

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Голощапова Евгения Олеговна

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

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Устинникова Ольга Борисовна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования.....	7
Цель исследования	9
Задачи исследования	9
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Методология и методы исследования	12
Материалы исследования.....	13
Методы исследования.....	15
Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	15
Масс-спектрометрия высокого разрешения.....	16
Статистические методы исследования.....	18
Личный вклад автора в получении результатов	19
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	19
Степень достоверности и апробация результатов	20
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	22
1.1. Интерфероны – цитокины с широким спектром действия.....	22
1.1.1. Рекомбинантный интерферон альфа	24
1.1.2. Рекомбинантный интерферон бета	27
1.1.3. Рекомбинантный интерферон гамма	32
1.2. Аналитический обзор номенклатуры лекарственных средств на основе интерферонов, зарегистрированных в Российской Федерации, Европейском Союзе и США	34
1.3. Проблемные вопросы оценки подлинности структуры рекомбинантных интерферонов альфа и бета, входящих в состав фармацевтических субстанций..	38
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	47

ГЛАВА 2. Разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования	47
2.1. Разработка требований к кандидату в фармакопейный стандартный образец метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b, выбор кандидата в стандартный образец и его формы выпуска, оценка его качества	47
2.2. Установление аттестованной характеристики фармакопейного стандартного образца метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b, разработка сопроводительной документации.....	54
2.3. Оценка стабильности фармакопейного стандартного образца метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b и установление его срока годности	63
2.4. Резюме	66
ГЛАВА 3. Разработка фармакопейного стандартного образца рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования	68
3.1. Разработка требований к кандидату в фармакопейный стандартный образец рекомбинантного интерферона бета-1b, выбор кандидата в стандартный образец и его формы выпуска, оценка его качества	68
3.2. Разработка и валидация методики пептидного картирования рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры	72
3.3. Установление аттестованной характеристики фармакопейного стандартного образца рекомбинантного интерферона бета-1b, разработка сопроводительной документации.....	91
3.4. Оценка стабильности фармакопейного стандартного образца рекомбинантного интерферона бета-1b и установление его срока годности	92
3.5. Резюме	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96

ВЫВОДЫ	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	109
ПРИЛОЖЕНИЕ	125
БЛАГОДАРНОСТИ	127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Обеспечение фармацевтического рынка необходимым количеством лекарственных средств, в том числе на основе интерферонов (ИФН), получаемых ранее из труднодоступных природных источников, в настоящее время возможно благодаря использованию технологии рекомбинантной ДНК. Возможность манипуляций с нуклеиновыми кислотами позволяет конструировать кодирующие гены для создания модифицированных продуктов, отличающихся своими свойствами от их природных аналогов, или даже абсолютно новых продуктов [65].

Действующие вещества лекарственных средств, получаемых с помощью технологии рекомбинантной ДНК, представляют собой белки: ферменты, цитокины, моноклональные антитела, вакцины (например, вакцина против гепатита В), факторы плазмы крови человека и т.д. [8].

Хорошо изученными и широко применяемыми в медицинской практике рекомбинантными цитокинами являются интерфероны [15]. В настоящее время на фармацевтическом рынке представлены лекарственные препараты на основе рекомбинантных человеческих интерферонов (рчИФН) альфа -2а, альфа-2b, бета-1а, бета-1b и гамма-1b [12]. Препараты рчИФН альфа-2b применяют для лечения ряда инфекционных вирусных и некоторых онкологических заболеваний [15]. Препараты рчИФН бета-1b и бета-1а используются как препараты первой линии терапии для лечения рассеянного склероза [67]. Препараты рчИФН гамма-1b применяют при лечении вирусных и бактериальных инфекций, а также некоторых онкологических заболеваний [1, 15].

В Российской Федерации зарегистрированы две метиониновые и пять безметиониновых форм субстанций рчИФН альфа-2b, а также две субстанции рчИФН бета-1b и одна субстанция рчИФН гамма-1b отечественного производства [12].

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 «Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (утверждены 03.11.2016), а также в соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи, Фармакопеи США и Великобритании, необходима оценка подлинности очищенного белка: биологическая активность и структура белка должны быть подтверждены пригодными методами в сравнении со стандартным образцом (СО).

