

УДК 615.076.9:57.085:604

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455>

Обзор | Review



Оценка специфической активности препаратов эритропоэтина: современное состояние

Л.А. Гайдерова, Н.А. Алпатова[✉], С.Л. Лыскова, А.М. Гуськов, О.В. Головинская

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

✉ Алпатова Наталья Александровна; alpatova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Учитывая распространенность применения в клинической практике лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) разных производителей, при оценке их качества по показателю «Специфическая активность» важно гарантировать то, что пациенты получают сопоставимые дозы препаратов. Для гармонизации подходов в определении специфической активности необходимо применение фармакопейных биологических методов анализа и соответствующих стандартных образцов (СО) — международных (МСО) и фармакопейных (ФСО).

ЦЕЛЬ. Обобщение сведений о фармакопейных требованиях к оценке специфической активности препаратов рчЭПО, об актуальных СО и биологических методиках (*in vivo* и *in vitro*) для оценки специфической активности рчЭПО, а также анализ соответствия требованиям нормативной документации на лекарственные средства рчЭПО, зарегистрированные в Российской Федерации.

ОБСУЖДЕНИЕ. Представлена информация об особенностях структуры молекул эритропоэтинов. Профиль гликозилирования, который обуславливает различия в периодах полувыведения и скорости биodeградации препаратов рчЭПО, главным образом влияет на специфическую биологическую активность данных препаратов. Приведены фармакопейные требования к биологическим методам оценки специфической активности *in vivo*. Обобщены сведения о СО, применяемых для определения активности. Отражены проблемы, связанные с разработкой биологических методик оценки специфической активности *in vitro*, и изучены возможности их включения в фармакопеи. Проведенный анализ методов определения специфической активности лекарственных средств на основе рчЭПО российского производства позволил заключить, что используемые методы не в полном объеме соответствуют установленным требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Выявлена необходимость разработки и аттестации национального фармакопейного СО для оценки специфической активности рчЭПО с целью обеспечения потребностей производителей российских препаратов в условиях импортозамещения. Для внедрения адекватных методов анализа при оценке качества рчЭПО в соответствии с принципом 3R необходима гармонизация подходов и создание единого документа, регулирующего проведение испытаний специфической активности препаратов рчЭПО.

Ключевые слова: лекарственные препараты эритропоэтина; рекомбинантный эритропоэтин человека; рчЭПО; эпоэтин; дарбэпоэтин; специфическая активность; фармакопейные требования; биологический метод *in vivo*; биологический метод *in vitro*; стандартный образец; принцип 3R

Для цитирования: Гайдерова Л.А., Алпатова Н.А., Лысикова С.Л., Гуськов А.М., Головинская О.В. Оценка специфической активности препаратов эритропоэтина: современное состояние. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(4):443–455. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Potency evaluation of erythropoietin products: current status

Lidia A. Gaiderova, Natalia A. Alpatova , Svetlana L. Lysikova,
Alexander M. Guskov, Olga V. Golovinskaya

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051,
Russian Federation

 Natalia A. Alpatova; alpatova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Given the widespread clinical use of recombinant human erythropoietin (rhEPO) products from different manufacturers, potency assays should ensure that patients receive comparable doses of rhEPO across medicinal products. The harmonisation of approaches to potency testing requires the use of pharmacopoeial bioassays and appropriate international/pharmacopoeial reference standards (RSs).

AIM. This study aimed to summarise information on pharmacopoeial requirements, relevant RSs, and bioassays (*in vivo* and *in vitro*) for the assessment of rhEPO potency, as well as to analyse the pharmacopoeial compliance of manufacturers' specifications for rhEPO products authorised in Russia.

DISCUSSION. This article presents information on the molecular structure of erythropoietin. The glycosylation profile of erythropoietin not only accounts for most of the differences in the half-life and biodegradation rate but also significantly influences the potency of rhEPO products. The authors outlined the pharmacopoeial requirements for potency assays *in vivo*, summarised the information on RSs for potency determination, characterised the development of potency assays *in vitro*, and studied the possibility of including *in vitro* assays in pharmacopoeias. The analysis showed that some potency assays used for rhEPO products manufactured in Russia did not comply with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

CONCLUSIONS. The study identified the need to develop and certify a national pharmacopoeial RS for the potency of rhEPO in order to satisfy the demands of Russian manufacturers in the context of import substitution. To implement adequate 3R-compliant methods for rhEPO quality assessment, it is necessary to harmonise approaches to potency testing of rhEPO products and develop a consolidated document governing such testing.

Keywords: erythropoietins; recombinant human erythropoietin; rhEPO; epoetin; darbepoetin; potency; pharmacopoeial requirements; *in vivo* assay; *in vitro* assay; reference standard; 3R principle

For citation: Gaiderova L.A., Alpatova N.A., Lysikova S.L., Guskov A.M., Golovinskaya O.V. Potency evaluation of erythropoietin products: current status. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(4):443–455. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Объем рынка биотехнологических лекарственных препаратов (ЛП) в Российской Федерации стабильно увеличивается в последние годы. Так, в 2022 г. в этом рыночном сегменте прирост составил 18,8% [1]. Препараты на основе рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО) активно используются в клинической практике и входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения»¹. ЛП этой группы показаны при анемиях различного генеза, прежде всего у пациентов с хронической почечной недостаточностью, а также у пациентов с онкологическими заболеваниями при химиотерапии или больных СПИДом на фоне противовирусного лечения [2, 3].

Одним из основных показателей качества биотехнологических ЛП, в том числе рчЭПО, является специфическая активность. Оценка качества ЛП осуществляется с применением валидированных методик и соответствующих стандартных образцов (СО) как на этапе контроля в процессе производства, так и при проведении фармацевтической экспертизы. Правильность и прецизионность методов оценки специфической активности позволяют гарантировать терапевтическую эффективность применения ЛП [4, 5].

Большинство ЛП на основе рчЭПО, представленных на фармацевтическом рынке, являются биоаналогичными препаратами. Учитывая связь между биологической специфической активностью и клинической эффективностью, необходима гармонизация подходов к оценке специфической активности препаратов рчЭПО разных производителей. Для оценки активности целесообразно применять соответствующие СО – международные (МСО) или фармакопейные (ФСО), – и выражать активность в международных единицах (МЕ). Такой подход является инструментом регулирования при сопоставлении значений активности ЛП разных производителей, что необходимо для обеспечения качества и безопасности применения биоаналогичных ЛП.

