

1 – ЗАО
«Санкт-Петербургский
институт фармации»,
188663, Россия,
Ленинградская обл.,
Всеволожский р-н,
г.п. Кузьмолловский,
ул. Заводская, 3, к. 245

1 – Saint-Petersburg
Institute of Pharmacy,
3/245, Zavodskaya str.,
Kuzmolovsky,
Vsevolozhsk district,
Leningrad region,
188663, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: spbpharm@mail.ru
Тел.: 8 (812) 603 24 32

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДАРБЭПОЭТИНА АЛЬФА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРОЛИКОВ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

М.В. Карлина¹, Н.М. Фаустова¹, О.Н. Пожарицкая¹, В.М. Косман¹,
В.Г. Макаров¹, А.Н. Шиков^{1*}

Резюме. Разработана методика количественного определения дарбэпоэтина α в плазме крови кроликов. Количественное определение проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием коммерчески доступных наборов реагентов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ». Разработанная методика была валидирована по следующим параметрам: специфичность, линейность, прецизионность, точность (правильность), стабильность образцов. Линейный диапазон методики определения дарбэпоэтина α в плазме крови кроликов составил 67–2000 пг/мл, предел обнаружения – 31 пг/мл. Разработанная методика может быть использована для исследований биоэквивалентности и токсикокинетики препаратов дарбэпоэтина.

Ключевые слова: дарбэпоэтин, ИФА, валидация, фармакокинетика, кролики, плазма.

DETERMINATION OF DARBEPOETIN ALFA IN RABBIT PLASMA BY ELISA

M.V. Karlina¹, N.M. Faustova¹, O.N. Pozharitskaya¹, V.M. Kosman¹, V.G. Makarov¹, A.N. Shikov^{1*}

Abstract. Method of quantitative determination of darbepoetin alfa in rabbit blood plasma was developed. Quantitative determination was performed by ELISA using commercially available ELISA kits for assay «Erythropoietin ELISA-Best». The method was validated on the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, and the stability samples. Linear range of methods for determining darbepoetin alfa in the blood plasma of rabbits was 67–2000 pg/mL, the limit of detection – 31 pg/ml. The method can be used for bioequivalence and toxicokinetics studies of darbepoetin alfa.

Keywords: darbepoetin, ELISA, validation, pharmacokinetics, rabbits, plasma.

ВВЕДЕНИЕ

Глобальный рынок биотехнологий и его медицинская составляющая стремительно растут. Согласно данным Евразийской экономической комиссии в 2015 году мировой объем биотехнологического рынка составил свыше 280 миллиардов долларов. На период до 2020 года ежегодный прирост этого сегмента экономики ожидается в районе 10–13% [1].

В настоящее время биотехнологические препараты используют в терапии метаболических и дегенеративных заболеваний, таких как сахарный диабет, аутоиммунных, онкологических заболеваний, в лечении псориаза и др. Истечение сроков патентной защиты на большинство оригинальных биопрепаратов создало предпосылки к внедрению аналогичных биопрепаратов, так называемых биосимиляров. По прогнозам специалистов, к 2020 г. продажи биосимиляров превысят 100 миллиардов долларов [2].

Изучение на животных токсикокинетики и фармакокинетики биопрепаратов, как оригинальных, так и биоаналогов, является

частью комплекса доклинических исследований, который проводят с целью получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства [3, 4]. Учитывая вышесказанное, разработка и валидация методик количественного определения биопрепаратов для изучения их фармакокинетических свойств как никогда актуальна.

