

На правах рукописи

Голощапова Евгения Олеговна

**РАЗРАБОТКА
ФАРМАКОПЕЙНЫХ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ
ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ СТРУКТУРЫ
СУБСТАНЦИЙ ИНТЕРФЕРОНОВ**

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Устинникова Ольга Борисовна

Официальные оппоненты:

Шмаров Максим Михайлович - доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной биотехнологии, руководитель лаборатории

Красильников Игорь Викторович - доктор биологических наук, Публичное Акционерное Общество «Институт стволовых клеток человека», директор по инновациям в биотехнологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (г. Москва)

Защита диссертации состоится «__»_____2022 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «__»_____2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Обеспечение фармацевтического рынка лекарственными средствами в настоящее время возможно с применением технологии рекомбинантной ДНК (ЕМА, 1994). Действующие вещества лекарственных препаратов, получаемых с помощью технологии рекомбинантной ДНК, представляют собой белки (например, интерфероны (ИФН)) (ГФ РФ). На фармацевтическом рынке представлены препараты на основе рекомбинантных человеческих интерферонов (рЧИФН) альфа-2а, альфа-2b, бета-1а, бета-1b, гамма-1b (grls.rosminzdrav.ru). Препараты рЧИФН альфа-2b и рЧИФН гамма-1b применяют для лечения инфекционных и онкологических заболеваний, препараты рЧИФН бета-1b и бета-1а - для лечения рассеянного склероза (Ершов Ф.И., 2005; ЕМА, 2013; Белевский А.С. с соавт., 2019).

В Российской Федерации зарегистрированы две метиониновые (на N-конце молекулы представлен метионин) и пять безметиониновых форм (в результате отщепления формилметионина N-концевым аминокислотным остатком становится цистеин) субстанций рЧИФН альфа-2b, две субстанции рЧИФН бета-1b и одна субстанция рЧИФН гамма-1b отечественного производства (grls.rosminzdrav.ru, Патент 2242516; Патент 2432401). Структурные отличия молекулы рЧИФН бета-1b от молекулы рЧИФН бета-1а заключаются в отсутствии гликозилирования и замене цистеинового аминокислотного остатка на остаток серина в позиции 17 (Патент 2473696; European Pharmacopoeia, 01/2009:1639).

В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ XIV издания) ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и международными требованиями необходима оценка подлинности рекомбинантного белка: биологическая активность и структура белка должны быть подтверждены пригодными методами в сравнении со стандартным образцом (СО). Фармакопейным методом оценки структуры рекомбинантного белка является метод пептидного картирования, позволяющий с точностью до одной аминокислоты охарактеризовать аминокислотную последовательность белка. Таким образом, применение стандартного образца CRS (Стандартный образец EDQM), кат. № I0320301, (безметиониновая форма формы рЧИФН альфа-2b) в качестве стандартного образца сравнения при пептидном картировании для метиониновой формы некорректно. Отечественными производителями рЧИФН бета-1b подтверждение подлинности методом пептидного картирования не проводится, рассмотрение стандартного образца рЧИФН бета-1а CRS (кат. № Y0001101) в качестве стандартного образца сравнения при разработке методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b в силу структурных различий данных белков некорректно. Применение

отечественным производителем при пептидном картировании рЧИФН гамма-1b стандартного образца CRS (кат. № I0320330) корректно.

Таким образом, разработка фармакопейных стандартных образцов (ФСО) рЧИФН альфа-2b (метиониновая форма) и рЧИФН бета-1b является актуальной.

Степень разработанности темы исследования

Фармакопейные требования к рЧИФН альфа-2b изложены в ФС 3.3.1.0069.18 «Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b, субстанция раствор, раствор замороженный» ГФ РФ и монографии 07/2015:1110 Европейской Фармакопеи. В соответствии с данными требованиями необходима оценка подлинности структуры молекулы данного белка методами изоэлектрического фокусирования, пептидного картирования, электрофореза в полиакриламидном геле. В качестве СО сравнения в монографии Европейской Фармакопеи предусмотрен образец CRS, кат. № I0320301, представляющий собой безметиониновую форму субстанции рЧИФН альфа-2b. Кроме того, подлинность оценивают, подтверждая специфическую противовирусную активность в сравнении с международным стандартным образцом NIBSC кат. № 95/566.

Фармакопейные требования к рЧИФН бета-1b отсутствуют. В Европейской фармакопее представлена монография на рЧИФН бета-1a 01/2009:1639, согласно которой подлинность молекулы оценивают следующими методами: масс-спектрометрия для анализа гликанов (распределение изоформ), пептидное картирование. Поскольку в молекуле рЧИФН бета-1b отсутствуют гликаны, методом подтверждения его структуры остается пептидное картирование, однако структурные различия рЧИФН бета-1a и бета-1b и связанные с ними физические свойства белков не позволяют использовать CRS (кат. № Y0001101) и методику, приведенную в вышеуказанной монографии.

Цель исследования – разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры молекулы рЧИФН альфа-2b (метиониновая форма) и молекулы рЧИФН бета- 1b.

Задачи исследования:

1. Изучить международные и отечественные регуляторные требования, а также требования нормативной документации производителей фармацевтических субстанций рЧИФН альфа и рЧИФН бета к оценке подлинности структуры белка, выбору стандартных образцов, проведению аттестации и применению стандартных образцов.

2. Разработать требования к кандидатам в фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b, выбрать и охарактеризовать материал данных фармакопейных стандартных образцов.

3. Разработать новый способ оценки подлинности первичной структуры молекулы рЧИФН бета-1b методом пептидного картирования с изучением специфичности и прецизионности данного способа.

4. Установить аттестованную характеристику фармакопейных стандартных образцов метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b с проведением сравнительного анализа пептидных карт разработанных фармакопейных стандартных образцов, рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b разных производителей.

5. На основе исследования стабильности в режиме реального времени установить срок годности разработанных фармакопейных стандартных образцов метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b.

Научная новизна

Разработаны требования к кандидату в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b, включающие наиболее полную оценку качества субстанции производителем в соответствии с требованиями международных документов; форму выпуска, удобную для применения и пригодную для условий хранения; соответствие аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным (не менее 95%).

Разработаны требования к кандидату в ФСО рЧИФН бета-1b, включающие отсутствие в составе вспомогательных веществ белковой или иной природы, потенциально влияющих на профиль пептидной карты; стабильность раствора ФСО; соответствие требованиям спецификации на субстанцию за исключением показателей, изменяемых направленно (формы выпуска, pH и т.д.); соответствие аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным (не менее 95%).

Разработан и охарактеризован фармакопейный стандартный образец метиониновой формы рЧИФН альфа-2b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования (ФСО 3.2.00433), который представляет собой замороженный раствор (концентрация 1 мг/мл, объем розлива 0,5 мл) с аттестованной характеристикой в виде абсолютного времени удерживания четвертого пика 33,8–37,0 мин, относительного времени удерживания первого пика 0,61–0,66, второго пика 0,74–0,78, третьего пика 0,90 – 0,95, пятого пика 1,02–1,03, шестого пика 1,03–1,04, седьмого пика 1,37–1,43, восьмого пика 1,51–1,59.

Разработан и охарактеризован фармакопейный стандартный образец рЧИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования (ФСО 3.2.00447), который представляет собой лиофилизат рЧИФН бета-1b без стабилизаторов белковой природы (0,25 мг/флакон) с аттестованной характеристикой в виде абсолютного времени удерживания третьего пика 42,0–43,2 мин, относительного времени удерживания первого пика 0,61–0,66, второго пика

0,68–0,73, четвертого пика 1,04–1,06, пятого пика 1,14–1,15, шестого пика 1,22 – 1,24, седьмого пика 1,29 – 1,30.

Разработана методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-C» и ацетатного буферного раствора для оценки подлинности первичной структуры молекулы с изучением ее специфичности и прецизионности.