Цель работы – обобщение сведений о фармакопейных требованиях к оценке специфической активности препаратов рчЭПО, об актуальных СО и биологических методиках (*in vivo* и *in vitro*) для оценки специфической активности рчЭПО, а также анализ соответствия требованиям нормативной документации на лекар-

ственные средства рчЭПО, зарегистрированные в Российской Федерации.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Структура и основные функции эндогенного эритропоэтина

Эритропоэтин (ЭПО) – гетерогенный гликопротеин, молекула которого содержит 165 аминокислотных остатков [6, 7]. Гликозилирование важно для проявления биологической активности ЭПО. Присутствие высокосиалированных гликановых структур оказывает влияние на период полувыведения *in vivo* и терапевтическую эффективность ЭПО [6, 8]. Существуют различные изоформы эндогенного ЭПО со структурными изменениями в четырех гликанах, что обеспечивает их разную биологическую активность [9].

Ген, кодирующий ЭПО человека, расположен в хромосоме 7 и предварительно транслируется в белок-предшественник, от которого далее удаляется сигнальный пептид и С-концевой аргинин и присоединяются углеводные цепи. В результате образуется гликопротеин с молекулярной массой 30–34 кДа, при этом от 35 до 45% молекулярной массы приходится на углеводные структуры, из которых 17% – на сиаловую кислоту [10]. ЭПО секретируется преимущественно почками. Молекула ЭПО стимулирует пролиферацию предшественников эритроидных клеток, а также их дифференцировку в зрелые эритроциты [11]. При достаточной оксигенации в почечных тканях мРНК ЭПО не обнаруживается, вероятно, из-за низкого уровня экспрессии гена. В условиях гипоксии транскрипция гена усиливается, и в течение 30 мин уровень мРНК может возрастать в 200 раз по сравнению с исходным. Увеличение продукции ЭПО способствует ускорению эритропоэза и повышению числа циркулирующих эритроцитов [12, 13].

На экспрессию гена ЭПО влияет фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia-inducible factor, HIF) – гетеродимер, состоящий из α - и β -субъединиц. Содержание белка HIF α определяется активностью фермента HIF-пролилгидроксилазы, снижение концентрации которой в условиях гипоксии способствует стабильности HIF α и увеличению транскрипции гена ЭПО, в результате чего при анемии продукция мРНК и синтез ЭПО быстро возрастают [14].

Биологическое действие ЭПО обусловлено взаимодействием активного центра молекулы

¹ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 23.11.2020 № 3073-р «О внесении изменений в распоряжение Правительства Российской Федерации от 12.10.2019 № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи».

со специфичными рецепторами на мембранах клеток-мишеней. Известны два типа рецепторов эритропоэтина (ЕпоR): гомодимер, состоящий из 484 аминокислот и одной углеводной цепи, и гетеродимер, включающий субъединицу ЕпоR и CD131 [2, 15]. Связывание ЭПО с мембранным рецептором ЕпоR запускает внутриклеточный механизм активации сигнального пути JAK2/STAT5, играющего основную роль в эритропоэзе [16, 17].

Механизм действия эритропоэтина

На биологическую активность ЭПО оказывает влияние период полувыведения молекулы, определяемый структурой ее углеводной части, особенно количеством остатков сиаловой кислоты на концах углеводных цепей [5]. Наличие сиаловых остатков влияет на фармакокинетику молекулы, замедляя ее деградацию и задерживая выведение из кровообращения [6, 18]. Углеводная часть молекулы гликопротеина и степень сиалирования играют важную роль в передаче различных физиологических сигналов клеткам-мишеням при связывании с мембранным рецептором. Десиалированный ЭПО обладает сильным сродством к ЕпоR и склонностью к быстрому рецептор-опосредованному захвату. Это объясняет его более короткий период полувыведения [19, 20] и более высокую активность *in vitro*, чем у интактного ЭПО [21, 22].

Фармакокинетика ЭПО также зависит от размера молекулы. В случае молекул меньшего размера происходит более быстрое удаление посредством клубочковой фильтрации [23, 24].

Таким образом, на биологическую активность препаратов рчЭПО главным образом влияет профиль гликозилирования, который обуславливает различия в периодах полувыведения и скорости биodeградации.

Лекарственные препараты эритропоэтина человека

Первый препарат рчЭПО был получен в середине 1980-х гг. и одобрен Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA)² в 1989 г. В России ЛП на основе рчЭПО применяются с начала 1990-х гг.

Высокая потребность в препаратах рчЭПО способствует росту числа биоаналогичных лекарственных средств (ЛС) данной группы. Однако разработка полностью идентичных рчЭПО разными производителями затруднена,

что связано с применением разных биотехнологических процессов получения белка, а также тем, что гликозилирование молекул ЭПО не в полной мере регулируется на генетическом уровне — даже при сходстве аминокислотной последовательности степень их гликозилирования может отличаться [25, 26]. Гликановый профиль влияет на фармакокинетику и эффективность препаратов рчЭПО, а также на иммунгенность [27, 28].

Иммунные свойства рчЭПО проявляются выработкой нейтрализующих антител как к эндогенному, так и к экзогенному ЭПО при продолжительной лекарственной терапии. Полное прекращение эритропоэза приводит к развитию у пациентов парциальной красноклеточной аплазии костного мозга — жизнеугрожающего состояния с показанием к частым трансфузиям эритроцитарной массы [29, 30].

Эпоэтин — международное непатентованное наименование (МНН) рчЭПО, который по аминокислотной последовательности, степени гликозилирования и механизму действия сходен с эндогенным ЭПО человека. В настоящее время известно о девяти видах эпоэтина (альфа, бета, гамма, дельта, ипсилон, каппа, омега, тета и зета), отличающихся профилем гликозилирования. Эпоэтины с модифицированной аминокислотной последовательностью, отличающейся и от эндогенного, и от рекомбинантного ЭПО, принято обозначать приставкой «дарб» [7].

В Российской Федерации зарегистрировано 14 ЛП на основе рчЭПО первого поколения как отечественного, так и зарубежного производства (табл. 1). ЛП рчЭПО отечественного производства в основном изготовлены из фармацевтических субстанций (ФС), внесенных в Государственный реестр лекарственных средств³. Также в реестр внесена одна ФС рчЭПО зарубежного производства.

С 2001 г. применяется ЛП рчЭПО второго поколения — дарбэпоэтин альфа. Для увеличения времени циркуляции в организме в аминокислотной последовательности молекулы было произведено пять замен, что привело к появлению двух дополнительных N-связанных гликанов. Следствием модификации является увеличение молекулярной массы, количества сиаловых кислот и величины отрицательного заряда, что обеспечивает более длительный период полувыведения дарбэпоэтина из плазмы (24 ч) по сравнению с препаратами рчЭПО (4–12 ч), и, как следствие, позволяет изменить

² Office of technology assessment, recombinant erythropoietin: payment options for medicare OTA-H-451. US Government Printing Office; 1990.

³ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

схему применения препарата — снизить дозу и увеличить период между введениями [6, 31].

