

ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ, РАЗРАБОТКА И ПРОИЗВОДСТВО СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

MATERIAL ANALYSIS, DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF REFERENCE MATERIALS

Статья поступила в редакцию 13.03.2016,
доработана 11.04.2016

DOI 10.20915/2077-1177-2016-0-1-8-20
УДК 615.273.2

ИЗУЧЕНИЕ ПРИНЦИПОВ СТАНДАРТИЗАЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭРИТРОПОЭТИНОВ

Яковлев А.К., Гайдерова Л.А., Алпатова Н.А., Лобанова Т.Н., Постнова Е.Л.,
Юрчикова Е.И., Батуашвили Т.А., Волкова Р.А., Подкуйко В.Н., Олефир Ю.В.

В статье проведен анализ публикаций, посвященных структуре, функциям, механизму действия эритропоэтина. Препараты эритропоэтина на основе технологии рекомбинантной ДНК представляют собой смесь изоформ с различной биологической активностью, которые определяют биологические свойства, фармакологическую активность, фармакокинетику, терапевтическую эффективность и безопасность лекарственного средства. Несмотря на множественность и разнонаправленность действия лекарственных препаратов эритропоэтина, при их выпуске фармакологическая активность контролируется только по способности стимулировать эритропоэз, по которой и дозируется, и применяется препарат. Для оценки качества эритропоэтина в РФ производители применяют международный стандартный образец, европейский биологический референс-препарат или откалиброванные по ним стандартные образцы предприятия. Показана актуальность разработки отечественных стандартных образцов для определения биологической активности и оценки физико-химических показателей препаратов эритропоэтина на основе технологии рекомбинантной ДНК.

Ключевые слова: эритропоэтин, фармакологическая активность, принципы стандартизации, структура и функции эритропоэтина, стандартный образец.

✓ **Ссылка при цитировании:** Изучение принципов стандартизации фармакологической активности препаратов рекомбинантных эритропоэтинов / А. К. Яковлев и др. // Стандартные образцы. 2016. № 1. С. 8–20.

Авторы:**ЯКОВЛЕВ А.К.**

Ведущий микробиолог лаборатории иммунологии
Испытательного центра экспертизы качества МИБП
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский
бульвар, 8
Тел.: 8 (985) 994-09-63
E-mail: YAK.Aleksey@gmail.com

ГАЙДЕРОВА Л.А.

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

АЛПАТОВА Н.А.

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

ЛОБАНОВА Т.Н.

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

ПОСТНОВА Е.Л.

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

ЮРЧИКОВА Е.И.

Инженер-лаборант лаборатории вирусных вакцин
Испытательного центра экспертизы качества МИБП

БАТУАШВИЛИ Т.А.

Главный эксперт лаборатории фармакологии
Испытательного центра экспертизы качества ЛС,
канд. биол. наук

ВОЛКОВА Р.А.

Начальник лаборатории молекулярно-биологических
и генетических методов испытаний Испытательного
центра экспертизы качества медицинских иммуно-
биологических препаратов ФГБУ «Научный центр
экспертизы средств медицинского применения»
Минздрава России, д-р биол. наук

ПОДКУЙКО В.Н.

Старший научный сотрудник, эксперт 1-й категории
Управления экспертизы противовирусных МИБП
Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук

ОЛЕФИР Ю.В.

Генеральный директор ФГБУ «Научного центра
экспертизы средств медицинского применения»
Минздрава России, д-р мед. наук

Используемые сокращения:

рчЭПО – рекомбинантный человеческий эритропоэтин;
ХПН – хроническая почечная недостаточность;
МНН – международное непатентованное название;
EPOR – рецептор эритропоэтина;

CD – кластер дифференцировки;
BFU-E – бурстобразующая эритроидная единица;
CFU-E – колониеобразующая эритроидная единица.

Введение

В Российской Федерации, по данным государственного реестра лекарственных средств Министерства здравоохранения, зарегистрировано 14 препаратов рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭПО), 7 из них – российские, а остальные разработаны за рубежом [1]. Лекарственные средства этой группы входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения [2]. За последние два десятилетия они были использованы более чем у миллиона пациентов [3], преимущественно с хронической почечной недостаточностью (ХПН) [4, 5, 6]. Применение препаратов эритропоэтина позволяет устранить анемический синдром, уменьшить потребность

в гемотрансфузиях, снизить инфекционную заболеваемость, повысить качество жизни [7, 8, 9]. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов человека являются одними из первых успешно применяемых в медицинской практике биотехнологических лекарственных средств. Для оценки их качества необходимы стандартные образцы, которые в настоящее время приходится закупать за рубежом. Разработка отечественных стандартных образцов для оценки качества лекарственных средств является одной из приоритетных задач Научного центра экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ [10]. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств при разработке стандартных образцов предусматривает соблюдение технических требований к оборудованию и средствам измерения,

количеству и однородности образцов, качеству стекла, консервантов и наполнителей, точности розлива, процессам замораживания, лиофилизации, запайки ампул и др. [11]. При выборе кандидата в стандартный образец, предназначенного для контроля лекарственных препаратов на основе эритропоэтина, необходимо учитывать его сложную структуру и особенности фармакокинетики и фармакодинамики. Однако в настоящее время общие принципы стандартизации фармакологической активности и, соответственно, методики оценки специфической активности эритропоэтина не разработаны.

Целью работы является изучение принципов стандартизации фармакологической активности эритропоэтинов на основе анализа особенностей структуры, функции, механизма действия и фармакокинетики эритропоэтинов.

История изучения эритропоэтина насчитывает более ста лет. В 1906 году профессор медицины Поль Карно (Paul Carnot) и его помощница Клотильда Дефландр (Clotilde Deflandre) сформулировали идею гуморального регулирования эритропоэза. Термин «Эритропоэтин» был предложен Евой Бонсдорф (Eva Bonsdorff) и Евой Ялависто (Eeva Jalavisto) из Хельсинки в 1948 году [12]. Ген эритропоэтина был клонирован в 1983 году, а в 1985 году начались клинические исследования первого лекарственного препарата рчЭПО [13]. Несмотря на более чем столетнюю историю изучения эритропоэтина ежегодно публикуется более 800 статей, посвященных эритропоэтину, что указывает на интерес к данной теме и ее актуальность.