Для определения концентраций веществ в биологических жидкостях используют хроматографические, микробиологические, спектрофотометрические, полярографические, иммунологические (радиоиммунные и иммуноферментные), радиоизотопные и другие методы [5]. Наибольшее распространение получили хроматографические методы, однако их применение затруднительно для ряда объектов, в том числе полисахаридов, пептидов и белков, являющихся основой биопрепаратов. Критическими параметрами метода являются чувствительность, точность и быстрота анализа, возможность работы с малыми объемами биоматериала, стоимость анализа. Иммуноферментные методы обладают высокой чувствительностью и избира-

тельностью, наборы для них сравнительно дешевы, они позволяют одновременно тестировать большое количество образцов за короткий промежуток времени, что делает перспективным их использование для определения концентрации действующих веществ биопрепаратов в биологических объектах.

В настоящее время эритропоэтин (ЭПО) остается одним из сложных и популярных объектов биотехнологии рекомбинантных лекарственных белков человека, что связано с его полифункциональной физиологической и терапевтической активностью [6]. В 2000-е годы появился аналог эритропоэтина второго поколения – дарбэпоэтин α (ДЭПО) – генно-модифицированный эритропоэтин с двумя дополнительными N-углеводными цепями, несущими больше (22 вместо 14) остатков сиаловой кислоты [7]. Дарбэпоэтин α нашел широкое клиническое применение для лечения анемий различного генеза, а также ряда онкологических заболеваний благодаря высокой биологической активности за счет большего (в 4–6 раз) по продолжительности периода полувыведения. В Российской Федерации зарегистрирован только один препарат дарбэпоэтина α – «Аранесп», что позволяет предположить возможность скорого появления его биосимиляров и необходимость разработки быстрых методов его количественного анализа в биообразцах.

По сравнению с эндогенным эритропоэтином дарбэпоэтин α имеет незначительные структурные отличия по степени гликозилирования, что позволяет использовать для них близкие аналитические методы. Для определения содержания эритропоэтина в сыворотке (плазме) крови человека и лабораторных животных используют метод конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [8, 9].

Целью настоящего исследования стала разработка методики количественного определения дарбэпоэтина α в плазме крови лабораторных животных с помощью коммерчески доступного набора и её валидация в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам, и апробация разработанной методики для изучения фармакокинетики дарбэпоэтина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы: препарат «Аранесп» в форме раствора для инъекций (Amgen Manufacturing Limited, Пуэрто-Рико) и наборы реагентов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» (А-8776, ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) для иммуноферментного определения концентрации эритропоэтина в сыворотке (или плазме) крови и других биологических жидкостях человека.

Методика иммуноферментного определения концентрации эритропоэтина и дарбэпоэтина в плазме крови

Для получения корректных результатов процедуру анализа необходимо проводить непрерывно. Подготовку реагентов осуществляли соответственно рекомендациям инструкции к набору. Во все лунки вносили по 100 мкл раствора для разведения сывороток (PPC). Затем в лунки вносили не менее чем в двух повторностях по 100 мкл растворов калибровочных и контрольных образцов и далее – по 100 мкл исследуемых биопроб. Общее время внесения калибровочных и контрольных образцов и исследуемых проб не превышало 10 мин.

Планшет заклеивали плёнкой и инкубировали при температуре 37 °С в течение 45 мин в термостатируемом шейкере (инкубатор-шейкер ImmunoChem-2200, High Technology Inc., США) с частотой 700 об/мин. По окончании инкубации удаляли содержимое лунок и промывали лунки буферным раствором для промывки (ФСБ-Т) 7 раз по 350 мкл. Планшет с промывочным раствором инкубировали на шейкере при 37 °С в течение 3 мин с частотой вращения 700 об/мин. Затем промывочный раствор декантировали и тщательно удаляли остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

После промывки планшета во все лунки с одинаковой скоростью вносили по 100 мкл конъюгата. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С в термостатируемом шейкере с частотой 700 об/мин. По окончании инкубации лунки планшета тщательно промывали, как описано выше.

Затем во все лунки вносили по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (ТМБ). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в защищенном от света месте в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С. Далее вносили во все лунки по 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ.