Референтным препаратом дарбэпоэтина альфа является препарат Аранесп®. Срок действия патентов, защищающих его производство и продажу в Европейском союзе (ЕС), истекает, чем и обусловлена разработка и регистрация биоподобных препаратов данной группы [6]. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрированы три биоаналогичных препарата на основе дарбэпоэтина альфа отечественного производства (Дарбэстим®, Эподарба®, Лонекса®)⁴.

В препарате рчЭПО третьего поколения (Мирцера®, метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета) молекула эпоэтина бета через ε-аминогруппу группу лизина или N-концевую аминогруппу образует ковалентную связь с метоксиполиэтиленгликольбутановой кислотой. Это позволило увеличить молекулярную массу до 60 кДа, оставив неизменной белковую часть, что, в свою очередь, привело к понижению сродства активного центра молекулы ЭПО к мембранным рецепторам и пролонгации времени полувыведения (до 130 ч). Было показано, что в сравнении с эпоэтином бета конъюгат метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета в исследованиях *in vivo* обладал большей биологической активностью, чем в опытах *in vitro* [32].

Качество ЛС на основе рчЭПО оценивается в соответствии с перечнем контролируемых

показателей, методов и норм, установленных региональными или национальными фармакопеями. Первые рчЭПО зарегистрированы до введения монографии Европейской фармакопеи (ЕФ)⁵ (в 2008 г.) и общей фармакопейной статьи (ОФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)⁶ (в 2018 г.), в связи с чем нормативная документация (НД) только 65% ЛП данной группы (как российских, так и зарубежных), находящихся в обращении на территории России, полностью удовлетворяет требованиям регламентирующих документов. Приведение НД в соответствие с современными требованиями фармакопей гарантирует эффективность и безопасность ЛП, поступающих на фармацевтический рынок.

Оценка специфической активности рекомбинантного эритропоэтина человека в соответствии с фармакопейными требованиями

Биологический метод *in vivo*

Особенности фармакопейных методик оценки активности рчЭПО представлены в таблице 2.

Ранее для определения активности рчЭПО применяли методику, основанную на использовании мышей с полицитемией, индуцированной пониженным атмосферным давлением, а результаты оценивали по включению изотопа ⁵⁹Fe в эритроциты. Данная методика характеризуется

Таблица 1. Количество лекарственных средств на основе эпоэтинов, зарегистрированных в Российской Федерации
Table 1. Number of epoetin medicines approved in the Russian Federation

Международное непатентованное наименование <i>International non-proprietary name</i>	Российское производство <i>Manufactured in Russia</i>		Иностранное производство <i>Manufactured abroad</i>	
	Фармацевтическая субстанция <i>Active substance</i>	Лекарственный препарат <i>Medicinal product</i>	Фармацевтическая субстанция <i>Active substance</i>	Лекарственный препарат <i>Medicinal product</i>
Эпоэтин альфа <i>Epoetin alpha</i>	1	2	–	3
Эпоэтин бета <i>Epoetin beta</i>	2	4	–	1
Эпоэтин тета <i>Epoetin theta</i>	–	–	–	1
Дарбэпоэтин альфа <i>Darbepoetin alpha</i>	–	3	–	1
Метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета <i>Methoxy-polyethylene glycol-epoetin beta</i>	–	–	–	1

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. «–» — не зарегистрирован в Российской Федерации.
Note. –, not approved in the Russian Federation.

⁴ Там же.

⁵ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

⁶ ОФС.1.2.4.0017.18 Определение специфической активности препаратов эритропоэтина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 2. Фармакопейные требования и особенности определения специфической активности лекарственных средств на основе эритропоэтина с использованием биологического метода *in vivo*
Table 2. Pharmacopoeial requirements for, and particulars of, determining the potency of erythropoietin medicines using *in vivo* assays

Методика <i>Procedure</i>	Основные особенности методики <i>Main assay particulars</i>	Фармакопейные требования <i>Pharmacopoeia requirements</i>					
		Европейская фармакопея ⁷ <i>European Pharmacopoeia</i> ⁷	Индийская фармакопея ⁸ <i>Indian Pharmacopoeia</i> ⁸	Фармакопея США ⁹ <i>United States Pharmacopoeia</i> ⁹	ГФ РФ ¹⁰ <i>State Pharmacopoeia of the Russian Federation</i> ¹⁰	Китайская фармакопея ¹¹ <i>Pharmacopoeia of the People's Republic of China</i> ¹¹	Японская фармакопея ¹² <i>Japanese Pharmacopoeia</i> ¹²
Оценка активности по включению изотопа ⁵⁹ Fe в эритроциты полицитетических мышей <i>Activity estimation by the incorporation of ⁵⁹Fe into erythrocytes of polycythaemic mice</i>	Активность, % (95% доверительный интервал) <i>Potency, % (95% confidence interval)</i>	80–125 (от 64 до 156) <i>(from 64 to 156)</i>	0,05; 0,1; 0,2	-	80–140	10–40 5; 10; 20	
	Дозы, МЕ/мл <i>Doses, IU/mL</i>						
	Количество мышей <i>Number of mice</i>						
Оценка активности по влиянию на ретикулопоэз нормоцитетических мышей <i>Activity estimation by the effect on reticulocyte production in normocythaemic mice</i>	Активность, % (95% доверительный интервал) <i>Potency, % (95% confidence interval)</i>	20; 40; 80	80–125 (от 64 до 156) <i>(from 64 to 156)</i>	80–140	10; 20; 40	10–40 5; 10; 20	
	Дозы, МЕ/мл <i>Doses, IU/mL</i>						
	Количество мышей <i>Number of mice</i>						

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации; «–» – отсутствие в фармакопее.
Note. –, not present in the pharmacopoeia.

⁷ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.
⁸ Erythropoietin concentrated solution. Indian Pharmacopoeia. 9th ed. Vol. 3; 2022.
⁹ General Chapter 124 Erythropoietin bioassays. USP46–NF41; 2023.
¹⁰ ОФС.1.2.4.0017.18 Определение специфической активности препаратов эритропоэтина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.
¹¹ General Chapter 3522 *In vivo* test for biological activity of human erythropoietin. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 3; 2020.
¹² Epoetin alfa (Genetical recombination). Japanese Pharmacopoeia. 18th ed.; 2021.

чувствительностью, точностью и специфичностью, однако ее применение ограничивается необходимостью использования гипобарической камеры и радиоизотопов [5].

В настоящее время при определении активности рчЭПО наиболее широко применяется анализ, основанный на оценке уровня пролиферации ретикулоцитов у мышей с нормоцитемией. Ответ на введение ЛП оценивается в сравнении с СО. Протокол предполагает однократное (реже многократное) введение рчЭПО нормоцитемическим мышам с отбором крови на 5 сут и подсчетом количества ретикулоцитов с помощью проточной цитометрии [33, 34]. При анализе НД на препараты рчЭПО разных производителей установлено, что в случае 11 препаратов из 14 (79%) использовался именно этот метод для оценки специфической активности. В случае 60% препаратов рчЭПО российских производителей специфическая активность оценивается согласно требованиям ГФ РФ¹³.