Структура, свойства и механизм действия эритропоэтина

Эритропоэтин – это цитокин, который регулирует эритропоэз, стимулируя созревание эритроцитов. Продолжительность жизни эритроцитов составляет 100–120 суток, после чего они поглощаются макрофагами в костном мозге, селезенке и печени. Эти потери восполняются новыми эритроцитами, которые продуцируются в костном мозге ежесекундно в количестве около 2,5 миллиона [14]. Основным местом синтеза эритропоэтина в эмбриональном периоде служит печень [15], в постнатальном – почки [16, 17], 10–15 % синтезируется гепатоцитами и эпителиальными клетками, окружающими центральные вены. Продукция эритропоэтина имеет обратную зависимость от парциального давления кислорода в крови [18].

Эритропоэтин представляет собой кислый гликопротеин, молекулярная масса которого зависит от степени

гликозилирования молекулы. Протеиновая часть молекулы эритропоэтина человека состоит из 165 аминокислотных остатков с молекулярной массой 18,398 кДа [19], которые формируют четыре антипараллельные альфа-спирали [20] с двумя бета-складками и двумя внутренними дисульфидными связями между цистеинами в положении 7–161 и 29–33 [21, 22], которые необходимы для проявления биологической активности [23]. Белковая часть молекулы эритропоэтина является стабильной структурой, а углеводная часть может меняться и достигать 39 % его молекулярной массы [24], при этом около 17 % всех углеводных компонентов приходится на сиаловую кислоту [25]. Гликозилирование приводит к образованию нескольких биологически активных форм эритропоэтина с различной молекулярной массой и биологической активностью. Структура олигосахаридных цепей в рекомбинантном эритропоэтине зависит от клеток-продуцентов и условий их культивирования [19, 26, 27]. В связи с этим лекарственные препараты рчЭПО, выпускаемые разными производителями, имеют отличия по степени гликозилирования, кроме этого в состав препарата входит несколько изоформ с различной степенью гликозилирования. Требования к процентному соотношению изоформ изложены в табл. 1.

Таблица 1

Требования Европейской фармакопеи к содержанию изоформ при определении подлинности эпоэтинов [28]

Наименование	Содержание изоформ, %
Изоформа 1	0–15
Изоформа 2	0–15
Изоформа 3	1–20
Изоформа 4	10–35
Изоформа 5	15–40
Изоформа 6	10–35
Изоформа 7	5–25
Изоформа 8	0–15

Все это оказывает влияние на показатели качества, безопасность и эффективность применения данных препаратов. Особенности гликозилирования эритропоэтина отражают в международном непатентованном названии (МНН) путем добавления к основному наименованию буквы греческого алфавита. В настоящее время существует девять МНН (эпоэтины альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон, каппа, омега, тета и дзета).

Тип и степень гликозилирования молекулы эритропоэтина влияют на фармакокинетику эритропоэтина, его

иммуногенные свойства, они важны для проявления его биологической активности в условиях *in vivo*. Сиаловые кислоты, входящие в состав углеводной части эритропоэтина, маскируют сахара, являющиеся антигенными детерминантами данного гликопротеина [29, 30, 31, 32]. При отщеплении сиаловых кислот концевым сахаром становится галактоза, такие белки поглощаются клетками печени [33, 34] и не достигают клеток-мишеней, что влияет отрицательно на фармакокинетику препарата и в конечном счете на его эффективность. Чем больше сиаловых остатков в молекуле рчЭПО, тем дольше он циркулирует в организме. В условиях *in vitro* асиалированный эритропоэтин обладает большей биологической активностью по сравнению с сиалированным, что объясняется большей аффинностью связывания его с рецепторами [35]. Именно наличие нескольких изоформ с различной биологической активностью, не охарактеризованной в настоящее время в полном объеме с точки зрения механизма действия, не позволяет использовать физико-химические методы для определения специфической активности препаратов эритропоэтина и приводит к отрицательной корреляции между результатами определения биологической активности методами *in vivo* и *in vitro* [36] без предварительного удаления асиалированного эритропоэтина [37]. Все эти данные указывают на существенную роль структуры углеводного компонента в молекуле эритропоэтина для проявления специфической активности *in vivo*. Кроме того, метод определения специфической активности препаратов данной группы должен максимально моделировать механизм их действия при терапевтическом применении.

Эритропоэтины различаются по составу и структуре из-за отличий в технологии их получения у различных производителей, поэтому для оценки качества препаратов рчЭПО целесообразно использовать такие физико-химические и биологические методы, которые позволили бы оценить потенциальное подобие или различие их фармакологической активности, то есть корреляцию результатов оценки каждого показателя и результатов доклинических исследований эффективности и безопасности. Особое значение это приобретает при оценке качества препаратов рчЭПО, которые регистрируются как биоаналоговые (биоподобные) препараты, где необходимо подтверждение их структурно-функционального подобия референтному препарату, так как структурно-функциональные особенности таких препаратов определяют их биологические свойства, фармакологическую активность, фармакокинетику, обеспечивая терапевтическую эффективность и безопасность.

Биологические эффекты молекулы эритропоэтина осуществляются посредством связывания активного центра со специфическими мембранными рецепторами клетки-мишени. На сегодняшний день известно два типа рецепторов: гомодимер (EPOR) и гетеродимер, состоящий из специфической субъединицы EPOR и CD 131, являющегося β -цепью для рецепторов цитокинов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, интерлейкина 3 и интерлейкина 5 [38]. Проявление биологического действия эритропоэтина зависит как от типа рецептора, так и от клеток-мишеней. Клетками-мишенями для эритропоэтина являются бурстобразующая эритроидная единица (BFU-E) на поздних стадиях ее развития [39] и колониобразующая эритроидная единица (CFU-E) [40, 41, 42]. Под действием эритропоэтина эти клетки начинают пролиферировать и дифференцироваться, а в его отсутствии – подвергаются апоптозу [43, 44]. Кроме эритроидных предшественников, рецепторы к эритропоэтину обнаружены на эндотелиальных клетках [45, 46], гладкомышечных клетках сосудов [47, 48], астроцитах, нервных клетках [49] и клетках плаценты [50, 51], клетках почек и слизистой оболочки желудка. В связи с этим эритропоэтин, кроме его основного действия – стимуляции эритропоэза, обладает рядом других биологических эффектов. В организме ЭПО увеличивает количество предшественников эндотелиальных клеток [52, 53], обладает нейропротективным и нейротрофическим действием, активирует митоген-активируемый протеинкиназный [54] и фосфатидилинозитол-3-киназный пути [47], которые опосредованно ингибируют апоптоз [55, 56]. Действие эритропоэтина на клетку прекращается после дефосфорилирования EPOR, далее комплекс EPO/EPOR интернализуется внутрь клетки. Около 60 % эритропоэтина ресекретируется, а 40 % – подвергается протеосомальной деградации внутри клетки. Предполагается, что это – основной механизм деградации циркулирующего эритропоэтина [57, 58].