На основании полученных пептидных карт экспериментально показана возможность применения разработанных фармакопейных стандартных образцов с установленной аттестованной характеристикой для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций в практической деятельности разных фармацевтических предприятий.

На основе проведенных исследований стабильности в режиме реального времени экспериментально установлен срок годности разработанных фармакопейных стандартных образцов метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b – 2 года, в течение которого профиль пептидной карты и время удерживания пиков остаются стабильными.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанные фармакопейные стандартные образцы позволяют унифицировать и стандартизовать подтверждение подлинности первичной структуры новых серий фармацевтических субстанций рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b разных производителей. Благодаря этому, повышается уровень оценки качества лекарственных препаратов на основе рЧИФН альфа и рЧИФН бета, широко используемых в медицинской практике.

Получены новые данные, подтверждающие способность фермента «эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8» гидролизовать рЧИФН бета-1b в ацетатном буферном растворе рН 4,50–4,57, что дополняет современные представления о пептидном картировании рекомбинантных белков.

Разработанная методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b может быть использована фармацевтическими предприятиями для оценки подлинности первичной структуры новых серий субстанций рЧИФН бета-1b на этапе готовой субстанции, не содержащей стабилизаторов белковой природы, или на этапе полупродукта до добавления вспомогательных веществ белковой природы.

Разработанная методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-C» и ацетатного буферного раствора позволяет выявлять специфичные фрагменты молекулы, отличающие данный белок от рЧИФН бета-1a, включая N-концевую последовательность, и замену аминокислоты в позиции 16(17).

Разработаны и утверждены паспорт на Стандартный образец метиониновой формы интерферона альфа-2b (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) и паспорт на Стандартный образец интерферона бета-1b (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)).

Разработанные фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) и рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)) могут быть использованы в качестве образцов сравнения разными фармацевтическими предприятиями для оценки подлинности первичной структуры новых серий субстанций, что способствует единообразию проведения испытаний и стандартизации требований к показателю «Подлинность» однотипных субстанций разных производителей.

Разработанные фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b внедрены в практическую деятельность фармацевтических компаний ООО «Фармапарк» и АО «Генериум» (акт внедрения от 18.03.2022), а также ООО НПП «Фармаклон» (акт внедрения от 16.09.2021).

Методология и методы исследования

Методология работы спланирована в соответствии с поставленной целью и задачами исследования. Предметом исследования являются рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b. Работа выполнялась поэтапно с целью достижения поставленных задач: разработка требований к кандидатам в ФСО рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b, выбор кандидатов в ФСО и их формы выпуска, оценка качества кандидатов в ФСО, разработка методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b, установление аттестованной характеристики ФСО рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b, оценка стабильности и установление срока годности разработанных ФСО рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b в режиме реального времени. В работе применены современные общепризнанные физико-химические методы исследования, в том числе высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия высокого разрешения. Использованы методы статистического анализа. Для определения аттестованной характеристики ФСО рассчитывали среднее значение абсолютного и относительного времени удерживания пика и стандартное отклонение результатов (S). Диапазон времени (абсолютное и относительное) удерживания каждого пика вычисляли как $\pm 2S$ ($\pm 3S$) от среднего значения. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием статистических формул программы Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США).

Личный вклад автора в получении результатов

Соискатель самостоятельно провела анализ международных и отечественных нормативных требований, а также требований нормативной документации производителей субстанций рЧИФН альфа, рЧИФН бета и рЧИФН гамма. Автор анализировала литературные данные в рамках темы исследования, разработала требования к кандидатам в фармакопейные стандартные образцы метиониновой

формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b, непосредственно принимала участие на всех этапах экспериментальной работы, разработала способ подтверждения структуры рекомбинантного интерферона бета-1b, осуществила статистическую обработку результатов.

Установление аттестованной характеристики ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433) осуществляли совместно с начальником отдела контроля качества К.Э. Хечиевой (ООО «Фармапарк»). Масс-спектрометрическое исследование кандидата в ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433) осуществляли совместно со с.н.с., к.ф.-м.н. А.С. Кононихиным (Центр коллективного пользования "Новые материалы и новые технологии", созданный на базе ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН). Оценку качества и масс-спектрометрическое исследование кандидата в ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)), установление его аттестованной характеристики осуществляли совместно со с.н.с. отдела аналитических методов М.Б. Дегтерёвым (АО «Генериум»).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработан и охарактеризован фармакопейный стандартный образец метиониновой формы рЧИФН альфа-2b, позволяющий анализировать подлинность первичной структуры молекулы новых серий субстанций разных производителей.

2. Разработан новый способ оценки подлинности первичной структуры молекулы рЧИФН бета-1b методом пептидного картирования, позволяющий оценить подлинность первичной структуры молекулы на этапе полупродукта до добавления вспомогательных веществ белковой природы или на этапе готовой субстанции, не содержащей стабилизаторов белковой природы.

3. Разработан и охарактеризован фармакопейный стандартный образец рЧИФН бета-1b, позволяющий анализировать подлинность первичной структуры молекулы новых серий субстанций, не содержащих стабилизаторов белковой природы, или полупродукта до добавления вспомогательных веществ белковой природы.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, полученных в ходе работы, обеспечивается значительным объемом проведенных исследований, применяемых для решения поставленных задач, и методов исследования, использованием корректного статистического анализа первичных данных.

Работа выполнена в рамках государственных заданий ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на осуществление прикладных научных исследований и разработок в период с 2015 года по настоящее время при проведении следующих научно-исследовательских работ: «Совершенствование системы разработки и применения СО, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств (№ государственной регистрации 115111740007)»;

«Научное обоснование перспективных направлений совершенствования методологии экспертизы лекарственных средств (№ госрегистрации ГР АААА-А18-118021590049-0)»; «Разработка перспективных направлений совершенствования экспертизы качества, эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и стандартизация методов их оценки (№ госрегистрации 121022000147-4)».

Апробация работы состоялась на заседании Ученого совета Федерального государственного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 1 от 22.03.2022 г.).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: третьей научно-практической конференции молодых ученых «Приоритетные направления развития экспертной деятельности в области обращения лекарственных средств» (Москва, 2014); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» (Москва, 2020); XXIX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2022).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 9 научных работ, из которых 4 – статьи в рецензируемых изданиях, 2 статьи – в других изданиях, 3 тезисов – в материалах конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 127 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка используемой литературы, приложения. Диссертация содержит 26 таблиц, иллюстрирована 42 рисунками. В список литературы включены 36 отечественных и 114 зарубежных источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка и аттестация стандартного образца метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования

В настоящее время в России производят семь субстанций рчИФН альфа-2b, пять из которых являются безметиониновыми и идентичными эндогенному ИФН альфа-2b, где N-концевым аминокислотным остатком молекулы является цистеин вследствие отщепления формилметионина, и две – метиониновыми: содержат на N-конце молекулы метионин. На основании сравнительного анализа показателей оценки качества метиониновых субстанций рчИФН альфа-2b в качестве кандидата

в ФСО нами была выбрана метиониновая субстанция ООО "Фармапарк", как более полно охарактеризованная в соответствии с международными требованиями.

Учитывая требования методики пептидного картирования монографии Европейской Фармакопеи 07/2015:1110 "Interferon alfa-2 concentrated solution", для кандидата в ФСО мы изменили концентрацию рЧИФН альфа-2b и вместо концентрации 2,5 мг/мл рЧИФН альфа-2b в субстанции мы использовали концентрацию 1,0 мг/мл рЧИФН альфа-2b в ФСО. Принимая во внимание необходимость длительного хранения ФСО при температуре не выше минус 40°C, мы использовали форму выпуска ФСО, пригодную для применения, соответствующую назначению и условиям хранения ФСО: стерильные полипропиленовые криобирки вместимостью 1 мл (объем розлива - 0,5 мл).