РчИФН альфа-2b может быть представлен двумя формами, отличающимися первичной структурой молекулы – метиониновой формой (на N-конце молекулы представлен метионин) и безметиониновой формой, где в результате отщепления формилметионина N-концевым аминокислотным остатком становится цистеин [26, 28].

Структурные отличия молекулы рчИФН бета-1b от молекулы рчИФН бета-1a заключаются в отсутствии гликозилирования и замене цистеинового аминокислотного остатка на остаток серина в позиции 17 [29, 71].

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, представляющего собой безметиониновую форму рчИФН альфа-2b, в качестве стандартного образца сравнения при пептидном картировании для метиониновой формы рчИФН альфа-2b некорректно. Для пептидного картирования при подтверждении подлинности структуры метиониновых субстанций рчИФН альфа-2b производители используют стандартные образцы предприятий (СОП). Однако единые требования к оценке качества стандартного образца предприятия, его аттестации и применению отсутствуют, что не позволяет стандартизовать требования к показателю «Подлинность» однотипных субстанций разных производителей.

Отечественными производителями рЧИФН бета-1b подтверждение подлинности методом пептидного картирования не проводится, что на сегодняшний день не соответствует актуальным фармакопейным требованиям. Кроме того, рассмотрение стандартного образца рЧИФН бета-1a CRS (Стандартный образец EDQM), кат. № Y0001101, в качестве стандартного образца сравнения при разработке методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b в силу структурных различий данных белков также некорректно.

Применение отечественным производителем при подтверждении подлинности структуры фармацевтической субстанции рЧИФН гамма-1b методом пептидного картирования стандартного образца CRS (Стандартный образец EDQM), кат. № I0320330, представляющего собой субстанцию рекомбинантного интерферона гамма-1b, является корректным.

Таким образом, разработка фармакопейных стандартных образцов (ФСО) рЧИФН альфа-2b (метиониновая форма) и рЧИФН бета-1b являются актуальным направлением исследования, способствующим унификации и стандартизации методик оценки подлинности структуры соответствующих фармацевтических субстанций, используемых для производства лекарственных препаратов, что имеет практическое значение для отечественного здравоохранения.

Степень разработанности темы исследования

Открытие интерферонов в середине XX века – одно из важнейших открытий в биологии [18]. Интерфероны обладают иммуномодулирующим и противовирусным действием, а также проявляют противоопухолевую активность [15].

В 1957–1967 гг. было установлено, что интерферон секретируется клетками организма в результате вирусной инфекции или после введения препаратов, названных позднее индукторами интерферона [18, 33].

В 1967–1977 гг. расшифрованы молекулярно-биологические механизмы действия интерферонов, картированы его гены, выделены их и-РНК и разработаны методы очистки и получения природного интерферона. Из

лейкоцитов донорской крови выделен лейкоцитарный интерферон, на основе которого разработаны препараты первого поколения и начато их применение в медицинской практике [14]. Однако применение интерферона первого поколения ограничено в связи с их нестандартным составом, возможной контаминацией вирусами, наличием биологически активных веществ в качестве примесей. Технология получения препаратов из донорской крови не могла обеспечить растущие потребности в препаратах интерферона, так как для получения 1 г интерферона необходимо использовать 100 000 л крови доноров. В связи с этим в 1977–1987 гг. разработаны основы биотехнологического производства препаратов рчИФН, которые нашли широкое применение при лечении ряда вирусных и онкологических заболеваний [15].

Однако 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, электрофореза в полиакриламидном геле и методом пептидного картирования. В качестве стандартного образца сравнения Монографией Европейской Фармакопеи предусмотрено использование образца CRS, кат. № I0320301, который представляет собой безметиониновую форму субстанции рчИФН альфа-2b. Кроме того, подлинность оценивают, подтверждая специфическую противовирусную активность в сравнении с международным стандартным образцом (МСО) 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: метод масс-спектрометрии для анализа гликанов (распределение изоформ), метод пептидного картирования. Поскольку в

молекуле рЧИФН бета-1b отсутствуют гликаны, методом подтверждения его структуры остается пептидное картирование. Для подтверждения подлинности структуры молекулы рЧИФН бета-1b 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, рН 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 pH 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 стабилизаторы 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. Используются методы статистического анализа.