Таким образом, выделяют три основных биологических эффекта ЭПО: активация эритропоэза, стимуляция неангиогенеза, блокирование апоптоза [59]. Кроме того, установлено, что ЭПО обладает нейропротективным и нейротрофическим действием. Плейотропность биологического действия эритропоэтинов повышает их значимость и расширяет спектр применения. Некоторые публикации указывают на то, что в ближайшем будущем у препаратов рекомбинантных эритропоэтинов, вероятно, появятся новые показания к применению, связанные с их активностью, отличной от стимуляции эритропоэза.

Разработка стандартных образцов эритропоэтина

У больных с анемией при ХПН лекарственные препараты эритропоэтина применяются практически пожизненно. В связи с этим качество препаратов данной группы особенно важно. Одним из основных показателей качества, эффективности и безопасности лекарственных препаратов рчЭПО является биологическая/специфическая активность. Точность ее оценки – необходимое условие обеспечения качества лекарственных препаратов, поскольку ошибка при установлении требований к препарату может отразиться на его эффективности и безопасности. В результате клинических исследований препаратов эритропоэтина было установлено, что их передозировка может привести к гипертонии и тромбоцитозу с дальнейшим развитием ишемии, инфаркта миокарда, инсульта, тромбозов вен и артерий [60, 61].

При оценке качества препаратов рчЭПО по таким показателям, как количественное определение (специфическая активность, биологический метод *in vivo*), подлинность, димеры и высокомолекулярные родственные соединения, сиаловые кислоты, необходимы стандартные образцы эритропоэтина [28], которые должны удовлетворять следующим принципам:

- структурно-функциональное подобие стандартизируемым препаратам и международному стандартному образцу;

- сопоставимость фармакокинетических свойств с референтным препаратом [62];

- адекватность метода определения специфической активности механизму действия при терапевтическом применении препарата.

Выявленные общие принципы стандартизации фармакологической активности препаратов эритропоэтина, исходя из особенностей их структуры, функции, механизма действия и фармакокинетики, могут составить методологическую основу разработки стандартных образцов.

В области обращения лекарственных средств принят следующий термин: стандартные образцы – вещества, посредством сравнения с которыми осуществляется контроль качества лекарственных средств с помощью физико-химических и биологических методов в целях подтверждения соответствия лекарственных средств требованиям нормативной документации, установленным при осуществлении государственной регистрации, и которые применяются для калибровки стандартных образцов производителя лекарственных средств,

используемых для контроля качества и иных целей при обращении лекарственных средств [63, 64].

Необходимость в разработке стандартного образца для количественного определения биологической активности эритропоэтина появилась в 1959–1960 годах [65]. Учитывая сведения, представленные в публикациях [66–69], всю историю разработки стандартных образцов можно условно разделить на два этапа (рис. 1).

На первом этапе – с 1961 по 1990 год – природный эритропоэтин получали путем выделения из естественных доступных источников (плазмы крови и мочи), основные трудности были связаны с его низким содержанием в биологических материалах. Стандартные образцы имели невысокую активность (10 МЕ/амп), и в качестве внутрилабораторных стандартов использовали также препараты из плазмы овец и кроликов [66]. Этот этап разработки стандартных образцов ЭПО можно охарактеризовать как период сбора данных, отработки методики оценки биологической активности препаратов ЭПО.

Второй период – с 1990 года по настоящее время – характеризуется появлением рекомбинантной технологии, достижениями в области очистки белков, расшифровкой нуклеотидной последовательности гена, кодирующего молекулу эритропоэтина. Все это позволило получить рекомбинантный белок эритропоэтина с более высоким значением биологической активности.

Появление препаратов на основе рчЭПО потребовало создания соответствующих стандартов. Так, в 1990 году в Национальном институте биологических стандартов и контроля (NIBSC) аттестован международный стандарт эритропоэтина человеческого рекомбинантного с активностью 86 МЕ/амп на основе эритропоэтина альфа [67]. В 2003 году аттестован 2-й международный стандарт эритропоэтина человеческого рекомбинантного с активностью 120 МЕ/амп. (2nd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant, 2nd IS), в 2012 году – 3-й международный стандарт эритропоэтина человеческого рекомбинантного для количественного определения биологической активности (3rd WHO International Standard for Erythropoietin, recombinant for bioassay, 3rd IS). Активность этого стандарта составляла 1650 МЕ/амп. Второй период характеризуется увеличением удельной и, соответственно, специфической активности стандартных образцов эритропоэтина. Возможно, таким образом проявляется новый принцип стандартизации.

При аттестации 3rd IS Фармакопейная конвенция США получила разрешение Национального института биологических стандартов и контроля использовать указанный стандарт в качестве фармакопейного.



Рис. 1. Этапы разработки стандартных образцов эритропоэтина

В результате совершенствования технологии производства и технической оснащенности аналитических исследований стало возможным повысить требования к качеству препаратов и оценивать их по таким показателям, как содержание димеров и высокомолекулярных родственных соединений, сиаловых кислот и др. В связи с этим возникла необходимость разработки стандартного образца для оценки этих показателей. Первый такой стандарт был разработан в 1997 году, включен в Европейскую фармакопею как biological reference preparate (BRP) – European Pharmacopoeia Reference Standard Erythropoietin BRP и предназначен не только для определения специфической активности, но и для определения подлинности, содержания белка, димеров и высокомолекулярных родственных соединений, сиаловых кислот [68]. Данный стандарт, несмотря на то что был аттестован по международному стандартному образцу, состоял из равных количеств (50:50) эритропоэтина альфа и бета разных производителей, в отличие от международного стандартного образца, который содержит только эритропоэтин альфа.