Следующим этапом исследования было проведение испытаний по оценке качества кандидата в ФСО в соответствии со спецификацией на субстанцию (НД РN003726/01), за исключением раздела «Упаковка». В связи с тем, что кандидат в ФСО предназначен для оценки подлинности первичной структуры вновь выпускаемых серий субстанций метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и является образцом сравнения, мы проанализировали аминокислотную последовательность молекулы кандидата в ФСО с помощью метода масс-спектрометрии. Проведенные исследования показали 100% соответствие аминокислотной последовательности и наличие метионина на N-конце молекулы, что соответствует требованиям Европейской Фармакопеи (соответствие должно быть не менее 95%). Также подтвердили образование дисульфидных связей.

Таким образом, разработка ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b включала следующие этапы: разработка требований к кандидату в ФСО, выбор кандидата в ФСО и формы его выпуска, проведение испытаний по оценке качества в соответствии с разработанной спецификацией, включающей 100%-ную характеристику аминокислотной последовательности и подтверждение положения дисульфидных связей.

Для аттестации ФСО, используемых при контроле качества биологических лекарственных препаратов, как правило, применяют ту же методику, что и для последующего анализа испытуемых образцов (Волкова Р.А. и соавт., 2017). ФСО и методика представляют собой единый комплекс, в котором валидационные характеристики методики и аттестованная характеристика ФСО взаимосвязаны.

Для оценки подлинности метиониновой формы рЧИФН альфа-2b методом пептидного картирования мы использовали методику, представленную в Монографии Европейской Фармакопеи 07/2015:1110. Методика предусматривает ферментативный гидролиз молекулы рЧИФН альфа-2b, который может влиять на стабильность получаемых результатов. Для выявления возможного влияния трипсина различных производителей и разных серий на хроматографический

профиль пептидной карты, мы провели сравнительное исследование с применением трипсина с разным составом и разной активностью (Таблица 1).

Таблица 1 – Свойства используемого трипсина

Трипсин	Активность, ЕД/мг	Наличие химотрипсина
Трипсин-1	8868	присутствует
Трипсин-2	9146	присутствует
Трипсин-3	3203	присутствует
Трипсин-4	13165	отсутствует

Для кандидата в ФСО были получены 30 хроматограмм с использованием четырех хроматографов: 8 хроматограмм с "трипсином 1"; 9 хроматограмм с "трипсином 2"; 8 хроматограмм с "трипсином 3" и 5 хроматограмм с "трипсином 4" (Рисунок 1 – 4).

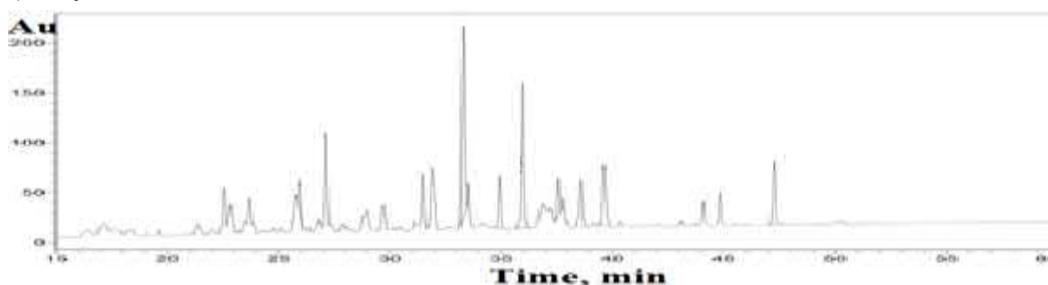


Рисунок 1 – Пептидная карта кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (Трипсин 3)

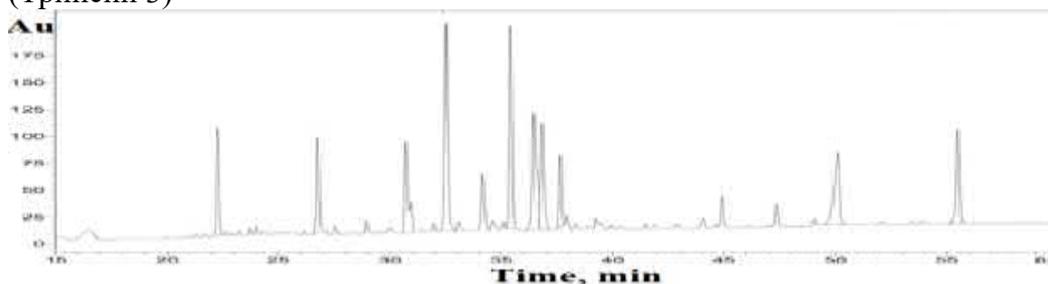


Рисунок 2 – Пептидная карта кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (Трипсин 4)

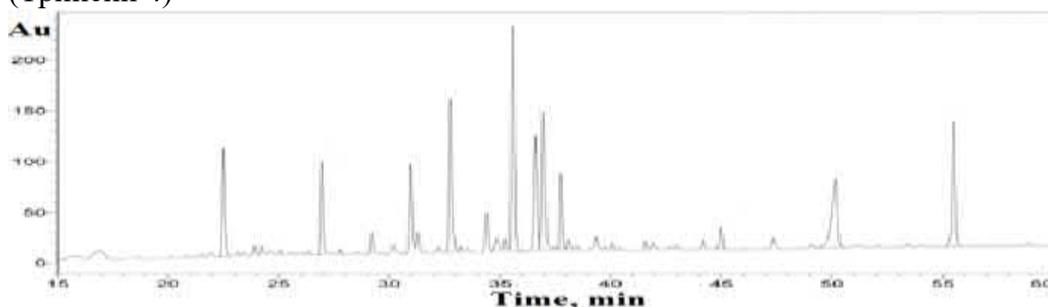


Рисунок 3 – Пептидная карта кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (Трипсин 1)

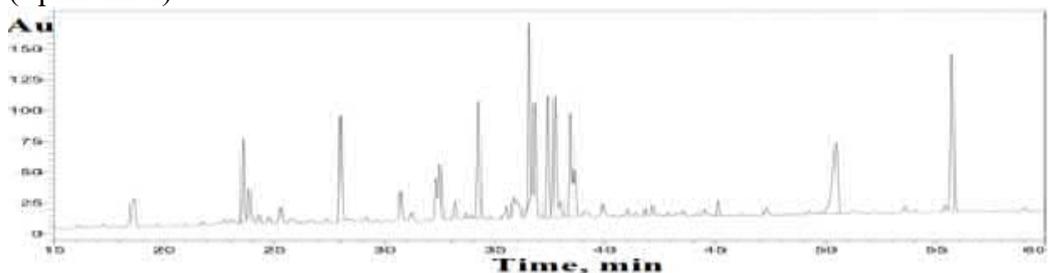


Рисунок 4 – Пептидная карта кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (Трипсин 2)

Как видно на рисунке 1, на пептидной карте, которую получили с применением трипсина 3, наблюдается большое количество кластерных пиков с плохим разрешением, что, предположительно, обусловлено недостаточной степенью гидролиза белка вследствие низкой активности фермента (3203 ЕД/мг).

Как видно на рисунке 2, на пептидной карте, которую получили с применением трипсина 4, наблюдается большое количество пиков со сходной высокой интенсивностью, что, предположительно обусловлено слишком глубоким гидролизом молекулы вследствие высокой активности фермента (13165 ЕД/мг).

Как видно из рисунков 3 и 4, профили пептидных карт, полученные с применением трипсина 1 и 2, совпадают, что свидетельствует о том, что использование разных серий трипсина одного производителя с одним каталожным номером не приводит к значительным изменениям профиля пептидных карт. При этом мы наблюдали восемь пиков с разной интенсивностью и оптимальной высотой с хорошим разрешением. В связи с этим мы выбрали трипсин с активностью 8800-9200 ЕД/мг (трипсин 1 и трипсин 2) для обоснования выбора характеристических пиков и установления аттестованной характеристики ФСО рЧИФН альфа-2b. Далее результаты, которые получили с трипсином 1 и трипсином 2, объединили в одну выборку (n=17), анализировали площадь и стабильность времени удерживания характеристических пиков (Рисунок 5, Таблица 2).

