States Pharmacopeia — National Formulary. USP 38-Rockville, VD: The United States Pharmacopoeial Convention, 2015.
 - European Pharmacopeia 6.3. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines. 2009. Filgrastim concentrated solution. MONOGRAPH, 01/2009:2206. P. 4143–4.

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.

Мотузова Екатерина Валерьевна. Главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

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

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

Рунова Ольга Борисовна. Главный эксперт лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. хим. наук.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, д-р биол. наук.

Мыца Елена Дмитриевна. Эксперт 2-й категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское ш., 23.

Вайнсон Адольф Адольфович. Ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной радиобиологии Отдела экспериментальной радиологии НИИ клинической и экспериментальной радиологии, д-р биол. наук, профессор.

Мещерикова Валерия Викторовна. Ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной радиобиологии Отдела экспериментальной радиологии НИИ клинической и экспериментальной радиологии, канд. биол. наук.

ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум». Российская Федерация, 123317, Москва, Тестовская ул., 10.

Хамитов Равиль Аваатович. Генеральный директор, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Мотузова Екатерина Валерьевна; Motuzova@exptmed.ru

Development and certification of an industrial reference standard for determination of filgrastim activity

E. V. Motuzova¹, N. A. Alpatova¹, L. A. Gayderova¹, O. B. Runova¹, R. A. Volkova¹, E. D. Mytsa¹, V. P. Bondarev¹, A. A. Wainson², V. V. Mesharikova², R. A. Khamitov³

¹Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»

of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

²Federal State Budgetary Institution

«NN Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health

of the Russian Federation, Moscow, Russia

³International Biotechnology Center «Generium»

The article provides with the information on certification of an industrial reference standard (IRS) for determination of filgrastim activity. In order to confirm the quality of the IRS candidate, the following tests have been performed: biological activity, description, identification, clarity, colority, sterility, pH, foreign impurities, bacterial endotoxins, as well as the assay of: Filgrastim, Acetate ion, Polysorbate 80, residual Host Cell Proteins, residual Host Cell DNA. The results fully meet the requirements for filgrastim samples. The reference standard is certified for biological activity. The purpose of the IRS for determination of filgrastim activity is the assessment of acceptability of the results of biological activity tests in the quality control of substances and drugs based on filgrastim. Biological activity of the IRS candidate has been assessed by interlaboratory studies as compared against the second international standard NIBSC-09/136. The certified value for «Biological activity» of the IRS for determination of filgrastim activity has been set as 32.2±5.35 million IU/ml. The shelf-life under the storage conditions of 2 to 8°C has been set as not less than 2 years. The results of long-term stability studies the IRS confirm its stability during the monitored period.

Key words: filgrastim; industrial reference standard; biological activity; stability; shelf-life; statistical analysis.

Bibliographic description: Motuzova EV, Alpatova NA, Gayderova LA, Runova OB, Volkova RA, Mytsa ED, Bondarev VP, Wainson AA, Mesharikova VV, Khamitov RA. Development and certification of an industrial reference standard for determination of filgrastim activity. *Biopreparations. Prophylaxis, diagnostics, treatment* 2016; 16 (3): 172–178.

References

1. Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Alpatova NA, Kiselevsky MV, Lysikova SL, Bondarev VP, Medunitsyn NV, Mosyagin VD, Merkulov VA, Mironov AN. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. *Biopreparaty* 2015; (1): 4–14 (in Russian).
2. Aapro MS, Cameron DA, Pettengell R, Bohlius J, Crawford J, Ellis M, et al. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 2433–53.
3. Clark OA, Lyman GH, Castro AA, Clark LG, Djulbegovic B. Colony stimulating factors for chemotherapy induced febrile neutropenia [Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews. The Cochrane Collaboration*. Published by John Wiley & Sons; 2008.
4. Johnston E, Crawford J, Blackwell S, Bjurstrom T, Lockbaum P, Roskos L, et al. Randomized, dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18(13): 2522–8.
5. Nakoinz I, Lee MT, Weaver JF, Ralph P. Differentiation of the IL-3-dependent NFS-60 cell line and adaption to growth in macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Immunology* 1990; 145(3): 860–4.
6. Mire-Sluis AR, Das RG, Thorpe R. The international standard for granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). Evaluation in an international collaborative study. *Participants of the Collaborative Study. J Immunol Methods* 1995; 179(1): 117–26.
7. Wadhwa M, Bird C, Hamill M, Heath AB, Matejtschuk P, Thorpe R. The 2nd International Standard for human granulocyte colony stimulating factor. *J Immunol Methods* 2011; 367(1–2): 63–9.
8. Bristow AF, Bird C, Bolgiano B, Thorpe R. Regulatory requirements for therapeutic proteins: the relationship between the formation and biological activity of filgrastim. *Pharmeuropa Bio & Scientific Notes*. 2012, 2012: 103–17.
9. Gao K, Rao C, Tao L, Han C, Shi X, Wang L, Fan W, Yu L, Wang J. Development and calibration of a standard for the protein content of granulocyte colony-stimulating factor products. *Biologicals* 2012; 40(2): 151–7.
10. Manufacturer's monograph LSR-000598–091210 with changes № 1, 2 «Filgrastim, substance 30 mln ME/ml» (in Russian).
11. Glants S. *Biomedical Statistics*. Moscow: Praktika; 1999 (in Russian).
12. *The United States Pharmacopeia — National Formulary. USP 38-Rockville, VD: The United States Pharmacopoeial Convention, 2015.*
13. *European Pharmacopeia 6.3. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines. 2009. Filgrastim concentrated solution. MONOGRAPH, 01/2009:2206. P. 4143–4.*

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Motuzova EV. Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

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

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

Runova OB. Chief expert of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Chemical Sciences.

Volkova RA. Head of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods. Doctor of Biological Sciences.

Mytsa ED. 2nd professional category expert of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods.

Bondarev VP. Director of Center for Examination and Control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Federal State Budgetary Scientific Institution «N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe highway 23, Moscow 115478, Russian Federation.

Vaynson AA. Leading researcher of the Laboratory of Experimental Radiobiology of the Department of Experimental Radiology of the Institute of Clinical and Experimental Radiology. Doctor of Biological Sciences, professor.

Mescherikova VV. Leading researcher of the Laboratory of Experimental Radiobiology of the Department of Experimental Radiology of the Institute of Clinical and Experimental Radiology. Candidate of Biological Sciences.

LLC «The International Biotechnology Center "Generium"», Testovskaya street 10, Moscow 123317, Russian Federation.

Hamitov RA. Director-General. Doctor of Medical Sciences, professor.