Оптическую плотность растворов в лунках измеряли на планшетном спектрофотометре (xMark™ Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad, USA) в двухволновом режиме: при длине волны 450 нм (основной фильтр) и 650 нм (референс-фильтр) через 2–3 мин после остановки реакции. Окраска в лунках планшета стабильна при комнатной температуре в течение 10 мин.

Расчет результатов анализов

Построение калибровочного графика проводили для каждого независимого эксперимента (планшета).

1) Рассчитывали разность оптических плотностей при длинах волн 450 нм и 650 нм ($D_{450} - D_{650}$), затем вычисляли исправленную оптическую плотность, вычитая значение, полученное для калибровочного образца с содержанием ЭПО 0 мМЕ/мл (ДЭПО – 0 пг/мл) ($D = D_{ст} - D_{ст0}$), далее определяли среднее значение исправленной оптической плотности (D) для каждого калибровочного образца.

При построении калибровочного графика для ДЭПО в плазме крови кроликов калибровочным образцом с содержанием ДЭПО 0 пг/мл считали плазму крови интактного кролика.

2) Строили калибровочный график в линейных координатах, откладывая по оси Y среднее значение исправленной оптической плотности калибровочных образцов (D), а по оси X – их концентрацию, рассчитывали уравнение регрессии (калибровочное уравнение).

3) Рассчитывали среднее значение исправленной оптической плотности для каждого исследуемого образца.

4) Вычисляли значение концентрации ЭПО в контрольном образце и в исследуемых образцах по калибровочному уравнению.

5) Если концентрация ЭПО в исследуемом образце превышала 200 мМЕ/мл (ДЭПО – 2000 пг/мл), образец разводили РСС и анализировали еще раз. Полученный результат умножали на коэффициент разведения.

6) Для представления результатов измерения концентрации ЭПО в пг/мл значения, полученные в мМЕ/мл, умножали на коэффициент пересчета 8:

$$1 \text{ мМЕ/мл} = 8 \text{ пг/мл ЭПО.}$$

Изучение фармакокинетики препарата дарбэпоэтина

Исследование фармакокинетики проводили на кроликах-самцах породы калифорнийская (КФХ «Потапчук М.П.», Россия). Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014), согласованным с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей, и одобрены на заседании биоэтической комиссии Санкт-Петербургского института фармации.

Дарбэпоэтин α вводили внутривенно и подкожно в дозе 1 мкг/кг веса. Образцы крови кроликов отбирали через 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12 и 24 ч после внутривенного введения и через 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 и 96 ч после подкожного введения, в качестве антикоагулянта использовали динатриевую соль этилендиаминтет-

рауксусной кислоты (ЭДТА-Na_2), образцы центрифугировали для получения плазмы крови (15 мин, 3000 об/мин), полученную плазму замораживали и хранили при -20 °С. Перед началом количественного определения активного ингредиента образцы размораживали.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. Параметры фармакокинетики рассчитаны методом статистических моментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для настоящего исследования был выбран набор реагентов «Эритропоэтин-ИФА-Бест», который сопоставим по своим аналитическим характеристикам с зарубежными аналогами и предназначен для определения уровня эритропоэтина в сыворотке крови человека и других биологических жидкостях, а также для контроля рекомбинантного человеческого эритропоэтина на фармацевтическом производстве [10].

Учитывая, что набор реактивов для ИФА-анализа создан для определения содержания эритропоэтина (а не дарбэпоэтина) в биологических жидкостях человека (а не животных), необходимо подтвердить пригодность набора для выполнения аналитических испытаний в плазме крови экспериментальных животных и далее отработать и валидировать методику определения содержания дарбэпоэтина в плазме крови кроликов. О принципиальной возможности такого использования подобных наборов свидетельствуют работы [9, 11].