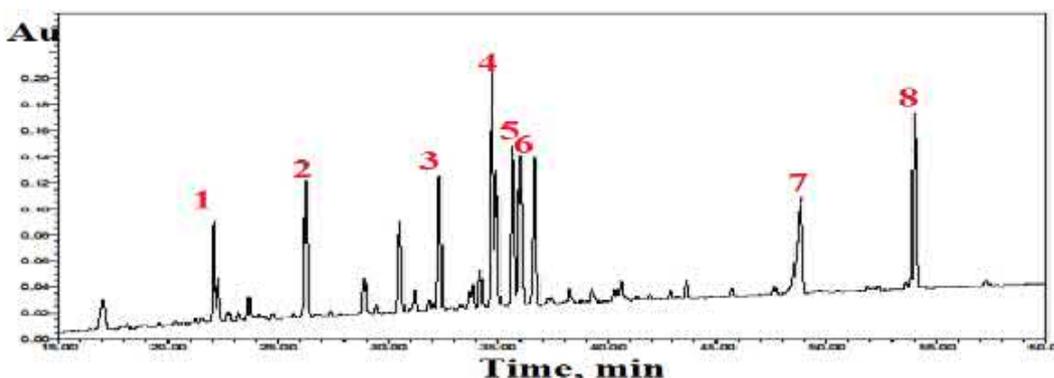


Рисунок 5 – Характеристические пики кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b

Таблица 2 – Статистический анализ абсолютного времени удерживания пиков на хроматограммах, полученных с применением трипсина 1 и 2

Пик	Среднее арифметическое значение абсолютного времени удерживания (n=17)	Среднеквадратичное отклонение (S)	RSD, %	Площадь пика (среднее значение)
Пик 1	22,49	0,87	3,87	641856
Пик 2	26,91	0,78	2,90	755382
Пик 3	32,73	1,05	3,21	1036466
Пик 4	35,38	0,79	2,23	1698978
Пик 5	36,31	0,77	2,12	1155673
Пик 6	36,65	0,77	2,10	1162756
Пик 7	49,56	0,80	1,61	1161020
Пик 8	54,82	0,85	1,55	1287807

Как следует из таблицы 2, наиболее стабильными являются пики 2, 4, 5 и 6 (стандартное отклонение абсолютного времени удерживания данных пиков 0,78, 0,79, 0,77 и 0,77 соответственно), при этом наибольшей площадью обладает пик 4.

Для идентификации аминокислотной последовательности пептидов, соответствующих восьми выбранным характеристическим пикам, отобрали восемь фракций после хроматографического разделения пептидов, полученных в результате предварительного гидролиза кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (для гидролиза использовали трипсин 1). Далее фракции исследовали с помощью метода масс-спектрометрии высокого разрешения. В результате масс-спектрометрического исследования нами было установлено, что фракция, соответствующая пику 2, содержит пептид, включающий N-концевой фрагмент молекулы, а фракция, соответствующая пику 8 – наибольший участок молекулы (29 аминокислотных остатков). В целом фракции, соответствующие характеристическим пикам, обеспечивают покрытие около 56% аминокислотной последовательности кандидата в ФСО (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты масс-спектрометрического исследования аминокислотной последовательности пептидов, представляющих фракции кандидата в ФСО рЧИФН альфа-2b

Пик	Аминокислотная последовательность пептида	Положение в молекуле (номер аминокислотного остатка)
Пик 1	AEIMR	146 ÷ 150
Пик 2	MCDLPQTH	1 ÷ 8
Пик 3	YSPCAW	136 ÷ 141
Пик 4	DSSAAWDETLDDK	72 ÷ 84
Пик 5	DRHDFGFPPQEEFGNQFQK	33 ÷ 50
Пик 6	HDFGFPPQEEFGNQFQK	35 ÷ 50
Пик 7	AETIPVLHEMIQQIF	51 ÷ 65
Пик 8	FYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMK	85 ÷ 113

На основании проведенного нами исследования установили аттестованную характеристику как среднее арифметическое значение абсолютного и относительного времени удерживания характеристических пиков с отклонением от среднего значения $\pm 2S$ в виде диапазона (n=17). В качестве основного пика выбрали четвертый пик, обладающий наибольшими интенсивностью и площадью, для которого представили аттестованную характеристику в виде диапазона абсолютного времени удерживания (Таблица 4).

Таблица 4 – Аттестованная характеристика ФСО рЧИФН альфа-2b

Номер пика	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5	Пик 6	Пик 7	Пик 8
Абсолютное время удерживания основного характеристического пика	–	–	–	33,80 ÷ 36,95 мин	–	–	–	–
Относительное время удерживания характеристического пика	0,61 ÷ 0,66	0,74 ÷ 0,78	0,90 ÷ 0,95	–	1,02 ÷ 1,03	1,03 ÷ 1,04	1,37 ÷ 1,43	1,51 ÷ 1,59

Таким образом, нами был аттестован ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного

картирования (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) с установленной аттестованной характеристикой для 8 характеристических пиков. Далее для разработанного и аттестованного ФСО составили сопроводительную документацию: паспорт, инструкцию по применению, макеты этикеток.

Учитывая, что разработанный и аттестованный ФСО предназначен для оценки качества субстанций разных производителей, на следующем этапе работы мы провели сравнительный анализ пептидных карт, полученных для зарегистрированных отечественных субстанций рЧИФН альфа-2b, ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН альфа-2b CRS, в соответствии с разработанной нами инструкцией (Рисунок 5, Рисунок 6).

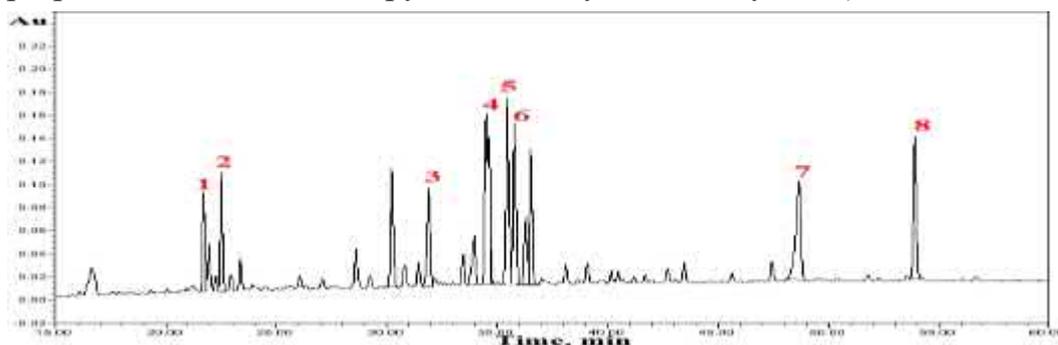


Рисунок 6 – Типичная пептидная карта рЧИФН альфа-2b CRS

При сравнении пептидных карт ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН альфа-2b CRS, представленных на рисунке 5 и рисунке 6, наблюдали различие времени удерживания второго пика в диапазоне 22-27 мин, обусловленное N-концевым метионином. При этом хроматограммы метиониновых образцов и хроматограмма аттестованного ФСО идентичны и отличаются от хроматограмм безметиониновых образцов в диапазоне 21-28 мин. Время удерживания характеристических пиков, полученное для образцов метиониновых субстанций, соответствовало установленным диапазонам ФСО. Таким образом, нами показана возможность применения разработанного ФСО для оценки подлинности вновь выпускаемых серий метиониновых субстанций разных производителей. Экспериментально обосновали срок годности разработанного ФСО (2 года) на основании результатов исследования стабильности (в режиме реального времени).