Позднее Европейский директорат принял решение о разделении функций стандартных образцов. В 2014 году аттестованы два стандартных образца: стандартный образец эритропоэтина BRP 4 (Erythropoietin BRP 4, 15 mg, E1515000) для оценки биологической активности и новый сертифицированный стандартный образец эритропоэтина для оценки физико-химических показателей (Erythropoietin for physico chemical tests CRS batch 1, Y0001725) [69].

В России также разрабатывались стандартные образцы эритропоэтина, нормативным документом для них являлась временная фармакопейная статья, затем фармакопейная статья, срок действия которых в настоящее время закончился: эритропоэтин – стандартный образец (эпоэтин бета) по ФС 42-0190-06 [70], рэпоэтин-СП – стандартный образец (эпоэтин альфа) по ФС 42-0111-06 [1]. В связи с этим разработка отечественного фармакопейного стандартного образца эритропоэтина является актуальной задачей.

Заключение

В настоящее время в РФ нет национальных стандартных образцов эритропоэтина как для определения биологической активности, так и для оценки физико-химических показателей. Поэтому для оценки качества указанных препаратов производители применяют Международный стандартный образец биологической активности, Европейский биологический референс-препарат или откалиброванные по международному или европейскому стандартам стандартные образцы предприятия, процедура аттестации которых не регламентирована. Все это не позволяет корректно сопоставлять характеристики препаратов разных производителей. Кроме того, использование международных стандартных образцов ставит российских производителей в зависимость от владельцев данных стандартов и от курса валюты.

Таким образом, анализ публикаций, посвященных структуре, функциям, механизму действия эритропоэтина, позволяет сделать следующие выводы:

1. Рекомбинантный эритропоэтин человека, входящий в состав лекарственных препаратов в качестве активного компонента, представляет собой смесь изоформ с различной биологической активностью, которые определяют биологические свойства, фармакологическую активность, фармакокинетику, терапевти-

ческую эффективность и безопасность лекарственного средства.

2. Несмотря на множественность и разнонаправленность фармакологической активности эритропоэтинов (стимуляция эритропоэза и неоангиогенеза, блокирование апоптоза), данные препараты в настоящее время контролируются только по способности стимулировать эритропоэз, по которой дозируются и применяются.

3. В связи со сложностью структуры и полифункциональной активностью эритропоэтинов стандартные образцы должны удовлетворять следующим принципам:

– структурно-функциональное подобие стандартизируемым препаратам и международному стандартному образцу;

– сопоставимость фармакокинетических свойств референтному препарату;

– адекватность метода определения специфической активности механизму действия при терапевтическом применении препарата.

4. Значимость препаратов рчЭПО в клинической практике, необходимость точной оценки их специфической активности и отсутствие соответствующих стандартных образцов в РФ обуславливает актуальность разработки и аттестации отечественных стандартных образцов для определения биологической активности и оценки физико-химических показателей лекарственных препаратов эритропоэтинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств // ГРЛС [сайт]. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%D0%AD%D0%BF%D0%BE%D1%8D%D1%82%D0%B8%D0%BD&f=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=-1&order=RegDate&orderType=desc&RegType=&pageNum=4> (дата обращения: 09.10.2015).
2. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2016 год, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи: Распоряжение Правительства Рос. Федерации от 26 декабря 2015 г. № 2724-р // Официальный интернет-портал правовой информации. URL: <http://pravo.gov.ru/proxy/ips/?docbody=&nd=102387515&intelsearch=26.12.2015+%B9+2724-%F0> (дата обращения: 10.02.2016).
3. Brines M., Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 6 (2005), pp. 484–494. DOI: 10.1038/nrn1739.
4. Ahmad R., Hand M. Recombinant erythropoietin for the anemia of chronic renal failure. *The New England Journal of Medicine* 317 (1987), pp. 169–170. DOI: 10.1056/NEJM198707163170313.
5. Zehnder C., Blumberg A. Treatment of renal anemia using human erythropoietin. *Deutsch Med. Wochenschr.* 112(23) (1987), pp. 938–939.
6. Ostrvica E., Mesic E., Ostrvica D., Delic J., Delic-Custendil S., Hukic F. Effectiveness of treating the renal anemia in chronic hemodialyzed patients by epoietin alpha and beta. *Med. Arh.* 64(1) (2010), pp. 4–6
7. Препараты рекомбинантных эритропоэтинов и их характеристика / В.А. Меркулов [и др.] // Биопрепараты. 2013. № 3. С. 4–11
8. Бабичева Л.Г., Поддубная И.В. Лечение анемии в онкологии: роль нового стимулятора эритропоэза Аранесп (дарбэпоэтин альфа) // Современная онкология. 2007. № 9(3). С. 69–74.
9. Анемия у больных с хронической почечной недостаточностью: принципы терапии / Ю.С. Милованов [и др.] // Лечащий врач. 2005. № 10. С. 18–24

10. Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств: отчет о НИР (промежут.) / ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; рук. Саканян Е.И., Климов В.И., Волкова Р.А.; исполн.: Яшкир В.А., Фадейкина О.В. [и др.]. М., 2015. 175 с. Библиогр.: с. 127–145. № ГР 1151117400073. Деп. в ЦИТИС 16.02.2016. № ИКРБС 216021650028.
11. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). В 2 т. Т. 2. М.: Гриф и К, 2012. 536 с.
12. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur. J. Haematol.* 78(3) (2007), pp. 183–205. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x.
13. Winearls C.G. Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience. *Nefrol. Dial. Transplant.* 13(2) (1998), pp. 3–8. DOI: 10.1093/ndt/13.suppl_2.3.
14. Jelkmann W. Physiology and Pharmacology of Erythropoietin. *Transfus. Med. Hemother.* 40 (2013), pp. 302–309. DOI:10.1159/000356193.
15. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin / K. Jacobs [et al.]. *Nature* 313 (1985), pp. 806–810. DOI:10.1038/313806a0.
16. Jacobson L.O., Goldwasser E., Fried W., Plzak L. Role of the Kidney in Erythropoiesis. *Nature* 179 (1957), pp. 633–634. DOI:10.1038/179633a0.
17. Krantz S.B., Jacobson L.O. Erythropoietin and the Regulation of Erythropoiesis. *Ann. Intern. Med.* 73(6) (1970), pp. 330. DOI: 10.7326/0003-4819-73-6-1053_1.
18. Elliott S., Pham E., Macdougall I.C. Erythropoietins: a common mechanism of action. *Exp. Hematol.* 36(12) (2008), pp. 1573–1584. DOI: DOI:10.1016/j.exphem.2008.08.003
19. Lai P.H., Everett R., Wang F.F., Arakawa T., Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 261(7) (1986), pp. 3116–3121.
20. Bazan J.F. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11(10) (1990), pp. 350–354. DOI:10.1016/0167-5699(90)90139-Z.
21. Wang F.F., Kung C.K.H., Goldwasser E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology* 116(6) (1985), pp. 2286–2292. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/endo-116-6-2286>.
22. Sytkowsky A.J. Denaturation and renaturation of human erythropoietin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96(1) (1980), pp. 143–149. DOI:10.1016/0006-291X(80)91192-4.
23. Lin F.K. The molecular biology of erythropoietin, in rich IN (ed): Molecular and cellular aspects of erythropoietin and erythropoiesis. New York, NY, Springer, 1987, 462 p. DOI: 10.1007/978-3-642-72652-1.
24. Davis J.M., Arakawa T., Strickland T.W., Yphantis D.A. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 26(9) (1987), pp. 2633–2638. DOI: 10.1021/bi00383a034.
25. 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.* 262(25) (1987), pp. 12059–12076.
26. Skibeli V., Nissen-Lie G., Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* 98(13) (2001), pp. 3626–3634. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.13.3626>.
27. Parekh R.B. Gene Expression – Glycosylation. *Biologicals.* 22 (1994), pp. 113–119. DOI:10.1006/biol.1994.1017.
28. Эритропоэтина раствор концентрированный 01/200:1316. Европейская фармакопея 7.0. М.: Ремедиум, 2011. С. 4360–4365.
29. Steer C.J., Clarenburg R. Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver. *J. Biol. Chem.* 254 (1979), pp. 4457–4461.
30. Baynes J.W., Wold F. Effect of glycosylation on the in vivo circulating half-life of ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 251 (1976), pp. 6016–6024.
31. Achord D.T., Brot F.E., Bell C.E., Sly W.S. Human f3-Glucuronidase: In Vivo clearance and In Vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell.* 15 (1978), pp. 269–278.
32. Stahl P.D., Rodman J.S., Miller M.J., Schlesinger P.H. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(3) (1978), pp. 1399–1403. DOI: 10.1073/pnas.75.3.1399.
33. Goldwasser E., Kung C.K., Eliason J. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action. *J. Biol. Chem.* 249(13) (1974), pp. 4202–4206.
34. Spivak J.L., Hogans B.B. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood.* 73(1) (1989), pp. 90–99.
35. Tsuda E., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S., Sasaki R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.* 188 (1989), pp. 405–411. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15417.x.
36. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties / P.L. Storrington [et al.]. *Br. J. Haematol.* 100(1) (1998), pp. 79–89.
37. Lisi Peter J., Jeffrey K. Glenn, Chi-Kwong So. *Methods for in vitro determination of erythropoietin bioactivity*: Patent US, no. CA 2265989 C, 1996 (in USA).

38. Broxmeyer H.E. Erythropoietin multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *J. Exp. Med.* 210(2) (2013), pp. 205–208. DOI: 10.1084/jem.20122760.
39. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors / K. Sawada [et al.]. *J. Cell. Physiol.* 142(2) (1990), pp. 219–230. DOI: 10.1002/jcp.1041420202.
40. Gregory C.J., Eaves A.C. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51(3) (1978), pp. 527–537.
41. Gregory C.J., Eaves A.C. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood* 49(6) (1977), pp. 855–864.
42. Ogawa M., Maceachern M.D., Avila L. Human marrow erythropoiesis in culture: II. Heterogeneity in the morphology, time course of colony formation, and sedimentation velocities of the colony-forming cells. *Am J. Hematol.* 3 (1977), pp. 29–36. DOI: 10.1002/ajh.2830030104.
43. Kelley L.L., Green W.F., Hicks G.G., Bondurant M.C., Koury M.J., Ruley H.E. Apoptosis in erythroid progenitors deprived of erythropoietin occurs during the G1 and S phases of the cell cycle without growth arrest or stabilization of wild-type p53. *Mol. Cell Biol.* 14(6) (1994), pp. 4183–4192. DOI: 10.1128/MCB.14.6.4183.
44. Koury M.J., Bondurant M.C. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J. Cell Physiol.* 137(1) (1988), pp. 65–74. DOI: 10.1002/jcp.1041370108.
45. Anagnostou A., Lee E.S., Kessimian N., Levinson R., Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(15) (1990), pp. 5978–5982. DOI: 10.1073/pnas.87.15.5978.
46. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells / A. Anagnostou [et al.]. *Proc Natl Acad Sci.* 91(9) (1994), pp. 3974–3978. DOI:10.1073/pnas.91.9.3974.
47. Erythropoietin regulates vascular smooth muscle cell apoptosis by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway / T. Akimoto [et al.] *Kidney Int.* 58(1) (2000), pp. 269–282. DOI:10.1046/j.1523-1755.2000.00162.x.
48. Ammarguella F., Llovera M., Kelly P.A., Goffin V. Low doses of EPO activate MAP kinases but not JAK2-STAT5 in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284(4) (2001), pp. 1031–1038. DOI:10.1006/bbrc.2001.5085.
49. Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells / A.M. Sinclair [et al.] *Blood* 115 (21) (2010), pp. 4264–4272. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-10-248666>.
50. D'Andrea A.D., Zon L.I. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J. Clin. Invest.* 86(3) (1990), pp. 681–687. DOI: 10.1172/jci114763.
51. Sawyer S.T., Krantz S.B., Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 74(1) (1989), pp. 103–109.
52. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization / C. Heeschen [et al.]. *Blood* 102(4) (2003), pp. 1340–1346. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-01-0223>.
53. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells / F.H. Bahlmann [et al.]. *Blood* 103(3) (2004), pp. 921–926. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-04-1284>.
54. Involvement of erythropoietin-induced cytosolic free calcium mobilization in activation of mitogen-activated protein kinase and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells / T. Akimoto [et al.]. *J. Hypertens.* 19(2) (2001), pp. 193–202. DOI:10.1097/00004872-200102000-00005.
55. Wojchowski D.M., Gregory R.C., Miller C.P., Pandit A.K., Pircher T.J. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp. Cell. Res.* 253(1) (1999), pp. 143–156. DOI:10.1006/excr.1999.4673.
56. Role of apoptosis in reperfusion injury / F. Eefting [et al.]. *Cardiovasc. Res.* 61(3) (2004), pp. 414–426. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.023>.
57. Gross A.W., Lodish H.F. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *J. Biol. Chem.* 281 (2006), pp. 2024–2032. DOI: 10.1074/jbc.M510493200.
58. Jelkmann W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. *Eur. J. Haematol.* 69 (2002), pp. 265–274. DOI: 10.1034/j.1600-0609.2002.02813.x.
59. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с.
60. Henry D.H., Dahl N.V., Auerbach M.A. Thrombocytosis and venous thromboembolism in cancer patients with chemotherapy induced anemia may be related to ESA induced iron restricted erythropoiesis and reversed by administration of IV iron. *Am J. Hematol.* 87(3) (2012), pp. 308–310. DOI: 10.1002/ajh.22262.
61. Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having haemodialysis / S. Casati [et al.]. *Br. Med. J.* 295(6605) (1987), pp. 1017–1020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.295.6605.1017>.
62. Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции рекомбинантные эритропоэтины // Руководство по экспертизе лекарственных средств. В 4 т. Т. 4 / А.Н. Васильев [и др.]. М.: Полиграф-плюс, 2014. С. 76–91.