На первом этапе работ была проведена оценка пригодности набора реагентов для определения содержания эритропоэтина в контрольном образце, входящем в состав набора, в плазме крови кроликов и в модельных смесях с добавкой препарата, содержащего ДЭПО. Выполнение определения концентрации эритропоэтина точно в соответствии с инструкцией к набору [12] приводило к неадекватным результатам, в связи с чем в методику были внесены изменения [увеличены число и длительность промывок (7 раз по 350 мкл), промывку проводили при повышенной температуре (37 °С), сокращено время инкубации с ТМБ (10 мин)]. Было установлено, что зависимость оптической плотности стандартных растворов от концентрации эритропоэтина является линейной, коэффициент корреляции для всех независимых экспериментов (планшетов) был больше 0,995. Вычисленное по калибровочному уравнению значение концентрации эритропоэтина в контрольном растворе находилось в требуемом диапазоне концентраций от 20 до 30 мМЕ/мл [12]. Кроме того, относительные стандартные отклонения (RSD, %), полученные при анализе контрольных растворов из различных наборов одной

серии, меньше 15%, что удовлетворяет валидационным требованиям [13]. Экспериментальные данные, полученные в ходе проверки работоспособности набора, соответствовали требованиям, указанным в инструкции к набору, что позволило сделать вывод о том, что тестируемая система пригодна для дальнейших испытаний.

Поскольку в ходе исследований в методику определения содержания эритропоэтина были внесены некоторые изменения, следующим этапом работы стала её ревалидация и уточнение оптимального типа биологического материала для исследования.

Для выбора оптимального типа биологического материала от интактных кроликов забирали кровь, получали сыворотку и плазму с применением различных антикоагулянтов (гепарин и ЭДТА) и определяли в полученном биоматериале нативное содержание эритропоэтина (таблица 1). Критерием выбора являлось минимальное значение относительного стандартного отклонения, полученное при усреднении результатов.

Таблица 1.

Содержание эритропоэтина в различных видах биологического материала интактных кроликов ($\bar{X} \pm SD$, мМЕ/мл) (n=4)

Тип биологического материала	Антикоагулянт	Концентрация ЭПО, мМЕ/мл	RSD, %
Сыворотка	–	10,4±1,1	10,6
Плазма	Гепарин натрия	10,8±2,1	19,4
Плазма	ЭДТА-Na ₂	10,3±0,2	2,0

Наименьшее значение RSD (2,0%) было получено для плазмы крови кроликов с ЭДТА. Поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана плазма с добавлением в качестве антикоагулянта ЭДТА.

Для отработки методики определения содержания дарбэпоэтина в плазме крови кроликов были выполнены аналитические испытания с пробами плацебо и дарбэпоэтином для подтверждения пригодности наборов реагентов для анализа этого соединения и выбора оптимальных концентраций. По результатам проведенных экспериментов установлено мешающее влияние плацебо в диапазоне концентраций выше 10⁻⁴ мкг/мл, так как оптическая плотность реакционных смесей с плацебо и раствора препарата имели одинаковые значения. При добавлении аналита и плацебо к плазме в объеме не более 20% от объема плазмы плацебо не оказывало влияния на результаты анализа.

Поскольку дарбэпоэтин обладает той же специфичностью, что и нативный эритропоэтин, нет необходимости подтверждать аффинность взаимодействия антител тест-системы и исследуемого аналита и наборы для определения ЭПО могут быть использованы для анализа ДЭПО.

Методики определения содержания ЭПО и ДЭПО в плазме крови кроликов были валидированы согласно рекомендациям [13, 14, 15] по следующим параметрам: специфичность (Specificity), линейность (Linearity), точность (или правильность, Accuracy), прецизионность (Precision).

Специфичность или реже селективность (Selectivity) – способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце (примеси, вспомогательные вещества). Специфичность набора ИФА определяется прежде всего специфичностью антител, иммобилизованных в лунках микропланшета. В описании к набору указано, что специфичность (перекрестная реактивность) для ЭПО составляет 100%.

Для проверки специфичности детектирования окрашенного продукта ферментной реакции были записаны УФ-спектры испытуемых растворов и растворов стандартных образцов ЭПО и ДЭПО в диапазоне длин волн 350–650 нм. Типичные УФ-спектры растворов представлены на рисунке 1.