Разработка стандартного образца рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования

В Российской Федерации зарегистрированы две субстанции рЧИФН бета-1b отечественного производства. РЧИФН бета-1b, в отличие от рЧИФН бета-1a, представляет собой негликозилированный белок, стабильный в кислой среде. Стабильность рЧИФН бета-1b в одной субстанции достигается использованием ацетатного буферного раствора с рН 3,7-4,3 (образец 1), в другой - внесением стабилизатора белковой природы, что позволяет поддерживать стабильность субстанции при значениях рН 7,1-7,8, которые более предпочтительны при

создании лекарственных препаратов, предназначенных для парентерального введения.

Так как отечественные субстанции рчИФН бета-1b были зарегистрированы до включения ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантной ДНК» в ГФ РФ, в нормативной документации указанных субстанций отсутствует подтверждение подлинности молекулы рчИФН бета-1b методом пептидного картирования. Кроме того, в составе одной из них наличие стабилизатора белковой природы является мешающим фактором.

На основании предполагаемых условий применения нами были разработаны требования к кандидату в ФСО рчИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования:

- отсутствие вспомогательных веществ белковой или иной природы, потенциально влияющих на профиль пептидной карты;
- стабильность раствора ФСО;
- соответствие требованиям спецификации на субстанцию за исключением показателей, изменяемых направленно (например, формы выпуска, pH и т.д.);
- соответствие аминокислотной последовательности молекулы известным данным (не менее 95%).

В соответствии с разработанными нами требованиями в качестве кандидата в ФСО мы выбрали полупродукт рчИФН бета-1b производства АО «Генериум», отобранный на финальной стадии очистки до добавления стабилизатора белковой природы - человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Для обеспечения стабильности раствора рчИФН бета-1b при отсутствии белкового стабилизатора, полупродукт разбавляли в глициновом буфере (pH 3,0), содержащем трегалозу (50 мг/мл) и полисорбат 80 (0,05 мг/мл). Водородный показатель довели 2М раствором хлористоводородной кислоты до значения pH 3,0 - 3,5, конечное содержание рчИФН бета-1b составляло 0,25 мг/мл. Полученный раствор разливали по 1 мл во флаконы и лиофилизировали. Таким образом, на данном этапе работы нами был выбран кандидат в ФСО, который представляет собой лиофилизат рчИФН бета-1b без стабилизаторов белковой природы во флаконах (0,25 мг/флакон) (образец 2).

Качество кандидата в ФСО изучили на основании нормативной документации производителя субстанции, однако мы изменили некоторые показатели качества и некоторые требования к показателям качества в связи с различием состава и формы выпуска кандидата в ФСО и субстанции, на основе которой он изготовлен. Исключили показатели «Общий белок» и «Вирусная безопасность», так как в ФСО, в отличие от субстанции, отсутствует ЧСА. Изменили требования к показателю

«Описание», так как вместо замороженной формы выбрали лиофилизированную; изменили требования к показателю «рН». Также исключили показатель "Аномальная токсичность", а показатель "Стерильность" заменили на показатель "Микробиологическая чистота", так как ФСО не является лекарственным средством для человека. Таким образом, нами была разработана спецификация № ОКК-СПЦ-710-01, включающая в себя 16 показателей качества и позволяющая наиболее полно охарактеризовать ФСО. В соответствии с разработанной нами спецификацией мы изучили качество кандидата в ФСО рЧИФН бета-1b.

Поскольку кандидат в ФСО предназначен для оценки подлинности первичной структуры вновь выпускаемых серий субстанций рЧИФН бета-1b в качестве образца сравнения, мы проанализировали аминокислотную последовательность молекулы кандидата в ФСО с помощью метода масс-спектрометрии. Проведенные исследования показали 97% соответствие аминокислотной последовательности, что соответствует требованиям Европейской Фармакопеи (соответствие должно быть не менее 95%). Также подтвердили образование дисульфидной связи между цистеином в положении 30 и 140, что соответствует известной структуре молекулы рЧИФН бета-1b (Патент 2473696).

рЧИФН бета-1b и рЧИФН бета-1a имеют ряд существенных структурных различий в силу особенностей технологии производства. Данные различия носят принципиальный характер для оценки подлинности структуры методом пептидного картирования. В Монографии Европейской Фармакопеи 01/2009:1639 «Interferon beta-1a concentrated solution» представлена методика пептидного картирования рЧИФН бета-1a в сравнении с СО, в соответствии с которой гидролиз белка проводят с помощью эндопротеиназы LysC в 0,05М трисгидрохлоридном буферном растворе рН 9,0. Указанная методика пептидного картирования не может быть использована для рЧИФН бета-1b, так как рЧИФН бета-1b, в отличие от рЧИФН бета-1a, является негликозилированным белком, стабильным в кислой среде с рН 3,0 – 4,5, а в нейтральной и щелочной средах происходит быстрая денатурация данного белка. В связи с этим был проведен подбор фермента, способного гидролизовать белок в условиях стабильности, а также подбор оптимальных условий гидролиза (состав буферного раствора, рН буферного раствора, время гидролиза, температура гидролиза), которые оптимальны для рЧИФН бета-1b и выбранного фермента. Поэтому нами была разработана методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры молекулы.

На первом этапе разработки методики для гидролиза рЧИФН бета-1b мы выбрали фермент эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8, рекомендованный Монографией Европейской Фармакопеи 01/2010:20255 «Peptide mapping» и способный гидролизовать белок в кислой среде (в условиях, при

которых рЧИФН бета-1b стабилен и не подвергается денатурации). Для эндопротеиназы Glu-C характерен специфический гидролиз (расщепление пептидных связей молекулы после остатков глутаминовой кислоты) при pH 4,0-9,0.

Далее в качестве хроматографических условий разделения пептидов, получаемых на этапе гидролиза, при разработке методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b нами были выбраны хроматографические условия методики пептидного картирования, представленной в монографии Европейской Фармакопеи 07/2015:1110 «Interferon alfa-2 concentrated solution», в связи со сходной структурой белков рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b (отсутствие гликозилирования). При выборе хроматографической колонки учитывали рекомендации Европейской Фармакопеи для методики пептидного картирования рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1a, а также данные литературы о том, что использование хроматографической колонки, наполнителем которой является октадецилсилил (C18) силикагель с размером пор 300 Å, диаметром частиц 5 мкм, позволяет разделять пептиды, получаемые при ферментативном гидролизе белка, с оптимальным разрешением пиков на пептидной карте (Kenneth R., 1997).

При разработке условий гидролиза рЧИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-C мы выбрали ацетатный буферный раствор для создания необходимого pH реакционной среды (ГОСТ 4919.2-77). Образец 1 концентрировали с помощью центрифужных фильтров до концентрации белка около 0,6 мг/мл. Концентрирование данного образца проводили с помощью центрифуги Allegra 25R (Beckman Coulter, США) с применением центрифужных фильтров Amicon Ultra (Merck Millipore, Германия, кат. № UFC501024, объем 0,5 мл, Ultracel 10K). Для этого центрифужный фильтр заполняли водой и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 10 минут. После центрифугирования воду из фильтра удаляли. Затем в фильтр помещали анализируемый образец и центрифугировали при 7000 об/мин до уменьшения объема анализируемой субстанции в 2-2,5 раза. Образец 2 растворяли в воде для получения раствора с концентрацией около 0,6 мг/мл.