Материалы исследования

Исследуемые образцы и стандартные образцы

1. Образец 1 (Кандидат в ФСО: метиониновая форма рЧИФН альфа-2b, субстанция). Производитель ООО «Фармапарк», Россия.
2. Образец 2 (Безметиониновая форма рЧИФН альфа-2b, субстанция). Производитель ООО «Фармапарк», Россия.
3. Образец 3 (Безметиониновая форма рЧИФН альфа-2b, субстанция). Производитель ЗАО «Вектор-Медика», Россия.
4. Образец 4 (Метиониновая форма рЧИФН альфа-2b, субстанция). Производитель ООО «Фармапарк», Россия.
5. Образец 5 (Метиониновая форма рЧИФН альфа-2b, субстанция). Производитель ООО НПП «Фармаклон», Россия.
6. Образец 6 (РЧИФН бета-1b, субстанция, не содержащая стабилизаторы белковой природы). Производитель ЗАО «Биокад», Россия.
7. Образец 7 (Раствор рЧИФН бета-1b, отобранный на промежуточной стадии производства субстанции до добавления стабилизаторов белковой природы). Производитель АО «Генериум», Россия.
8. Образец 8 (Лиофилизат раствора рЧИФН бета-1b, отобранного на промежуточной стадии производства субстанции до добавления стабилизаторов белковой природы). Производитель АО «Генериум», Россия.

9. СОП (метиониновая форма рЧИФН альфа-2b). Производитель ООО «Фармапарк», Россия.
10. РЧИФН альфа-2b CRS (EDQM, кат. № I0320301).
11. РЧИФН бета-1a CRS (EDQM, кат. № Y0001101)

Ферменты и реактивы

1. Трипсин 1 (активность фермента 8868 ЕД/мг). Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № T8658 (серия SLBB2403V).
2. Трипсин 2 (активность фермента 9146 ЕД/мг). Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № T8658 (серия SLBL8393V).
3. Трипсин 3 (активность фермента 3203 ЕД/мг). Производитель ПанЭко, Россия, кат. № П052 (серия 3094C216).
4. Трипсин 4 (активность фермента 13165 ЕД/мг). Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № 1426 (серия SLBF1700V).
5. Эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8 (активность фермента 500-1000 Ед/мг). Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № P2922.
6. Ферменты для мультиферментного протеолиза при определении аминокислотной последовательности кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и ФСО рЧИФН бета-1b (протеаза Asp-N (Promega, США, кат. № VA1160), пепсин (Promega, США, кат. № V1959), протеаза Glu-C (Promega, США, кат. № V1651), протеаза Lys-C (Promega, США, кат. № VA1170), иммобилизованный трипсин (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № 60109-101-B)).
7. Пепсин. Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № P7000.
8. Гуанидина гидрохлорид. Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № 3272.
9. Дитиотреитол. Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № D0632.
10. Уксусная кислота. Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № A6283.
11. Натрия ацетат. Производитель PanReac AppliChem, Испания, кат. № 131633.1211.

12. Трифторуксусная кислота. Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № Т6508.
13. Ацетонитрил. Производитель Fisher Chemical, США, кат. № А/0627/17.
14. Калия дигидрофосфат. Производитель Fluka, США, кат. № 60221.
15. Натрия гидроксид. Производитель Sigma-Aldrich, США, кат. № 30620

Методы исследования

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Пептидное картирование рчИФН альфа-2b

Для установления аттестованной характеристики кандидата в ФСО метиониновой формы рчИФН альфа-2b использовали методику пептидного картирования, представленную в монографии 07/2015:1110 Европейской Фармакопеи [73]. Для хроматографического разделения пептидов, полученных в результате гидролиза, использовали следующие модели хроматографов: Agilent Technologies Infinity 1260, США; Waters Alliance e2695, США; Shimadzu Nexera X2, США; Waters Acquity, США. В работе использовали термостат СН-100 (BIOSAN, Латвия), рН-метр Seven Compact S220 (Mettler Toledo, Швейцария), хроматографическую колонку размером 100 x 4,6 мм, заполненную октадецилсилил (С18) силикагелем с диаметром частиц 5 мкм; размер пор 300 Å, УМС, США, кат. № АА30S051046.

Относительное время удерживания характеристического пика на пептидной карте ($T_{\text{отн}}$) рассчитывали по формуле (1) [10]:

$$T_{\text{отн}} = T_1 / T_2 \quad (1)$$

где

T_1 – время удерживания характеристического пика на пептидной карте, для которого рассчитывают относительное время удерживания;

T_2 – время удерживания характеристического пика на пептидной карте, относительного которого рассчитывают относительное время удерживания для других характеристических пиков.