В соответствии с методикой, описанной в ЕФ¹⁴, мышам линии B6D2F1 вводят по 0,5 мл одной из трех доз ЛП или биологического СО эритропоэтина (Biological Reference Preparation for erythropoietin, BRP) однократно подкожно. На каждую дозировку предусмотрена группа из 8 особей. Через 96 ч проводят отбор крови. Образцы окрашивают с использованием флуоресцентного красителя (тиазоловый оранжевый) и определяют количество ретикулоцитов с помощью проточной цитометрии. На основании полученных данных рассчитывают активность препарата, которая должна находиться в пределах от 80 до 125% от заявленной (95% доверительный интервал от 64 до 156%). Схожие требования установлены Британской¹⁵ и Индийской¹⁶ фармакопеями, а также фармакопеей США¹⁷. Следует отметить, что в Китайской фармакопее¹⁸ нет указания на конкретный СО.

Требования ГФ РФ¹⁹ к определению активности препаратов рчЭПО согласуются с рекомендованными выше, при этом указана возможность использования нескольких линий мышей (B6D2F1, гибриды F1 (CBA×C57BL/6), BALB/c), а в качестве красителя — акридиновый оранжевый.

Отмечаются различия в требованиях национальных фармакопей некоторых стран к оценке активности рчЭПО. Так, например, в Японской фармакопее²⁰ представлены отдельные монографии для эпоэтинов альфа и бета (табл. 2). Согласно методике препараты вводят по 0,2 мл ежедневно в течение 3 сут и после отбора крови на 4 сут подсчитывают количество эритроцитов с помощью счетчика клеток крови. Специфическую активность выражают в ЕД/мг белка.

Биологический метод *in vitro*

Применение метода *in vitro* допустимо только в случае получения сопоставимых результатов при определении активности двумя методами: с использованием животных и культур клеток, чувствительных к ЭПО.

Так, специфическая активность зарегистрированных²¹ в Российской Федерации препаратов Эпрекс® (эпоэтин альфа) и Аранесп® (дарбэпоэтин альфа) определяется биологическим методом *in vitro* — по оценке влияния (по сравнению с соответствующим СО) на пролиферативную активность клеток линии UT-7 и генную экспрессию на клетках линии UT7-9. Активность биоаналогичных препаратов дарбэпоэтина альфа российских производителей оценивается и *in vivo* на нормоцитемических мышах (Дарбэстим®) и *in vitro* (Эподарба® и Лонекса® ПСК).

Следует отметить, что с учетом особенностей молекулы рчЭПО, обусловленных наличием нескольких изоформ, обладающих различной фармакокинетикой и проявляющих в условиях *in vivo* и *in vitro* разную активность, имеются трудности с разработкой и валидацией метода анализа *in vitro*, применимого для всех препаратов рчЭПО [35].

Подходы к разработке фармакопейных методик *in vitro* для оценки активности рекомбинантного эритропоэтина человека

Биологические методики являются обязательными при контроле качества биотехнологических препаратов, если их эффективность не может быть адекватно подтверждена

¹³ ОФС.1.2.4.0017.18 Определение специфической активности препаратов эритропоэтина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁴ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

¹⁵ Erythropoietin concentrated solution. British Pharmacopoeia. Vol. 1; 2020.

¹⁶ Erythropoietin concentrated solution. Indian Pharmacopoeia. 9th ed. Vol. 3; 2022.

¹⁷ General Chapter 124 Erythropoietin bioassays. USP46–NF41; 2023.

¹⁸ General Chapter 3522 *In vivo* test for biological activity of human erythropoietin. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 3; 2020.

¹⁹ ОФС.1.2.4.0017.18 Определение специфической активности препаратов эритропоэтина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁰ Official Monograph Epoetin alfa (Genetical recombination). Japanese Pharmacopoeia. 18th ed.; 2021.

²¹ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

физико-химическими методами²². Однако в настоящее время согласно международным требованиям к проведению доклинических исследований актуальным является соответствие принципу 3R («замена/улучшение/сокращение», «replacement/refinement/reduction») [36]: «замена» — замена исследований, проводимых на животных; «улучшение» — пересмотр условий исследования с целью более гуманного обращения с используемыми животными; «сокращение» — использование меньшего количества животных²³.

Европейским центром по валидации альтернативных методов (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) было предложено включить тест на активность рчЭПО *in vitro* в дополнение к двум методам *in vivo*. Ожидалось, что результаты сравнительных исследований окажутся сопоставимыми и смогут продемонстрировать допустимость применения методик с использованием культур клеток вместо испытаний на мышах. Однако число проведенных экспериментов оказалось недостаточным и выводы были признаны необоснованными, в результате чего решение о включении альтернативного метода было отложено [37, 38]. Позже ECVAM были даны рекомендации исключить из ЕФ²⁴ метод А (испытания на полицитемических мышах), при этом метод В (испытания на нормоцитемических мышах) оставался единственным методом определения активности рчЭПО. Поскольку использование большого числа животных в процессе валидации лабораториями альтернативного метода было сочтено недопустимым, оставлены оба метода *in vivo* до тех пор, пока не будет разработан адекватный метод *in vitro* для их замены [37].

Необходимость разработки альтернативного биологического метода оценки специфической активности препаратов рчЭПО отражена и в Фармакопее США²⁵, согласно которой требуется подтверждение сопоставимости результатов, полученных методами *in vivo* и *in vitro*.

Отсутствие альтернативного теста *in vitro* не исключает возможности использования валидированных согласно принципу 3R методов, разработанных для отдельных препаратов, при условии, что они одобрены регуляторным органом²⁶.

Следует отметить, что методики *in vitro* имеют ряд ограничений. Так, оценка связывания ЭПО

с рецептором с использованием иммуноферментного анализа, а также методика изучения аффинности выявляют только параметры связывания молекулы ЭПО. Разработка методик исследования механизма действия ЭПО с помощью клеток различных линий (32D, NFS-60, TF-1, UT-7 и UT-7/EPO) является длительным процессом [39].

Поиск подходящих для биологических методов *in vitro* модельных клеточных линий в настоящее время продолжается. Так, в испытании с применением ЭПО-зависимой клеточной линии AS-E2 человека, чувствительной к степени сиапирования молекул ЭПО, получены данные, коррелирующие с результатами оценки активности препарата рчЭПО на полицитемических мышах *in vivo* [40]. В других исследованиях показана возможность использования клеточной линии TF-1 при изучении биологической активности рчЭПО, экспрессированного в *Escherichia coli*, в сравнении с рчЭПО, получаемым с помощью классической эукариотической системы [41], а также при сопоставлении и количественной оценке активности препаратов с различным уровнем гликозилирования [42].