Далее к 50 мкл анализируемого образца рЧИФН бета-1b прибавляли 3 мкл раствора Endoproteinase Glu-C (1 мг/мл), 20 мкл ацетатного буферного раствора с pH в диапазоне от 4,0 до 4,57 и выдерживали при температуре 37 °C. Через 18 ч прибавляли 0,2 мл 6M раствора гуанидина гидрохлорида, 0,007 мл 2M раствора дитиотреитола, термостатировали при температуре 100 °C 1 минуту и охлаждали до температуры 2-8 °C. Образцы, полученные в результате гидролиза, использовали при проведении хроматографического разделения. Отсутствие аутогидролиза эндопротеиназы Glu-C подтверждали путем анализа контрольной пептидной карты, полученной при обработке эндопротеиназой Glu-C контрольного раствора - ацетатного буферного раствора (Рисунки 7 – 12).

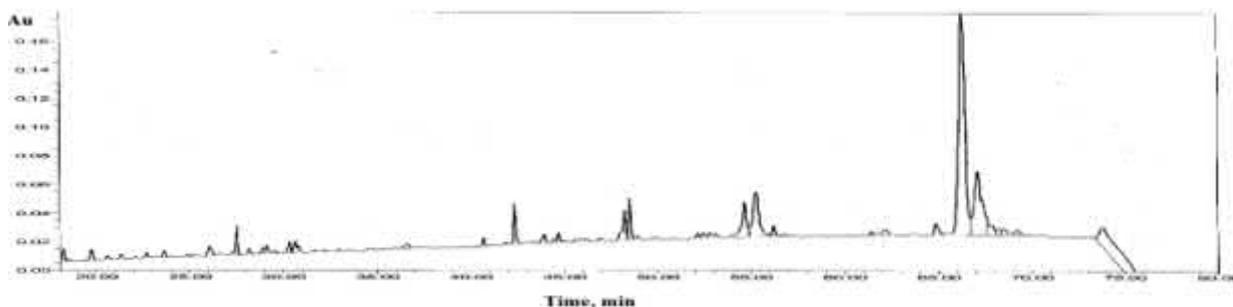


Рисунок 7 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (рН 4,0)

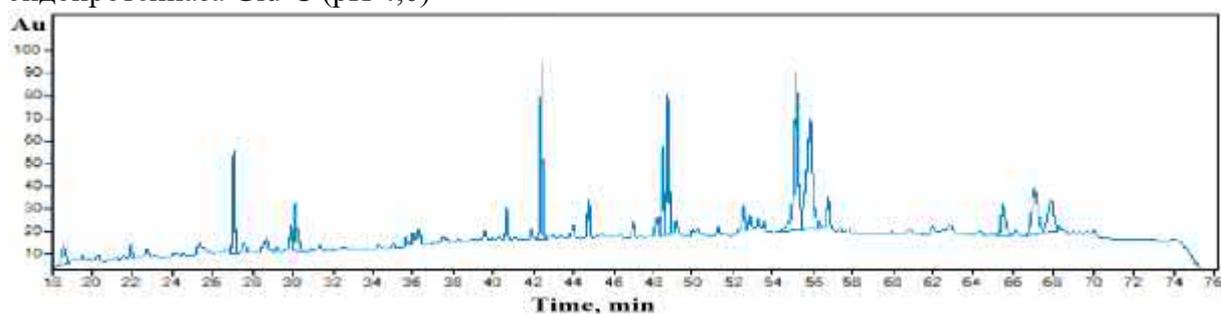


Рисунок 8 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (рН 4,2)

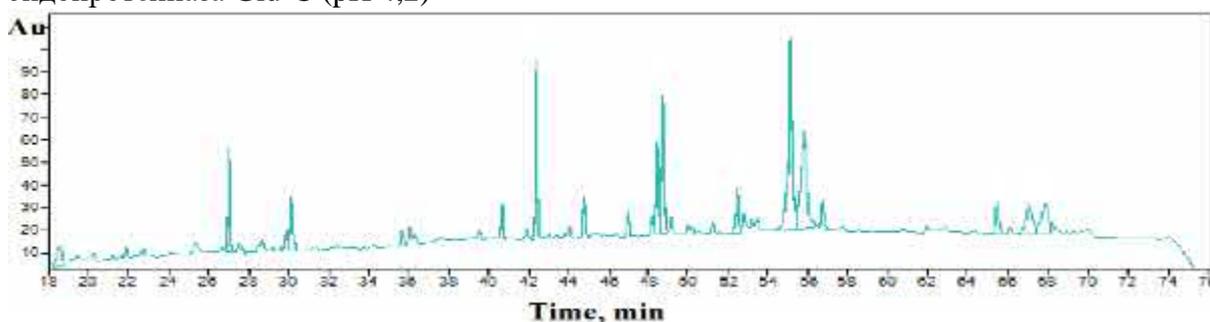


Рисунок 9 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (рН 4,3)

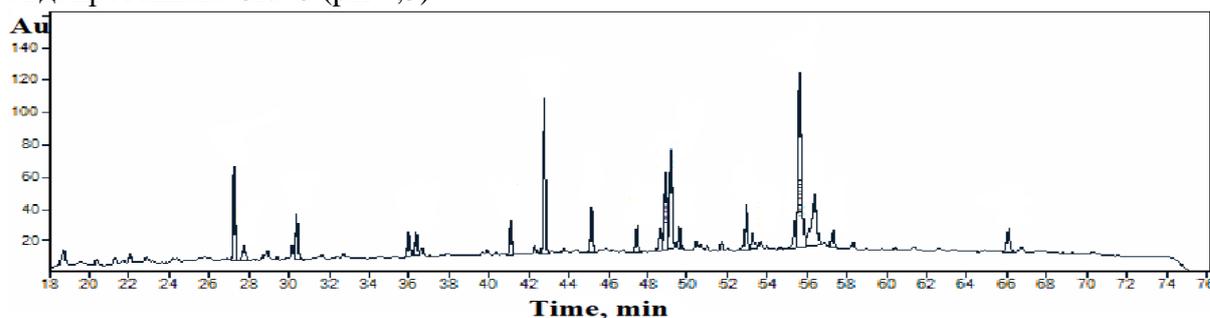


Рисунок 10 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (рН 4,50)

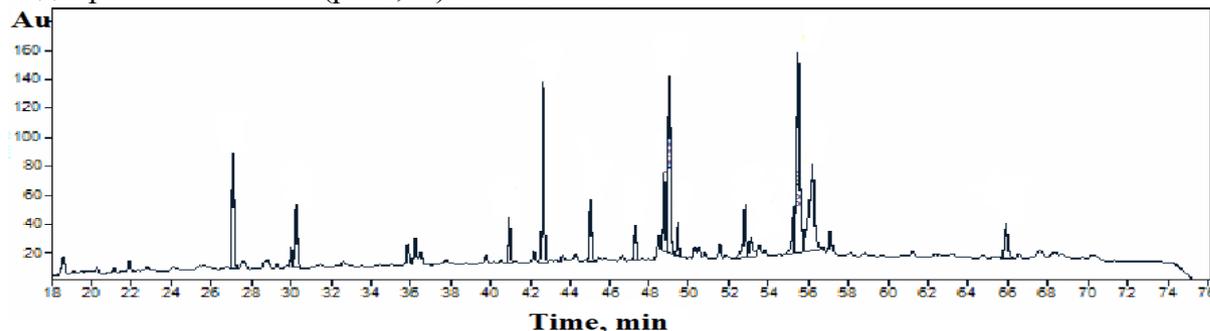


Рисунок 11 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (рН 4,54)