Окисленные примеси рчИФН альфа-2b

Количественное определение окисленных примесей рчИФН альфа-2b осуществляли с применением методики, представленной в монографии 07/2015:1110 Европейской Фармакопеи [73]. Для проведения анализа использовали хроматографическую колонку размером 250 x 4,6 мм, заполненную октадецилсилил (C18) силикагелем, диаметр частиц 5 мкм, размер пор 300 Å, YMC, США, кат. № AA 30S05-2546WT.

Масс-спектрометрия высокого разрешения

Изучение первичной структуры молекулы рчИФН альфа-2b и анализ аминокислотной последовательности пептидов, получаемых в результате пептидного картирования рчИФН альфа-2b

Анализ первичной структуры молекулы кандидата в ФСО метиониновой формы рчИФН альфа-2b и аминокислотной последовательности пептидов, получаемых в результате пептидного картирования рчИФН альфа-2b, для установления аттестованной характеристики ФСО осуществляли с помощью тандемного масс-спектрометра высокого разрешения Thermo Finnigan (модель LTQ FT ULTRA, США) в два этапа. На первом этапе определили массу пептидов в интервале m/z 300-1600. На втором этапе в линейной ионной ловушке детектировали ионы, которые сформировались в результате столкновительно-индуцированной фрагментации. Результаты ВЭЖХ-МС анализировали с применением программы QualBrowser. С применением программы Raw2msm получили массы пептидов на основе масс-хроматограмм. Идентифицированные массы пептидов использовали для поиска соответствующих белков, представленных в базе данных, с помощью программы-поисковика Mascot. Программа-поисковик сравнивает молекулярную массу пептидов, полученных в результате гидролиза исследуемого белка, с молекулярной массой пептидов, которые образуются при теоретическом гидролизе пептидных связей белков, представленных в базе данных, конкретным ферментом.

Изучение первичной структуры молекулы рчИФН бета-1b

Анализ первичной структуры молекулы кандидата в ФСО рчИФН бета-1b с проведением мультиферментного протеолиза целевого белка и последующим хромато-масс-спектрометрическим анализом полученных гидролизатов осуществляли в системе ВЭЖХ Infinity 1260 Capillary LC System (Agilent Technologies, США) с масс-спектрометрическим детектором QTOF 6550 (Agilent Technologies, США). Разделение пептидов проходило в нанопотоковом режиме на устройстве ProtID-Chip-43 (Agilent Technologies, США). Фаза А – 0,1% муравьиная кислота в 50 мМ формиате аммония; фаза Б – смесь фазы А с ацетонитрилом в соотношении 1:9; элюирование пептидов проводили в режиме линейного градиента (1-48% фазы Б в течение 52 минут), регистрацию сигналов – в режиме положительной ионизации и дата-зависимого тандемного сканирования. Для анализа результатов использовали программное обеспечение Peaks AB v.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc.). При соотнесении регистрируемых масс пептидов с теоретическими значениями учитывались химические (аддукты с ионами натрия, формилирование, отщепление аммония или воды) и посттрансляционные (неотщепление N-концевого метионина, окисление остатков метионина, триптофана и гистидина, дезамидирование остатков аспарагина или глутамина) модификации.

Анализ аминокислотной последовательности пептидов, получаемых в результате пептидного картирования рчИФН бета-1b

Анализ аминокислотной последовательности пептидов, получаемых в результате пептидного картирования рчИФН бета-1b, при проведении валидации разработанной методики пептидного картирования рчИФН бета-1b, осуществляли с хромато-масс-спектрометрической идентификацией целевых пептидных фрагментов в каждой фракции элюата в системе ВЭЖХ Nexera X2 (Shimadzu, США) с масс-спектрометрическим детектором Q Exactive HF Biopharma (Thermo Scientific, США). Разделение пептидов проводили на колонке Acquity UPLC® Peptide CSH C18 размером 2.1x100 мм (Waters,

США). В качестве подвижной фазы А использовали 0,1% муравьиную кислоту в воде; в качестве подвижной фазы Б – 0,1% муравьиную кислоту в ацетонитриле. В работе использовали линейный градиент (3 – 40% фазы Б в течение 6,5 мин), регистрацию сигналов проводили в режиме положительной ионизации и дата-зависимого тандемного сканирования. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение Biopharma Finder v.3.2 (Thermo Scientific, США) и Peaks AB v.2.0 (США). При соотнесении регистрируемых масс пептидов с теоретическими значениями учитывались химические (аддукты с ионами натрия, формилирование, отщепление аммония или воды) и посттрансляционные (неотщепление N-концевого метионина, окисление остатков метионина, триптофана и гистидина, дезамидирование остатков аспарагина или глутамина) модификации.