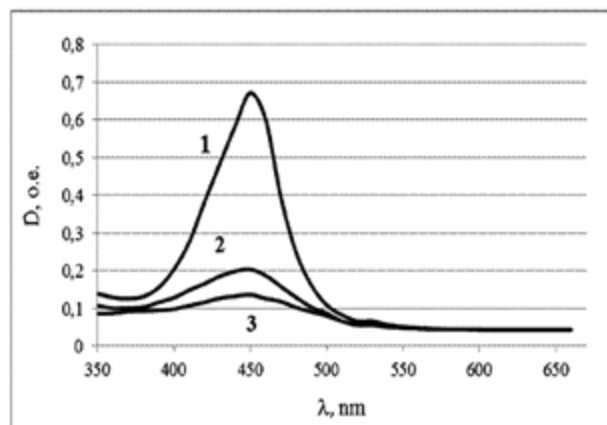


Рисунок 1. Типичные УФ-спектры продуктов реакции, полученные при анализе ЭПО (1 – плазма кролика с добавкой калибровочного раствора ЭПО с концентрацией 800 пг/мл, 2 – плазма кролика с добавкой калибровочного раствора ДЭПО с концентрацией 100 пг/мл; 3 – плазма интактного кролика)

Для детектируемой области характерно наличие четкого максимума при 450±2 нм в пробах, содержащих ЭПО или ДЭПО. Наличие данного максимума в пробе интактной плазмы кролика свидетельствует о присутствии в ней нативного уровня ЭПО.

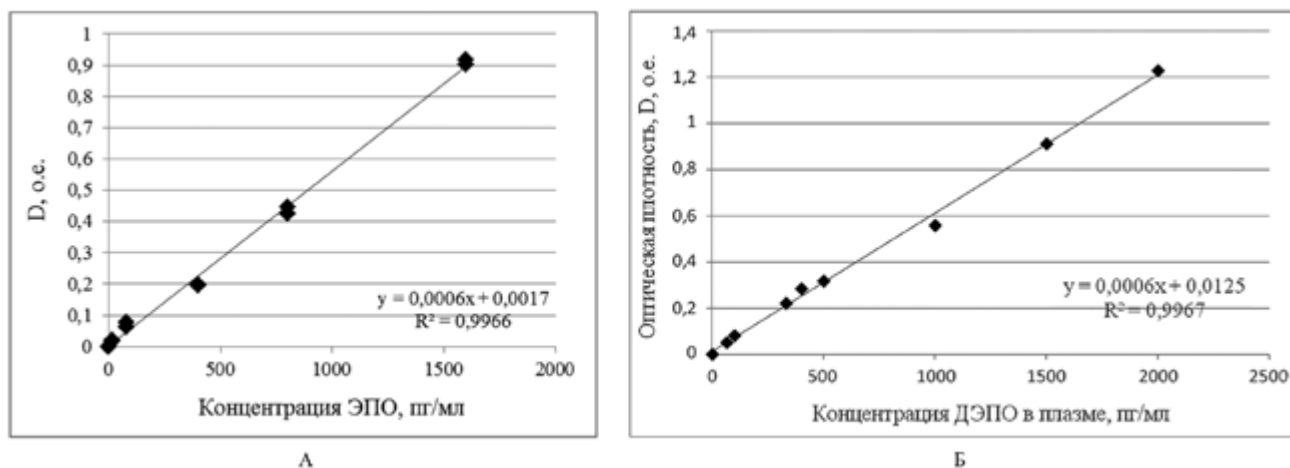


Рисунок 2. Типичная линейная зависимость оптической плотности реакционной смеси от концентрации ЭПО (А) или ДЭПО (Б) в калибровочных образцах (пг/мл)

Для каждого независимого эксперимента (планшета) строили свой калибровочный график и определяли концентрацию ЭПО в контрольном образце. Абсолютные значения оптической плотности растворов плохо воспроизводятся, поэтому для дальнейших расчетов использовали значения исправленной оптической плотности $D = D_{ст} - D_{ст0}$, отличающиеся хорошей воспроизводимостью для всех проведенных независимых экспериментов. Зависимость оптической плотности реакционных смесей от концентрации ЭПО в калибровочных образцах является линейной для диапазона концентраций 16–1600 пг/мл (рисунок 2А). Подобные зависимости были получены для всех независимых экспериментов (планшетов).