63. О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств»: Федер. закон Рос. Федерации от 22.12.2014 № 429-ФЗ (ред. от 13.07.2015).
64. Об обращении лекарственных средств: Федер. закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 13.07.2015) (с изм. и доп., вступ. в силу с 24.07.2015).
65. Cotes P.M., Bangham D.R. The International Reference Preparation of Erythropoietin. *Bull World Health Organ.* 35(5) (1966), pp. 751–760.
66. Annable L., Cotes P.M., Mussett M.V. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull World Health Organ.* 47(1) (1972), pp. 99–112.
67. Storrington P.L., Gaines Das R.E. 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.* 134(3) (1992), pp. 459–84. DOI:10.1677/joe.0.1340459
68. Bristow AF. Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. *Pharmeuropa Bio.* 97(2) (1996), pp. 31–48.
69. Annual report 2014 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare [Электронный ресурс] // EDQM [сайт]. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/annual_report_edqm_2014.pdf (дата обращения 26.10.2015).

The article is received: 09.03.2016

The article is corrected:

DOI 10.20915/2077-1177-2016-0-1-8-20

STUDYING OF THE STANDARDIZATION PRINCIPLES OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN PREPARATIONS

A.K. Yakovlev, L.A. Gayderova, N.A. Alpatova, T.N. Lobanova, E.L. Postnova, E.I. Yurchikova, T.A. Batuashvili, R.A. Volkova, V.N. Podkuiko, Yu.V. Olefir

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

Analysis of the publications devoted to the structure, functions, mechanism of action of erythropoietin is given in the article. Erythropoietin preparations derived from recombinant DNA technology are a mixture of isoforms with different biological activity, which determine the biological properties pharmacological activity, pharmacokinetics, efficacy and safety of medicinal product. Erythropoietin preparations derived by using recombinant DNA technology are a mixture of isoforms with different biological activity, that determine the biological properties, pharmacological activity, pharmacokinetics, safety and therapeutic efficacy of the drug. However, at production of erythropoietin, its pharmacological activity is controlled only by the ability to stimulate erythropoiesis, despite the multiplicity of different directions of action of drugs erythropoietin. The drug is dispensed and applied on this indicator. The international reference standard, a European reference biologic drug or calibrated by him enterprise standard samples are used by manufacturers to assess the quality of erythropoietin in the Russian Federation. The urgency of developing domestic standard samples for the evaluation of biological activity and physico-chemical characteristics of erythropoietin preparations produced by recombinant DNA technology.

Key words: erythropoietin, pharmacological activity, standardization principles, structure and functions of erythropoietin, reference material.

- ✓ **When quoting reference:** Yakovlev A.K., Gayderova L.A., Alpatova N.A., Lobanova T.N. Postnova E.L., Yurchikova E.I. et al. *Izuchenie printsipov standartizatsii farmakologicheskoi aktivnosti preparatov rekombinantnykh eritropoetinov* [Studying of the standardization principles of pharmacological activity of recombinant erythropoietin preparations]. *Standartnye obrazcy – Reference materials*, 2016, No. 1, pp. 8–20. (In Russian).

REFERENCES:

1. GRLS. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennykh sredstv [The state register of drugs]. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%D0%AD%D0%BF%D0%BE%D1%8D%D1%82%D0%B8%D0%BD&f=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=-1&order=RegDate&orderType=desc&RegType=&pageNum=4> [accessed 9 october 2015].
2. Rasporiazhenie Pravitel'stva RF N 2724-r. Ob utverzhdenii perechnia zhiznenno neobkhodimykh i vazhnejshikh lekarstvennykh preparatov na 2016 god, a takzhe perechnej lekarstvennykh preparatov dlia meditsinskogo primeneniia i minimal'nogo assortimenta lekarstvennykh preparatov, neobkhodimykh dlia okazaniia meditsinskoj pomoshchi. [The decree of the RF Government N 2724-R] Moscow, 26.12.2015, 217 pp. (In Russian).
3. Brines M., Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature Rev. Neurosci.*, 2005, No. 6, pp. 484–494. DOI: 10.1038/nrn1739.
4. Ahmad R., Hand M. Recombinant erythropoietin for the anemia of chronic renal failure. *N. Engl. J. Med.*, 1987, No. 317, pp. 169–170. DOI: 10.1056/NEJM198707163170313.
5. Zehnder C., Blumberg A. Treatment of renal anemia using human erythropoietin. *Deutsch Med. Wochenschr.*, 1987, No. 112(23), pp. 938–939.
6. Ostrvica E., Mesic E., Ostrvica D., Delic J., Delic-Custendil S., Hukic F. Effectiveness of treating the renal anemia in chronic hemodialyzed patients by epoetin alpha and beta. *Med Arh.*, 2010, No. 64(1), pp. 4–6.
7. Merkulov V.A. [et al.]. Preparaty rekombinantnykh eritropoëtinov i ikh kharakteristika [Preparations of recombinant erythropoietins and their characteristics]. *Biopreparaty – Biologics*, 2013, No. 3, pp. 4–11 (In Russian).
8. Babicheva L.G., Poddubnaja I.V. Lechenie anemii v onkologii: rol' novogo stimulatora eritropoëza Aranesp (darbépoetin al'fa) [Treatment of anemia in Oncology: the role of the new erythropoiesis stimulants Aranesp (darbeoetin Alfa)]. *Sovremennaja onkologija – Modern Oncology*, 2007, No. 9(3), pp. 69–74. (In Russian).
9. Milovanov Ju.S., Kozlovskaja L.V., Nikolaev A.Ju., Fomin V.V., Milovanova L.Ju. Anemiia u bol'nykh s khronicheskoi pochechnoi nedostatochnost'iu: printsipy terapii [Anemia in patients with chronic renal failure: principles of treatment]. *Lechashhij vrach – Attending medical doctor*, 2005, No. 10, pp. 18–24. (In Russian).
10. Sovershenstvovanie sistemy razrabotki i primeneniia standartnykh obraztsov, prednaznachennykh dlia otsenki kachestva, éffektivnosti i bezopasnosti lekarstvennykh sredstv: otchet o NIR (promezhut.) [Improving the system development and use of reference materials, designed to assess the quality, effectiveness and safety of medicines: report of the Scientific-research work] FGBU «NCJeSMP» Minzdrava Rossii [Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre on Expert Evaluation of Medical Application Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation]; ruk. Sakanjan E.I., Klimov V.I., Volkova R.A.; ispoln.: Jashkir V.A., Fadejkina O.V. [et al.]. M., 2015. 175 s. Bibliogr.: pp. 127–145. № GR 1151117400073. Dep. v CITIS 16.02.2016. № IKRBS 216021650028. (In Russian).
11. Mironov A.N. *Rukovodstvo po provedeniiu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv (immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty)*. In 2 vol. Of vol. 2. Moscow, Grif and Ko Publ., 2012. 536 p. (In Russian).
12. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol.*, 2007, No. 78(3), pp. 183–205. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x.
13. Winearls C.G. Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience. *Nefrol. Dial. Transplant.*, 1998, No. 13 (2), pp. 3–8. DOI: 10.1093/ndt/13.suppl_2.3.
14. Jelkmann W. Physiology and Pharmacology of Erythropoietin. *Transfus. Med. Hemother.*, 2013, No. 40, pp. 302–309. DOI:10.1159/000356193.
15. Jacobs K. [et al.]. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, 1985, No. 313, pp. 806–810. DOI:10.1038/313806a0.
16. Jacobson L.O., Goldwasser E., Fried W., Plzak L. Role of the Kidney in Erythropoiesis. *Nature*, 1957, No. 179, pp. 633–634. DOI:10.1038/179633a0.
17. Krantz S.B., Jacobson L.O. Erythropoietin and the Regulation of Erythropoiesis. *Ann. Intern Med.*, 1970, No. 73 (6), pp. 330. DOI: 10.7326/0003-4819-73-6-1053_1.
18. Elliott S., Pham E., Macdougall I.C. Erythropoietins: a common mechanism of action. *Exp. Hematol.*, 2008, No. 36 (12), pp. 1573–1584. DOI: DOI:10.1016/j.exphem.2008.08.003.

19. Lai P.H., Everett R., Wang F.F., Arakawa T., Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin, *J. Biol. chem.* 1986, no. 261 (7), pp. 3116–3121
20. Bazan J.F. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today*, 1990, No. 11(10), pp. 350–354. DOI:10.1016/0167-5699(90)90139-Z.
21. Wang F.F., Kung C.K.H., Goldwasser E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology*, 1985, No. 116(6), pp. 2286–2292. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/endo-116-6-2286>.
22. Sytkowsky A.J. Denaturation and renaturation of human erythropoietin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, No. 96(1), pp. 143–149. DOI: 10.1016/0006-291X(80)91192-4.
23. Lin F.K. *The molecular biology of erythropoietin, in rich IN (ed): Molecular and cellular aspects of erythropoietin and erythropoiesis.* New York, NY, Springer, 1987, 462 p. DOI: 10.1007/978-3-642-72652-1.
24. Davis J.M., Arakawa T., Strickland T.W., Yphantis D.A. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*, 1987, No. 26 (9), pp. 2633–2638. DOI: 10.1021/bi00383a034.
25. 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, No. 262 (25), pp. 12059–12076.
26. Skibeli V., Nissen-Lie G., Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*, 2001, No. 98 (13), pp. 3626–3634. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.13.3626>.
27. Parekh R.B. Gene Expression – Glycosylation. *Biologicals*, 1994, No. 22, pp. 113–119. DOI:10.1006/biol.1994.1017.
28. *Éritropoétina rastvor koncentrirovannyj 01/200:1316. Evropejskaia farmakopeia 7.0.* Moscow, Remedium Publ., 2011, pp. 4360–4365. (In Russian).
29. Steer C.J., Clarenburg R. Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1979, No. 254, pp. 4457–4461.
30. Baynes J.W., Wold F. Effect of glycosylation on the in vivo circulating half-life of ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 1976, No. 251, pp. 6016–6024.
31. Achord D.T., Brot F.E., Bell C.E., Sly W.S. Human f3-Glucuronidase: In Vivo clearance and In Vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell.*, 1978, No. 15, pp. 269–278.
32. Stahl P.D., Rodman J.S., Miller M.J., Schlesinger P.H. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978, No. 75 (3), pp. 1399–1403. DOI: 10.1073/pnas.75.3.1399.
33. Goldwasser E., Kung C.K., Eliason J. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action. *J. Biol. Chem.*, 1974, No. 249 (13), pp. 4202–4206.
34. Spivak J.L., Hogans B.B. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood*, 1989, No. 73 (1), pp. 90–99.
35. Tsuda E., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S., Sasaki R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem.*, 1990, No. 188, pp. 405–411. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15417.x.
36. Storrington P.L. [et al.]. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br. J. Haematol.*, 1998, No. 100 (1), pp. 79–89.
37. Lisi Peter J., Glenn Jeffrey K., Chi-Kwong So. *Methods for in vitro determination of erythropoietin bioactivity.* Patent US, No. CA 2265989 C, 1996 (in USA).
38. Broxmeyer H.E. Erythropoietin multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *J. Exp. Med.*, 2013, No. 210 (2), pp. 205–208. DOI: 10.1084/jem.20122760.
39. Sawada K. [et al.]. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J. Cell. Physiol.*, 1990, No. 142 (2), pp. 219–230. DOI: 10.1002/jcp.1041420202.
40. Gregory C.J., Eaves A.C. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*, 1978, No. 51 (3), pp. 527–537.
41. Gregory C.J., Eaves A.C. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood*, 1977, No. 49 (6), pp. 855–864.
42. Ogawa M., Maceachern M.D., Avila L. Human marrow erythropoiesis in culture: II. Heterogeneity in the morphology, time course of colony formation, and sedimentation velocities of the colony-forming cells. *Am J. Hematol.*, 1977, No. 3, pp. 29–36. DOI: 10.1002/ajh.2830030104.
43. Kelley L.L., Green W.F., Hicks G.G., Bondurant M.C., Koury M.J., Ruley H.E. Apoptosis in erythroid progenitors deprived of erythropoietin occurs during the G1 and S phases of the cell cycle without growth arrest or stabilization of wild-type p53. *Mol. Cell Biol.*, 1994, No. 14 (6), pp. 4183–4192. DOI: 10.1128/MCB.14.6.4183.
44. Koury M.J., Bondurant M.C. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J. Cell. Physiol.*, 1988, No. 137 (1), pp. 65–74. DOI: 10.1002/jcp.1041370108.
45. Anagnostou A., Lee E.S., Kessimian N., Levinson R., Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, No. 87 (15), pp. 5978–5982. DOI: 10.1073/pnas.87.15.5978.