Для определения биологической активности ряда ЛП в последнее время все чаще используется анализ экспрессии репортерного гена из-за простоты, надежности и высокой эффективности метода. Для подтверждения механизма действия ЛП должна быть установлена и оценена связь между событиями, индуцируемыми введением препарата (передача сигнала, экспрессия генов, изменение клеточного фенотипа). Специфическая корреляция между уровнем экспрессии люциферазы и изменениями фенотипа является обоснованием отражения механизма действия ЛП, оцениваемого с помощью анализа экспрессии репортерного гена [43].

Известно, что ЭПО активирует несколько сигнальных путей, включая JAK2/STAT5. После связывания ЭПО с рецептором происходят конформационные изменения рецептора, приводящие к активации янус-киназы 2 (JAK2) и фосфорилированию индуктора транскрипции STAT5. Белок STAT5 связывается с SIE и GAS, инициируя экспрессию генов-мишеней, что приводит к индукции эритропоэза [44]. Отмечено, что активация пути JAK2/STAT5 напрямую коррелирует с биологической активностью ЭПО [45].

²² ICH Q6B Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. CPMP/ICH/365/96. EMA; 1999.

²³ Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches (EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012). EMA; 2016.

²⁴ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

²⁵ General Chapter 124 Erythropoietin bioassays. USP46–NF41; 2023.

²⁶ Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches (EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012). EMA; 2016.

Метод оценки специфической активности ЭПО с помощью анализа экспрессии репортерного гена продемонстрировал прецизионность и достоверность определения показателей и преимущества по сравнению с исследованием ретикулоцитов *in vivo*, включая более высокую воспроизводимость и меньшую вариабельность [39].

Стандартные образцы, используемые при оценке активности препаратов эритропоэтина

Оценка специфической биологической активности должна проводиться относительно стабильного и хорошо охарактеризованного референтного образца, содержащего то же активное вещество, что и ЛП. С этой целью многие испытательные лаборатории разрабатывают «внутренние» биологические СО для конкретного активного белка. Однако это может быть сопряжено с проблемой, заключающейся в существовании различных единиц биологической активности для одного и того же активного белка и представлению значений активности в несопоставимых единицах. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) проводит утверждение международных СО (МСО) с установленной активностью в соответствующих единицах, что позволяет обеспечить достоверное и надежное сопоставление результатов, полученных в разных лабораториях [18]. Национальный институт биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) выполняет важную роль в разработке кандидатов в МСО биологических ЛП, в том числе для ЭПО. После утверждения МСО и присвоения ему значения активности в МЕ на ампулу образцы применяют для аттестации «внутренних» рабочих СО лабораторий, которые, в свою очередь, используются в повседневной практике для калибровки оборудования, проверки пригодности систем и методов, демонстрации сходства между сериями и между различными препаратами [18, 46]. Такая стратегия способствует экономии запасов МСО.

Один из первых СО ЭПО (Erythropoietin Standard A, ESA) был получен из плазмы крови овец и имел активность 10 ЕД/ампула. Следующий СО (Erythropoietin Standard B, ESB) представлял собой человеческий эндогенный

ЭПО, выделенный из мочи пациентов, и его активность составляла 10 ЕД/ампула относительно ESA. В 1964 г. ВОЗ одобрил данный образец в качестве МСО эритропоэтина (International Reference Preparation of Erythropoietin, IRPE) [47, 48]. В 1971 г. на основании результатов межлабораторных сравнительных исследований относительно IRPE был одобрен Второй МСО эритропоэтина человеческого уринарного для биоанализа (Second International Reference Preparation of Erythropoietin, 2nd IRP) с активностью 10 МЕ/ампула [49].

С появлением препаратов на основе рчЭПО в соответствии с процедурами, рекомендованными ВОЗ, были аттестованы и утверждены МСО рекомбинантного эпоэтина альфа, которые широко используются для определения специфической активности биологическим методом *in vivo*.

В 1990 г. Экспертный комитет по биологической стандартизации (Expert Committee on Biological Standardization) ВОЗ утвердил СО с кодом NIBSC 87/684²⁷ в качестве МСО рчЭПО с активностью 86 МЕ/ампула. По результатам межлабораторных исследований (26 лабораторий в 11 странах) было рекомендовано применять отдельные СО для эндогенного уринарного эритропоэтина и для рчЭПО, так как были выявлены различия между ними [50]. Также были охарактеризованы три кандидата в МСО, один из которых (код 88/574) в 2003 г. был утвержден²⁸ в качестве второго МСО рчЭПО (Second WHO International Standard for Erythropoietin, Human Recombinant, 2nd IS)²⁹ с активностью 120 МЕ/ампула с уточнением, что эта активность может оказаться непригодной для других видов анализа, кроме *in vivo*. Позже второй МСО рчЭПО был заменен на новый СО, аттестованный на основании отчета о результатах международных сравнительных испытаний относительно второго МСО с участием 15 экспертных лабораторий из 7 стран³⁰.

В 2012 г. ВОЗ кандидат с кодом NIBSC 11/170³¹ и активностью 1650 МЕ/ампула был рекомендован в качестве третьего МСО рчЭПО для биологических методов (Third International Standard for Erythropoietin, Recombinant, for Bioassay, 3rd IS), который в настоящее время является действующим³².

²⁷ Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches (EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012). EMA; 2016.

²⁸ WHO Expert Committee on Biological Standardization, fifty-third report. WHO Technical Report Series, No. 926. WHO; 2003.

²⁹ WHO International Standard Erythropoietin, Human Recombinant NIBSC code: 88/574. <https://nibsc.org/documents/ifu/88-574.pdf>

³⁰ Burns C. WHO International Collaborative study of the proposed 3rd International Standard for Erythropoietin, recombinant, for bioassay (WHO/BS/2012.2195). WHO; 2012.

³¹ WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-third report. WHO Technical Report Series, No. 980. WHO; 2013.

³² https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/who_standards.aspx

Для определения специфической активности ЭПО биологическим методом *in vivo* согласно требованиям ЕФ³³ требуется применение биологического СО (Biological Reference Preparation for Erythropoietin, BRP). В 1997 г. был разработан первый стандартный образец BRP, состоявший из равных количеств эпоэтина альфа и эпоэтина бета (50:50), а возможность его применения и для физико-химических, и для биологических методов анализа была обусловлена отсутствием в его составе стабилизатора белковой природы [51, 52].