Для определения линейного диапазона ДЭПО в плазму крови кроликов вносили определенные количества испытуемых растворов препарата «Аранесп», создавая концентрацию ДЭПО в плазме крови от 0,1 пг/мл до 10000 пг/мл. Для модельных смесей плазмы интактных кроликов с растворами препарата с концентрацией выше 2000 пг/мл получали D раствора больше 2 о.е. и выходили за границы линейности спектрофотометра. Для модельных смесей плазмы с растворами ДЭПО с концентрациями меньше 67 пг/мл оптическая плотность реакционных смесей не имела статистических значимых отличий от значений, получаемых для плазмы интактных кроликов. Зависимость оптической плотности растворов ДЭПО от концентрации имеет линейный характер в пределах от 67 до 2000 пг/мл (рисунок 2Б). Согласно рекомендациям [15, 16] концентрация ДЭПО, соответствующая наименьшей точке на калибровочной кривой, была принята в качестве нижнего предела количественного определения, то есть НПКО = 67 пг/мл. Предел обнаружения (ПО), или чувствительность методики для ЭПО и ДЭПО, рассчитывали

по формуле $D_{ПО} = D_{плазма} + 2SD_{плазма}$. Затем полученное значение $D_{ПО}$ использовали для расчетов ПО в пг/мл по калибровочному уравнению. ПО в плазме крови кролика не превышало для ЭПО 3, 84 пг/мл, для ДЭПО – 45 пг/мл.

Валидационные параметры методик определения ЭПО и ДЭПО в плазме крови кроликов представлены в таблице 2. По всем параметрам получены результаты, удовлетворяющие требованиям [13–15].

Таким образом, методики количественного определения эритропоэтина и дарбэпоэтина в плазме кроликов методом ИФА с применением наборов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» валидированы в соответствии с современными требованиями и удовлетворяют им по всем показателям.

Разработанная и валидированная методика была применена для анализа биопроб, полученных после внутривенного и подкожного введения ДЭПО (рисунок 3).

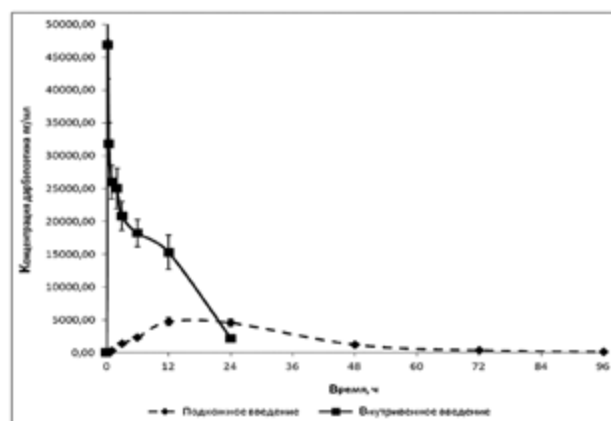


Рисунок 3. Кривая «концентрация – время» суммы эритропоэтина и дарбэпоэтина при однократном внутривенном и подкожном введении препарата «Аранесп» ($n=6, \bar{X} \pm S\bar{X}$)

Таблица 2.