46. Anagnostou A. [et al.]. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, No. 91 (9), pp. 3974–3978. DOI:10.1073/pnas.91.9.3974.
47. Akimoto T. [et al.]. Erythropoietin regulates vascular smooth muscle cell apoptosis by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway. *Kidney Int.*, 2000, No. 58 (1), pp. 269–282. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00162.x.
48. Ammarguella F., Llovera M., Kelly P.A., Goffin V. Low doses of EPO activate MAP kinases but not JAK2-STAT5 in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, No. 284 (4), pp. 1031–1038. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5085.
49. Sinclair A.M. [et al.]. Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells. *Blood*, 2010, No. 115 (21), pp. 4264–4272. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-10-248666>.
50. D'Andrea A.D., Zon L.I. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J. Clin. Invest.*, 1990, No. 86(3), pp. 681–687. DOI: 10.1172/jci114763.
51. Sawyer S.T., Krantz S.B., Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood*, 1989, No. 74 (1), pp. 103–109.
52. Heeschen C. [et al.]. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, 2003, No. 102 (4), pp. 1340–1346. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-01-0223>.
53. Bahlmann F.H. [et al.]. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 2004, No. 103 (3), pp. 921–926. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-04-1284>.
54. Akimoto T. [et al.]. Involvement of erythropoietin-induced cytosolic free calcium mobilization in activation of mitogen-activated protein kinase and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.*, 2001, No. 19 (2), pp. 193–202. DOI:10.1097/00004872-200102000-00005.
55. Wojchowski D.M., Gregory R.C., Miller C.P., Pandit A.K., Pircher T.J. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp. Cell. Res.*, 1999, No. 253 (1), pp. 143–156. DOI: 10.1006/excr.1999.4673.
56. Eefting F. [et al.]. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, 2004, No. 61 (3), pp. 414–426. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.023>.
57. Gross A.W., Lodish H.F. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *J. Biol. Chem.*, 2006, No. 281, pp. 2024–2032. DOI: 10.1074/jbc.M510493200.
58. Jelkmann W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. *Eur. J. Haematol.*, 2002, No. 69, pp. 265–274. DOI: 10.1034/j.1600-0609.2002.02813.x.
59. Ketlinskij C.A., Simbircev A.S. *Citokiny* [Cytokines]. St. Petersburg, Foliant Publ., 2008, 552 p. (In Russian).
60. Henry D.H., Dahl N.V., Auerbach M.A. Thrombocytosis and venous thromboembolism in cancer patients with chemotherapy induced anemia may be related to ESA induced iron restricted erythropoiesis and reversed by administration of IV iron. *Am J. Hematol.*, 2012, No. 87 (3), pp. 308–310. DOI: 10.1002/ajh.22262.
61. Casati S. [et al.]. Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having haemodialysis. *Br. Med. J.*, 1987, No. 295 (6605), pp. 1017–1020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.295.6605.1017>.
62. Vasil'ev A.N. [et al.]. Razrabotka bio-analogichnyh (biopodobnyh) lekarstvennyh preparatov, sodержashhih v kachestve farmacevitcheskoj substancii rekombinantnye jeryitropojetiny [Development of bio-similar (biosimilar) medicinal preparations, containing as a drug substance recombinant erythropoietins] in *Rukovodstvo po jekspertize lekarstvennyh sredstv* [The guidelines for the examination of medicines]. In 4 vol., vol. 4. Moscow, Poligraf-pljus Publ., 2014, pp. 76–91. (In Russian).
63. O vnesenii izmenenij v Federal'nyj zakon "Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv" [On amendments to the Federal law "On circulation of medicines"]: Federal'nyj zakon N 429-FZ ot 22.12.2014 (red. ot 13.07.2015) [Federal law No. 429-FZ dated 22.12.2014 (ed. on 13.07.2015)]. (In Russian).
64. Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv (s izm. i dop., vstup. v silu s 24.07.2015) [On circulation of medicines (as amended. and EXT., Preface. Effective 24.07.2015)]: Federal'nyj zakon ot 12.04.2010 N 61-FZ (red. ot 13.07.2015) [Federal law of 12.04.2010 N 61-FZ (as amended on 13.07.2015)]. (In Russian).
65. Cotes P.M., Bangham D.R. The International Reference Preparation of Erythropoietin. *Bull. World Health Organ.*, 1966, No. 35(5), pp. 751–760.
66. Annable L., Cotes P.M., Mussett M.V. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull. World Health Organ.*, 1972, No. 47 (1), pp. 99–112.
67. Storrington P.L., Gaines Das R.E. 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, No. 134 (3), pp. 459–484. DOI: 10.1677/joe.0.1340459.
68. Bristow A.F. Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. *Pharmeuropa Bio*, 1996, No. 97 (2), pp. 31–48.
69. Annual report 2014 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. EDQM Available at: https://www.edqm.eu/sites/default/files/annual_report_edqm_2014.pdf (accessed 26 October 2015).