В 2003 г. Европейским директором по качеству лекарственных средств (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, EDQM) был утвержден биологический СО эритропоэтина серии 2 (BRP2). В международных сравнительных исследованиях с участием 14 лабораторий была подтверждена преемственность между BRP1 и BRP2, присвоена активность 32500 Ед/флакон, а также доказана пригодность образца для стандартизации биологических и физико-химических методов анализа, включая капиллярный зональный электрофорез, электрофорез в полиакриламидном геле, иммуноблоттинг, пептидное картирование, эксклюзионную хроматографию [51]. В ходе аттестации образца было отмечено, что при калибровке BRP2 по второму МСО значение активности было систематически выше заявленных в предыдущем межлабораторном исследовании, в связи с чем было рекомендовано назначить активность BRP3 по BRP2, чтобы гарантировать преемственность единиц между последовательными сериями BRP. В 2007 г. образец был утвержден в качестве биологического СО эритропоэтина серии 3 (BRP3) с активностью 35280 МЕ/флакон [53]. Для уменьшения частоты обновления серий СО EDQM было принято решение о разделении назначения образцов и создании в 2014 г. химического СО эритропоэтина (Erythropoietin for Physicochemical Tests, Chemical Reference Substance, CRS), предназначенного исключительно для физико-химических методов оценки качества препаратов рчЭПО [52, 54]. В 2014 г. утверждена четвертая серия BRP (BRP4) с активностью 13000 МЕ/флакон, которая предназначалась для биологических методов анализа на полицитетических и нормоцитетических

мышцах [55]. В 2018 г. для использования *in vivo* была утверждена пятая серия биологического СО (BRP5) с активностью 2000 МЕ/флакон, действующая в настоящее время [56].

В связи с истечением срока действия патентов на дарбэпоэтин альфа ожидалось появление биоподобных препаратов этой группы. В связи с этим в 2020 г. был разработан, изучен в межлабораторных исследованиях и утвержден первый МСО дарбэпоэтина с кодом 17/204 и активностью 100000 МЕ/ампула, предназначенный для оценки активности препаратов дарбэпоэтина *in vitro* [57].

Обобщенная информация о международных и региональных СО рчЭПО для определения специфической биологической активности представлена в *таблице 3* (опубликована на сайте журнала³⁴). В Британской³⁵ и Индийской³⁶ фармакопеех, а также в фармакопее США³⁷ в качестве СО рчЭПО указаны BRP, СО фармакопеи США (United States Pharmacopeia Reference Standard, USP RS) и СО Индийской фармакопеи (Indian Pharmacopoeia Reference Standard, IPRS) соответственно. В Китайской Фармакопее³⁸ нет указания на конкретный СО, однако в отчете ВОЗ³⁹ упоминается, что в 2012 г. проводились сравнительные исследования Китайского национального вторичного СО эритропоэтина с вторым и третьим МСО.

Следует отметить, что в Российской Федерации также проводились разработки СО эпоэтинов альфа и бета, однако сроки их действия в настоящее время истекли [52].

Утвержденные МСО, являясь инструментами поддержания качества, способствуют расширению рынка биоподобных препаратов рчЭПО. Однако в условиях санкционных ограничений их доступность в Российской Федерации резко снизилась. В данных обстоятельствах на первый план выходят задачи по разработке национальных фармакопейных СО для контроля качества биотехнологических препаратов, в том числе рчЭПО [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного анализа нормативных документов на зарегистрированные в России препараты рекомбинантного эритропоэтина человека показано, что специфическая активность не всех лекарственных средств

³³ 07/2021:1316 Erythropoietin concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

³⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455-table3>

³⁵ Erythropoietin concentrated solution. British Pharmacopoeia. Vol. 1; 2020.

³⁶ Erythropoietin concentrated solution. Indian Pharmacopoeia. 9th ed. Vol. 3; 2022.

³⁷ General Chapter 124 Erythropoietin bioassays. USP46–NF41; 2023.

³⁸ General Chapter 3522 *In vivo* test for biological activity of human erythropoietin. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. 3; 2020.

³⁹ WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-third report. WHO Technical Report Series, No. 980. WHO; 2013.

данной группы оценивается биологическим методом *in vivo* в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации. Для стандартизации методик и унификации единиц оценки специфической биологической активности рчЭПО необходимо применение международных стандартных образцов. Однако в условиях санкционных ограничений их доступность снизилась, что определяет необходимость разработки и утверждения внутренних стандартных образцов, аттестованных по международным. Отсутствие в России фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рчЭПО обуславливает важность его разработки и аттестации с целью обеспечения потребностей производителей российских препаратов в условиях импортозамещения.

Учитывая современные тенденции к сокращению использования животных при проведении различных исследований, в том числе и при экспертизе качества лекарственных средств, в настоящее время изучаются возможности разработки и внедрения адекватных методов анализа *in vitro*, позволяющих свести к минимуму использование животных согласно принципу 3R (replacement/refinement/reduction), однако переход к его применению при оценке качества рчЭПО представляет собой настоящее время труднореализуемую задачу. В связи с этим необходима гармонизация подходов для создания единого документа, регулирующего проведение исследований специфической активности препаратов рчЭПО в соответствии с принципом 3R.

Литература/References

1. Халимова АА, Орлов АС, Таубэ АА. Анализ локализации производства биотехнологических лекарственных препаратов в России с учетом происхождения активных фармацевтических субстанций. Биотехнологические лекарственные препараты. *Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(1):54–61. Khalimova AA, Orlov AS, Taube AA. Analysis of biopharmaceutical manufacturing localisation in Russia considering the country of origin of active pharmaceutical ingredients. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(1):54–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-1-53-61>
2. Broxmeyer HE. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *J Exp Med*. 2013;210(2):205–8. <https://doi.org/10.1084/jem.20122760>
3. Толкушин АГ, Холownia-Волоскова МЭ, Завьялов АА, Лучинин ЕА. Обзор потребления лекарственных препаратов в рамках льготного лекарственного обеспечения пациентов с некоторыми злокачественными новообразованиями лимфатической и кроветворной ткани на территории г. Москвы в 2019 г. *Современная организация лекарственного обеспечения*. 2021;8(3):22–31. Tolkushin AG, Holownia-Voloskova ME, Luchinin EA, Zavyalov AA. Review of drug consumption within the framework of preferential drug provision for patients with certain malignant neoplasms of lymphatic and hematopoietic tissues in Moscow in 2019. *Modern Organization of Drug Supply*. 2021;8(3):22–31 (In Russ.). <https://doi.org/10.30809/solo.3.2021.3>
4. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Саркисян КА, Мовсисянц АА, Меркулов ВА, Косенко ВВ. Требования к материалам раздела по стандартным образцам, представляемым в досье на биологические лекарственные средства. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):7–20. Volkova RA, Fadeikina OV, Ustinnikova OB, Sarkisyan KA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Kosenko VV. Requirements for the information on reference standards submitted in the dossier for biologicals. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):7–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-7-20>
5. Ramos AS, Schmidt CA, Andrade SS, Fronza M, Rafferty B, Dalmora SL. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(11):1561–9. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003001100014>
6. Cowper B, Hockley J, Partridge K, Ferguson J, Rigsby P, Burns Ch. The first World Health Organization International Standard for *in vitro* biological activity of darbepoetin. *Biologicals*. 2020;(63):33–8. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.004>
7. Меркулов ВА, Солдатов АА, Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Медуницын НВ. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2013;(3):4–11. Merkulov VA, Soldatov AA, Avdeeva ZH, Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Medunitsyn NV. Recombinant erythropoietin preparations and their characteristics. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2013;(3):4–11 (In Russ.). EDN: [RDXVGT](https://dx.doi.org/10.1016/j.jexcr.2012.02.035)
8. Tanaka T, Nangaku M. Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):1068–73. <https://doi.org/10.1016/j.jexcr.2012.02.035>
9. 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. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.08.004>
10. Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem*. 1987;262(25):12059–76. PMID: 3624248
11. Molineux G, Sinclair AM. Biology of erythropoietin. In: Elliott SG, Foote MA, Molineux G, eds. *Erythropoietins, erythropoietic factors, and erythropoiesis. Milestones in drug therapy*. Basel: Birkhäuser; 2009. P. 41–60. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8698-6_3
12. Jelkmann W. Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(5):302–9. <https://doi.org/10.1159/000356193>
13. Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(3):a011619. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011619>
14. Moradi Z, Maali A, Shad JS, Farasat A, Kouchaki R, Moghadami M, et al. Updates on novel erythropoiesis-stimulating agents: clinical and molecular approach. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2020;36(1):26–36. <https://doi.org/10.1007/s12288-019-01170-1>
15. Варламова ОН, Червяковская ОД. Эритропоэтин и его биологическая роль. *Медицина. Теория и практика*. 2019;4(3):61–69. Varlamova ON, Chervyakovskaya OD.