Сводная таблица с результатами валидации методик определения эритропоэтина и дарбэпоэтина в плазме крови кроликов

Валидационный параметр	Уровень концентрации	Критерий приемлемости	Результат			
			Эритропоэтин		Дарбэпоэтин	
Специфичность детектирования окрашенного продукта	Плазма интактных кроликов, плазма с добавкой ДЭПО	Способность дифференцировать аналит от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов образца	Подтверждена увеличением оптической плотности в максимуме при 450 нм на фоне компонентов плазмы крови			
Линейный (калибровочный) диапазон	Калибровочные стандарты не менее чем шести концентраций, не менее 3 серий	Коэффициент корреляции линейной регрессии (r), r>0,99	16–1600 пг/мл, r>0,996		67–2000 пг/мл, r>0,995	
Нижний предел количественного определения (НПКО)	Концентрация аналита, соответствующая наименьшей точке на калибровочной кривой	НПКО Точность, менее 20% Прецизионность, менее 20%	16 пг/мл		67 пг/мл 12,9 15,6	
Предел обнаружения, пг/мл	Наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено, но не оценено точно количественно		3,84		45,0	
Точность, %	ВПКО	Не более 15%	1600пг/мл	0,91	2000пг/мл	2,0
	Середина линейного диапазона	Не более 15%	800 пг/мл	3,8	1000 пг/мл	4,8
	3*НПКО	Не более 15%	48 пг/мл	12,6	201 пг/мл	6,3
	НПКО	Не более 20%	16 пг/мл	12,5	67 пг/мл	12,9
Внутридневная // междневная прецизионность, %	ВПКО	Не более 15%	1600пг/мл	3,1–5,7//11,0	2000пг/мл	2,4–5,2//3,3
	Середина линейного диапазона	Не более 15%	800 пг/мл	3,5–7,2//13,6	1000 пг/мл	2,1–7,2//5,1
	3*НПКО	Не более 15%	48 пг/мл	10,1–14,3//14,1	201 пг/мл	4,2–8,8//6,2
	НПКО	Не более 20%	16 пг/мл	17,2–9,3//11,9	67 пг/мл	8,3–11,3//13,0

Как видно из представленных данных, максимальная концентрация действующего вещества препарата в плазме крови после внутривенного введения наблюдается в первой точке отбора проб, максимальная концентрация после подкожного введения – через 12–24 ч после введения препарата. Значения максимальной концентрации после внутривенного введения практически в 9 раз выше, чем после подкожного. Параметры фармакокинетики, рассчитанные внемоделным методом – методом статистических моментов, приведены в таблице 3.

Установлено, что период полувыведения ($T_{1/2}$), среднее время удержания (MRT), время достижения максимальной концентрации в 1,6, 2,6 и 72 раза соответственно выше после подкожного введения, что свидетельствует о значительно более медленном выведении препарата после его подкожного введения. Значения максимальной концентрации и площади под фармакокинетической кривой значительно выше после внутривенного введения.

Таблица 3.

Показатели фармакокинетики дарбэпоэтина при однократном внутривенном и подкожном введениях препарата «Аранесп»

	C_{max} пг/мл	AUC_{0-24h} ч×пг/мл	$AUC_{0-\infty}$ ч×пг/мл	$AUMC_{0-24h}$ пг×ч ² /мл	MRT, ч	$T_{1/2}$, ч	T_{max} , ч
Внутривенное введение							
среднее	46839	351494	376553	3589690	10,0	7,3	0,25
Sx	5088	42485	37104	312206	1,5	1,2	0,0
Подкожное введение							
среднее	5348	173637	174938	4607400	26,2	11,6	18,0
Sx	450	15940	16084	560965	1,4	1,1	2,7