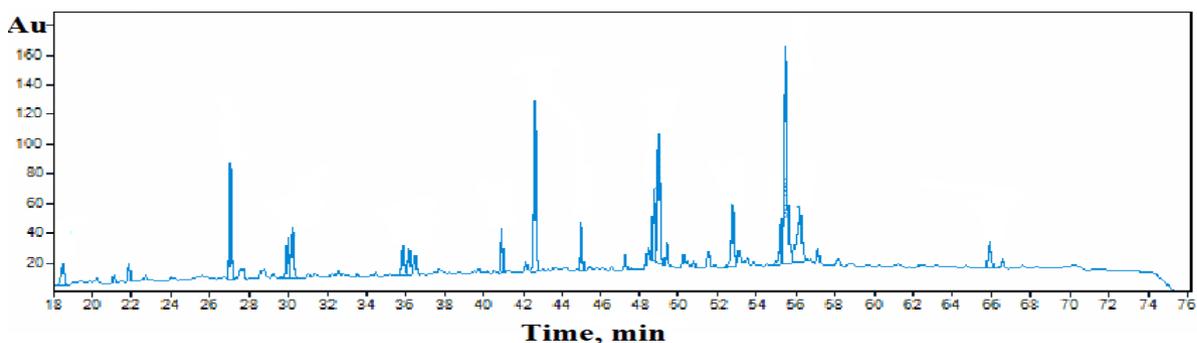


Рисунок 12 – Пептидная карта рчИФН бета-1b (образец б). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (рН 4,57)

Полный гидролиз рчИФН бета-1b эндопротеиназой Glu-C наблюдали при рН 4,50-4,57. Для пептидных карт, полученных в данных условиях, характерен стабильный профиль, позволяющий на основании анализа стабильности времени удерживания выбрать 7 характеристических хорошо разрешенных пиков, которые пронумерованы на хроматограмме (Рисунок 13). При этом профили пептидных карт образцов разных производителей в части характеристических пиков совпадали. Коэффициент вариации абсолютного времени удерживания каждого пика, рассчитанный на основании пептидных карт, которые мы получили для образцов разных производителей, не превышал 0,3% (n=12), что свидетельствовало о стабильности получаемых результатов.

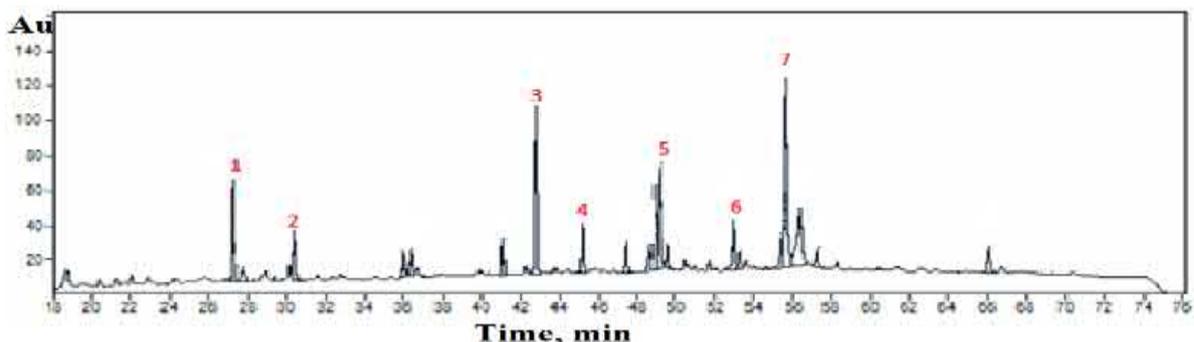


Рисунок 13 – Типичная пептидная карта рчИФН бета-1b

Также нами было рассчитано относительное время удерживания основных пиков на пептидной карте рчИФН бета-1b, которое свидетельствует о стабильности получаемых результатов. Пик №3 выбрали в качестве пика с установленным абсолютным временем удерживания на основании стабильности его времени удерживания (0,17%), интенсивности, высоком разрешении, факторе асимметрии (1,0) и данных масс-спектрометрического анализа аминокислотной последовательности каждого пептида, согласно которым основной пептид данной фракции состоит из 28 аминокислот – это наибольший пептид из тех, которые соответствуют пикам с максимальной интенсивностью на хроматограмме (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты масс-спектрометрического исследования

Пик	Фрагмент последовательности	Аминокислотная последовательность пептида
1	43-52	IKQLQQFQKE
2	53-60	DAALTIYE
3	109-136	DFTRGKLMSSHLKRYYGRIHLYLKAKE
4	149-165	ILRNFYFINRLTGYLRN
5	85-102	NLLANVYHQINHLKTVLE
6	1-42	SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEE
7	81-102	TIVENLLANVYHQINHLKTVLE

В результате масс-спектрометрического анализа мы также установили, что фракция, соответствующая пику 6, содержит пептид, включающий N-концевой фрагмент молекулы (наличие или отсутствие метионина) и замену аминокислоты в 16(17) позиции (Таблица 5). В целом фракции, соответствующие характеристическим пикам, обеспечили покрытие около 77% аминокислотной последовательности кандидата в ФСО.

Далее мы провели сравнительный анализ пептидных карт кандидата в ФСО рчИФН бета-1b и рчИФН бета-1a CRS (Рисунок 13, Рисунок 14).

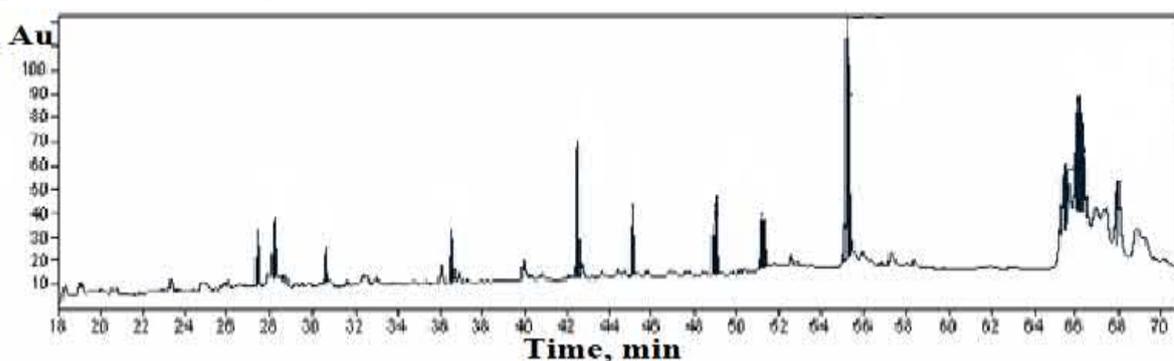


Рисунок 14 – Пептидная карта рчИФН бета-1a CRS

При сравнении пептидных карт кандидата в ФСО рчИФН бета-1b и рчИФН бета-1a CRS, представленных на рисунке 13 и рисунке 14, наблюдается различие времени удерживания шестого пика в диапазоне 50-54 мин, обусловленное наличием или отсутствием N-концевого метионина и заменой аминокислоты в 16(17) позиции. Также наблюдается отличие профилей пептидных карт в диапазоне 54,5 – 58 мин. При этом на хроматограмме рчИФН бета-1a CRS наблюдается значительное количество негидролизованного белка (кластерные пики в диапазоне 64 – 69 мин).

Следовательно, представленные результаты подтверждают специфичность разработанной методики пептидного картирования рчИФН бета-1b.

На втором этапе провели серию экспериментов для оценки прецизионности разработанной методики. В эксперименте использовали кандидат в ФСО рчИФН бета-1b, с которым были проведены двадцать испытаний с применением четырех хроматографов. Прецизионность оценивали по абсолютному и относительному времени удерживания семи основных пиков. Абсолютное (RSD не более 2 %) и

относительное (RSD не более 2%) время удерживания каждого пика свидетельствует о стабильности получаемых результатов.

Таким образом, в результате оценки специфичности и прецизионности разработанной нами методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b, экспериментально была доказана пригодность данной методики для оценки подлинности первичной структуры соответствующих субстанций.

Экспериментальные данные, полученные при оценке прецизионности разработанной методики пептидного картирования, использовали для установления неопределенности значений аттестованной характеристики ФСО рЧИФН бета-1b. Аттестованная характеристика представляет собой диапазон абсолютного времени удерживания основного пика 3 и диапазон относительного времени удерживания других шести пиков (Таблица 6).