- Erythropoietin and its biological role. *Medicine. Theory and Practice*. 2019;4(3):61–69 (In Russ.). EDN: [NWDVPG](#)
16. Иваненко КА, Прасолов ВС, Хабушева ЭР. Транскрипционный фактор Sp1 в регуляции экспрессии генов, кодирующих компоненты сигнальных путей MAPK, JAK/STAT и PI3K/Akt. *Молекулярная биология*. 2022;56(5):832–47. <https://doi.org/10.31857/S0026898422050081>
- Ivanenko KA, Prassolov VS, Khabusheva ER. Transcription factor Sp1 in the expression of genes encoding components of MAPK, JAK/STAT, and PI3K/Akt signaling pathways. *Molecular Biology*. 2022;56(5):756–69. <https://doi.org/10.1134/s0026893322050089>
17. Peng B, Kong G, Yang C, Ming Y. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation. *Cell Death Dis*. 2020;11(2):79. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2276-8>
18. Meager A. Measurement of cytokines by bioassays: theory and application. *Methods*. 2006;8(4):237–52. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.005>
19. Moore E, Bellomo R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-3>
20. Takeuchi M, Takasaki S, Shimada M, Kobata A. Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 1990;265(21):12127–30. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38318-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38318-8)
21. Dong YJ, Kung C, Goldwasser E. Receptor binding of asialoerythropoietin. *J Cell Biochem*. 1992;48(3):269–76. <https://doi.org/10.1002/jcb.240480307>
22. Imai N, Higuchi M, Kawamura A, Tomonoh K, Oh-Eda M, Fujiwara M, et al. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin: suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin *in vitro*. *Eur J Biochem*. 1990;194(2):457–62. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15639.x>
23. Zimmermann H, Gerhard D, Hothorn LA, Dingermann T. An alternative to animal testing in the quality control of erythropoietin. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2011;2011(1):66–80. PMID: 21619857
24. Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A, Takasaki S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood*. 1995;86(11):4097–104. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.11.4097.bloodjournal86114097>
25. Hua S, Oh MJ, Ozcan S, Seo YS, Grimm R, An HJ. Technologies for glycomic characterization of biopharmaceutical erythropoietins. *Trends Anal Chem*. 2015;68:18–27. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.004>
26. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*. 2001;98(13):3626–34. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.13.3626>
27. Zhang P, Woen S, Wang T, Liau B, Zhao S, Chen C, et al. Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discovery Today*. 2016;21(5):740–65. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.006>
28. Lamanna WC, Holzmann J, Cohen HP, Guo X, Schweigler M, Stangler Th, et al. Maintaining consistent quality and clinical performance of biopharmaceuticals. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(4):369–79. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1421169>
29. Susantad T, Fuanthong M, Tharakaraman K, Tit-Oon P, Ruchirawat M, Sasisekharan R. Modified recombinant human erythropoietin with potentially reduced immunogenicity. *Sci Rep*. 2021;11(1):1491. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80402-1>
30. Петренко АА, Пивник АВ, Дудина ГА, Дубницкая МГ. Парциальная красноклеточная аплазия костного мозга в сочетании с тимомой. Обзор литературы и собственные данные. *Терапевтический архив*. 2019;91(7):121–6. Petrenko AA, Pivnik AV, Dudina GA, Dubnitskaya MG. Pure red cell aplasia of the bone marrow in combination with thymoma. A literature review and own data. *Therapeutic Archive*. 2019;91(7):121–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.26442/00403660.2019.07.000326>
31. Macdougall IC. Novel erythropoiesis stimulating protein. *Semin Nephrol*. 2000;20(4):375–81. PMID: 10928340
32. Macdougall IC, Robson R, Opatrna S, Lioquier X, Pannier A, Jordan P, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(6):1211–5. <https://doi.org/10.2215/cjn.00730306>
33. Barth T, Oliveira PR, D'Avila FB, Dalmora SL. Validation of the normocytemic mice bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. *J AOAC Int*. 2008;91(2):285–91. <https://doi.org/10.1093/jaoac/91.2.285>
34. Яковлев АК, Гайдерова ЛА, Подкуйко ВН, Волкова РА, Алпатова НА, Олефир ЮВ. Изучение возможности гармонизации метода определения специфической активности рекомбинантных эритропоэтинов с требованиями Европейской фармакопеи. *Эталон. Стандартные образцы*. 2016;(3):4–11. Yakovlev AK, Gayderova LA, Podkuiko VN, Volkova RA, Alpatova NA, Olefir YuV. The possibility of harmonizing the recombinant erythropoietin specific activity determination method with European Pharmacopoeia. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2016;(3):4–11 (In Russ.). EDN: [XHDFRJ](#)
35. Metta MK, Malkhed V, Tantravahi S, Vuruputuri U, Kunaparaju R. Development of an *in vitro* bioassay for recombinant human erythropoietin (rHuEPO) based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of sialic acid dependent microheterogeneity: UT-7 cell bioassay. *Protein J*. 2017;36(2):112–22. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9704-3>
36. Obora S, Kurosawa T. Implementation of the three Rs in biomedical research – has the turn of the century turned the tide? *Altern Lab Anim*. 2009;37(2):197–207. <https://doi.org/10.1177/026119290903700209>
37. Lang C, Kolaj-Robin O, Cirefice G, Taconet L, Pel E, Jouette S, et al. Replacement, reduction, refinement-animal welfare progress in European Pharmacopoeia monographs: activities of the European Pharmacopoeia Commission from 2007 to 2017. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2018;2018:12–36. PMID: 29845933
38. Machado FT, Maldaner FP, Perobelli RF, Xavier B, da Silva FS, de Freitas GW, et al. Evaluation of an *in vitro* cell culture assay for the potency assessment of recombinant human erythropoietin. *Altern Lab Anim*. 2016;44(2):113–20. <https://doi.org/10.1177/026119291604400207>
39. Yang Y, Zhou Y, Yu L, Li X, Shi X, Qin X, et al. A novel reporter gene assay for recombinant human erythropoietin (rHuEPO) pharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;100:316–21. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.003>
40. Liefoghe EC, Tiplady R, Gerson P, Lloyd P, Heath A, Bristow AF. A sialylation-sensitive cell-based *in vitro* bioassay for erythropoietin; incorporation of the galactose-binding *Erythrina crista-galli* lectin. *Biologicals*. 2005;33(3):161–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.05.001>
41. Jeong TH, Son YJ, Ryu HB, Koo BK, Jeong SM, Hoang P, et al. Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 2014;95:211–8. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.01.001>
42. Гаврилова НА, Черепушкин СА, Рыкалина НВ, Обухов ЮИ. Разработка метода определения биологической активности препаратов эритропоэтина *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(2):120–4. 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):120–4 (In Russ.). EDN: [WAIVXP](#)
43. Wang L, Yu Ch, Junzhi Wang J. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuti-