Абсолютная биологическая доступность (f_a) препарата «Аранесп» при подкожном введении, рассчитанная как отношение значений AUC при подкожном введении и внутрисосудистом введении препарата, составила около 50%, что сопоставимо с данными, полученными для дарбэпоэтина ранее на крысах [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана методика определения содержания дарбэпоэтина в плазме крови экспериментальных животных (кроликов) с помощью наборов реагентов для ИФА-анализа «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ». При подтверждении пригодности наборов для выполнения аналитических испытаний методика определения эритропоэтина была оптимизирована, экспериментально обоснован выбор в качестве биологического материала плазмы крови кроликов с добавлением в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислоты. Показана пригодность данных наборов для определения содержания как эритропоэтина, так и дарбэпоэтина в плазме крови лабораторных животных. Методика определения дарбэпоэтина α в плазме кроликов валидирована в соответствии с современными требованиями к валидации биоаналитических методик по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, точность (правильность). Линейный диапазон для дарбэпоэтина α составил от 67 до 2000 пг/мл, предел обнаружения – 31 пг/мл. Разработанная методика успешно применена для изучения фармакокинетических свойств препарата «Аранесп» при его внутривенном и подкожном введении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евразийская экономическая комиссия. Департамент промышленной политики. Информация о результатах анализа состояния и развития биотехнологической отрасли государств – членов Евразийского экономического союза. Москва. 2015. URL: http://www.eurasiancommission.org/ru/act/prom_i_agroprom/dep_prom/SiteAssets/ (дата обращения 14.06.2016).
2. Е.А. Ельцова, Г.В. Раменская, Е.А. Смолярчук, А.В. Бушманова. Биосимиляры – препараты будущего // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2015. № 1. С. 12–15.
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1. – М.: Гриф и К. 2013. С. 268–303.
4. Р. Иванов, Г. Секарёва, О. Кравцова и др. Правила проведения исследований биоаналоговых лекарственных средств (биоаналогов) // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2014. № 1. С. 21–36.
5. Д.В. Рейхарт, В.В. Чистяков. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях // Казанский медицинский журнал. 2010. № 4(91). С. 532–536.
6. Н.А. Гаврилова, А.М. Черемных, Н.А. Бобренева и др. Гемопоэтическая активность и фармакокинетика гибридных белков EPO-Fc, EPO-Fcneo и Alb-EPO – производных эритропоэтина человека // Биотехнология. 2012. № 5. С. 38–49.
7. J.C. Egrie, E. Dwyer, J.K. Browne et al. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant erythropoietin // Experimental Hematology. 2002. V. 31. P. 290–299.
8. В.М. Ермоленко, О.Б. Маргиева, Е.В. Шутов, А. Усубалива. Фармакокинетика рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭРП) при внутривенном, подкожном и внутрибрюшном введении у больных на перитонеальном диализе (ПД) // Нефрология и диализ. 2004. № 3(6). С. 235–238.
9. B. Agoram, A.C. Heatherington, M.R. Gastonguay. Development and evaluation of a population pharmacokinetic-pharmacodynamic model of darbepoetin alfa in patients with nonmyeloid malignancies undergoing multicycle chemotherapy // The AAPS Journal. 2006. V. 8. № 3. P. E552–E562.
10. Т.И. Колочева, С.С. Решетников. Новый набор реагентов для определения эритропоэтина в биологических жидкостях // Новости «Вектор-Бест». 2008. № 2 (48). С. 9–12. URL: <https://vector-best.ru/publ/nvb/n48.pdf> (дата обращения 15.06.2016).
11. M. Allon, K. Kleinman, M. Walczyk et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of darbepoetin alfa and epoetin in patients undergoing dialysis // Clinical Pharmacology & Therapeutic. 2002. V. 72. P. 546–555.
12. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации эритропоэтина в сыворотке (плазме) крови. Инструкция по применению. Новосибирск: Вектор-Бест. 2012. 27 с.
13. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London, 2009.
14. МУ 3.3.2.1886-04. Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: порядок проведения и представления результатов. Методические указания. 2004.
15. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. – Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2001.
16. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011.
17. E. Yoshioka, K. Kato, H. Shindo et al. Pharmacokinetic study of darbepoetin alfa: absorption, distribution, and excretion after a single intravenous and subcutaneous administration to rats // Xenobiotica. 2007. № 37(1). P. 74–90.