Таблица 6 – Аттестованная характеристика ФСО рЧИФН бета-1b (n=20)

Пик	Абсолютное время удерживания, мин	Относительное время удерживания (диапазон)
1	-	0,61-0,66
2	-	0,67-0,73
3	42,0- 43,2	1,00
4	-	1,04-1,06
5	-	1,14-1,15
6	-	1,22-1,24
7	-	1,29-1,30

Таким образом, был разработан и аттестован ФСО рЧИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования (ФСО 3.2.00447). Для ФСО рЧИФН бета-1b была составлена сопроводительная документация (инструкция по применению, паспорт, макеты этикеток). Экспериментально был обоснован срок годности разработанного ФСО (2 года) на основании исследования его стабильности в режиме реального времени. Экспериментально была показана возможность применения разработанного ФСО для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций рЧИФН бета-1b разных производителей.

ВЫВОДЫ

1. Обоснована актуальность разработки фармакопейных стандартных образцов метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры молекулы вновь выпускаемых серий субстанций на основании анализа международных и отечественных нормативных требований.
2. Разработаны требования к кандидатам в фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b, обоснован их выбор, выбрана форма выпуска, проведена оценка качества и подтверждена первичная структура молекул методом масс-спектрометрии. В качестве кандидатов в фармакопейные стандартные образцы выбраны метиониновая субстанция рЧИФН альфа-2b, номенклатура показателей и все методики оценки качества которой

соответствуют требованиям Европейской Фармакопеи и представлены в полном объеме, и рчИФН бета-1b, представляющий собой продукт финальной стадии очистки до добавления стабилизатора белковой природы (человеческого сывороточного альбумина).

3. Разработана методика пептидного картирования рчИФН бета-1b, позволяющая оценить подлинность первичной структуры молекулы с применением фермента эндопротеиназы Glu-C и ацетатного буферного раствора для стадии гидролиза.

4. Установлена аттестованная характеристика разработанных фармакопейных стандартных образцов метиониновой формы рчИФН альфа-2b (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) и рчИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)) в виде абсолютного времени удерживания основного характеристического пика и относительных времен удерживания остальных характеристических пиков, полученных на основании статистического анализа пептидных карт. В результате сравнительного анализа пептидных карт разработанных фармакопейных стандартных образцов, фармацевтических субстанций рчИФН альфа-2b и рчИФН бета-1b разных производителей экспериментальным путем доказана возможность применения разработанных фармакопейных стандартных образцов для оценки качества вновь выпускаемых серий субстанций разных производителей.

5. На основании анализа профилей пептидных карт и смещения времени удерживания характеристических пиков при исследовании стабильности в режиме реального времени экспериментально обоснован срок годности Стандартного образца метиониновой формы рчИФН альфа-2b (ФСО 3.2.00433) – 2 года, Стандартного образца рчИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447) – 2 года.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На фармацевтических предприятиях, выпускающих метиониновую форму рчИФН альфа-2b, необходимо внедрить разработанный фармакопейный стандартный образец (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) для оценки подлинности первичной структуры молекулы вновь выпускаемых серий субстанций методом пептидного картирования.

2. На фармацевтических предприятиях, выпускающих рчИФН бета-1b, необходимо внедрить разработанный фармакопейный стандартный образец (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)) для оценки подлинности первичной структуры молекулы вновь выпускаемых серий субстанций методом пептидного картирования.

3. На фармацевтических предприятиях для оценки подлинности первичной структуры молекулы рчИФН бета-1b на этапе готовой субстанции или полупродукта до добавления вспомогательных веществ белковой природы рекомендуется использовать разработанную методику пептидного картирования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Перспективным направлением дальнейших исследований является изучение возможности аттестации и применения разработанного Стандартного образца метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) для оценки подлинности и чистоты соответствующих субстанций методом электрофореза в полиакриламидном геле, подлинности методом изоэлектрического фокусирования и для оценки чистоты методом ВЭЖХ в рамках стратегии импортозамещения.
2. Необходимо продолжить работу по изучению возможности аттестации и применения разработанного Стандартного образца рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)) для количественного определения рЧИФН бета-1b в субстанциях методом ВЭЖХ, количественного определения специфических примесей методом ВЭЖХ и методом электрофореза в полиакриламидном геле с целью стандартизации требований к данным показателям.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Голощапова, Е.О.** Стандартные образцы при оценке физико-химических показателей качества рекомбинантных интерферонов / **Е.О. Голощапова** // Материалы III научно-практической конференции молодых ученых «Приоритетные направления развития экспертной деятельности в области обращения лекарственных средств». – М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. – 2014. – С. 72-74.
2. **Голощапова, Е.О.** Теоретическое обоснование выбора субстанции интерферона альфа-2b для аттестации в качестве стандартного образца для оценки подлинности методом пептидного картирования / **Е.О. Голощапова, О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, Л.В. Корсун** // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2016. - Т.16, № 3.- С. 161-165.
3. **Голощапова, Е.О.** Обзор методических подходов к оценке качества лекарственных средств на основе рекомбинантных интерферонов / **Е.О. Голощапова, О.Б. Устинникова, Л.А. Гайдерова, М.Л. Байкова, Т.Н. Лобанова, И.М. Щербаченко, В.П. Бондарев** // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2017. - Т.17, № 3.- С. 152-157.
4. **Голощапова, Е.О.** Разработка порядка аттестации стандартного образца метиониновой формы интерферона альфа-2b для подтверждения подлинности методом пептидного картирования / **Е.О. Голощапова, О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, М.Г. Коротков, Р.А. Волкова** // Медицинская иммунология. – 2018. – Т.20, № 4. – С.543-550.
5. **Голощапова, Е.О.** Рекомбинантные интерфероны бета-1a и бета-1b: особенности структуры белка и проблемные вопросы подтверждения ее

подлинности / **Е.О. Голощапова, О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова** // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2018. – Т.52, № 8. – С.61-64.

6. **Голощапова, Е.О.** Подлинность структуры молекулы рекомбинантного интерферона бета-1b: разработка методики подтверждения / **Е.О. Голощапова, А.С. Минеро, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова** // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Москва, 2020. – С.207-208.

7. **Голощапова, Е.О.** Разработка методики пептидного картирования для оценки подлинности субстанций рекомбинантного интерферона бета-1b / **Е.О. Голощапова, А.С. Минеро, О.Б. Рунова, О.Б. Устинникова** // **Биофармацевтический журнал.** - 2021. - Т.13, № 4. – С. 22-27.

8. **Голощапова, Е.О.** Разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры очищенного рекомбинантного интерферона бета-1b методом пептидного картирования / **Е.О. Голощапова, О.Б. Рунова, А.С. Минеро, О.В.Фадеекина, Р.А. Волкова, М.Б. Дегтерев, С.А. Таран, Р.Р. Шукуров, О.Б.Устинникова** // **Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.** – 2022. – Т.22, №1. – С. 23-37.

9. **Голощапова, Е.О.** Разработка требований к качеству и процедуре аттестации стандартного образца оценки подлинности структуры молекулы рекомбинантного интерферона бета-1b / **Е.О. Голощапова** // Сборник тезисов XXIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 4-7 апреля 2022 г., г. Москва. – Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – С. 87.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ	–	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ РФ	–	Государственная Фармакопея Российской Федерации
ИФН	–	интерферон
ОСО	–	отраслевой стандартный образец
ОФС	–	общая фармакопейная статья
рчИФН	–	интерферон человеческий рекомбинантный
СО	–	стандартный образец
ФС	–	фармакопейная статья
ФСО	–	фармакопейный стандартный образец
ЧСА	–	человеческий сывороточный альбумин
CRS	–	Chemical reference standard – химический стандартный образец
EDQM	–	Европейский директорат по качеству лекарственных средств и здравоохранения
S	–	стандартное отклонение