- ticals. *Biotechnol Adv.* 2020;39:107466.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107466>
44. Shi Z, Hodges VM, Dunlop EA, Percy MJ, Maxwell AP, El-Tanani M, et al. Erythropoietin-induced activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK pathways promotes malignant cell behavior in a modified breast cancer cell line. *Mol Cancer Res.* 2010;8(4):615–26.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0264>
45. Ma R, Hu J, Huang C, Wang M, Xiang J, Li G. JAK2/STAT5/Bcl-xL signalling is essential for erythropoietin-mediated protection against apoptosis induced in PC 12 cells by the amyloid β -peptide A β 25–35. *Br J Pharmacol.* 2014;171(13):3234–45. <https://doi.org/10.1111/bph.12672>
46. Tu H, Carrick K, Potts R, Hasselberg M, Verdecia M, Burns C, et al. A reference standard for analytical testing of erythropoietin. *Pharm Res.* 2022;39(3):553–62.
<https://doi.org/10.1007/s11095-022-03213-1>
47. Camiscoli JF, Weintraub AH, Gordon AS. Comparative assay of erythropoietin standards. *Ann N Y Acad Sci.* 1968;149(1):40–5.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb15133.x>
48. Cotes PM, Bangham DR. The international reference preparation of erythropoietin. *Bull World Health Organ.* 1966;35(5):751–60. PMID: 5297809
49. Annable L, Cotes PM, Mussett MV. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull World Health Organ.* 1972;47(1):99–112. PMID: 4538911
50. Storrang 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(3):459–84.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1340459>
51. Behr-Gross ME, Daas A, Bristow AF. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 2. *Pharmeuropa Bio.* 2004;(1):23–33. PMID: 15659283
52. Яковлев АК, Гайдерова ЛА, Алпатова НА, Лобанова ТН, Постнова ЕЛ, Юрчикова ЕИ и др. Изучение принципов стандартизации фармакологической активности препаратов рекомбинантных эритропоэтинов. *Эталон. Стандартные образцы.* 2016;(1):8–20. Yakovlev AK, Gayderova LA, Alpatova NA, Lobanova TN, Postnova EL, Yurchikova EI, et al. Studying of the standardization principles of pharmacological activity of recombinant erythropoietin preparations. *Measurement Standards. Reference Materials.* 2016;(1):8–20 (In Russ.). EDN: VXXVOJB
53. Behr-Gross ME, Daas A, Burns C, Bristow AF. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 3. *Pharmeuropa Bio.* 2007;(1):49–66. PMID: 18413137
54. Burns C, Bristow AF, Buchheit KH, Daas A, Wierer M, Costanzo A. Establishment of the Ph. Eur. erythropoietin chemical reference substance batch 1. *Pharmeuropa Bio Sci Notes.* 2015;2015:99–117. PMID: 26830161
55. Burns C, Bristow AF, Daas A, Costanzo A. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 4. *Pharmeuropa Bio Sci Notes.* 2015;2015:246–53. PMID: 26830170
56. Ferguson J, Burns CJ, Regourd E, Costanzo A. Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 5. *Pharmeuropa Bio Sci Notes.* 2019;2019:27–33. PMID: 30880683
57. Cowper B, Hockley J, Partridge K, Ferguson J, Rigsby P, Burns C. The first World Health Organization International Standard for *in vitro* biological activity of darbepoetin. *Biologicals.* 2020;63:33–8.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.004>
58. Jelkmann W. Efficacy of recombinant erythropoietins: is there unity of international units? *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(5):1366–8. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp058>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.А. Гайдерова** — концепция и дизайн исследования, окончательное утверждение версии статьи для публикации; **Н.А. Алпатова** — идея исследования, написание текста рукописи, формулировка выводов исследования; **С.Л. Лысикова** — обобщение материалов исследования, интерпретация результатов; **А.М. Гуськов** — сбор данных литературы, оформление списка литературы, дизайн таблиц; **О.В. Головинская** — сбор, систематизация и обобщение данных литературы, дизайн таблиц.

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещена таблица 5.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455-table3>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.A. Gaiderova** conceptualised and designed the study, and approved the final version of the manuscript for publication. **N.A. Alpatova** conceived the idea of the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **S.L. Lysikova** generalised the materials and interpreted the results of the study. **A.M. Guskov** collected literature data, prepared the list of references, and designed the tables. **O.V. Golovinskaya** collected, collated, and summarised data, and designed the tables.

Additional information. Table 5 is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-4-443-455-table3>

Об авторах / Authors

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук / **Lidia A. Gaiderova**, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Алпатова Наталья Александровна, д-р биол. наук / **Natalia A. Alpatova**, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Лысикова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук / **Svetlana L. Lysikova**, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

Гуськов Александр Михайлович / **Alexander M. Guskov**
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4523-5316>

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук / **Olga V. Golovinskaya**, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Поступила 31.07.2024

После доработки 10.10.2024

Принята к публикации 06.12.2024

Received 31 July 2024

Revised 10 October 2024

Accepted 6 December 2024