Статистические методы исследования

Среднее арифметическое значение абсолютного (или относительного) времени удерживания пика на хроматограмме X_{cp} вычисляли по формуле (2) [5]:

$$X_{cp} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} (x_1 + \dots + x_n) \quad (2)$$

Стандартное отклонение (S) результатов вычисляли по формуле (3) [4]:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - X_{cp})^2} \quad (3)$$

Диапазон времени удерживания пика на пептидной карте (абсолютное и относительное время удерживания пика на пептидной карте рЧИФН альфа-2b; относительное время удерживания пика на пептидной карте рЧИФН бета-1b) ΔX вычисляли по формуле (4):

$$\Delta X = X_{cp} \pm 2S \quad (4)$$

Диапазон времени удерживания пика на пептидной карте (абсолютное время удерживания пика на пептидной карте рЧИФН бета-1b) ΔX вычисляли по формуле (5):

$$\Delta X = X_{cp} \pm 3S \quad (5)$$

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 стабилизаторы 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 (№ госрегистрации 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).

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Интерфероны – цитокины с широким спектром действия

Интерферонами называют группу цитокинов, обладающих антивирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. Эти полифункциональные биорегуляторные белки широкого спектра действия обладают радиопротективным, антимуtagenным и антитуморогенным свойствами, подавляют развитие инфекции вирусной и невирусной природы, влияют на активность макрофагов и фагоцитоз, а также на экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости и индукцию синтеза антител. Данные цитокины способны оказывать влияние на формирование простагландинов и гистамина, активность естественных киллерных клеток [15].

В настоящее время наиболее изучены три класса ИФН человека: альфа, бета и гамма. По названию основных клеток-продуцентов ИФН альфа называют лейкоцитарным, а ИФН бета фибробластным. ИФН гамма называют иммунным, что отражает его основные функции [89]. По кислотоустойчивости ИФН подразделяют на два типа: ИФН альфа и бета относят к I типу (кислотоустойчивые белки), ИФН гамма относят ко II типу, поскольку он не устойчив в кислой среде [109-111]. К ИФН I-го типа относят также малоизученные ИФН дельта, ИФН омега и ИФН тау [15].

Результаты исследований по изучению структурных особенностей ИФН I типа свидетельствуют о том, что около 70% аминокислотной последовательности ИФН омега сходны с аминокислотной последовательностью ИФН альфа, в то же время ИФН альфа представляют собой группу белков (подтипов ИФН альфа), которые кодируются более, чем двадцатью генами [38, 74, 79]. Ген ИФН омега в хромосомах человека представлен единичной копией и соответственно отвечает за синтез одного протеина в периферической крови и тканях. ИФН бета также кодируется одним геном [15]. ИФН бета и ИФН омега представляют собой гликопротеины, в то время как из всех подтипов эндогенного ИФН альфа в

организме человека только два подтипа гликозилированы: ИФН альфа-2b по остатку треонина в позиции 106 (О-гликозилирование), и ИФН альфа-14c по остатку аспарагина в положении 72 (N-гликозилирование) [88, 102, 103]. Также было показано, что ИФН I типа имеют общий клеточный рецептор, что означает структурное подобие их рецептор-связывающих областей, но поскольку данные белки обладают разным биологическим действием, можно предположить, что сайты связывания молекул данных белков обладают определенной специфичностью [88].

Биологическая активность ИФН проявляется в регуляции активности клеток иммунной системы (включая макрофаги, В-клетки и Т-клетки), что, в свою очередь, оказывает влияние на развитие иммунного ответа [14].

В 1989 году Boyer С.М. с соавторами обнаружили, что ИФН обладают способностью усиливать экспрессию опухолевых антигенов, а Joffre О.Р. с соавторами установили, что ИФН способствуют активации дендритных клеток в процессе представления опухолевого антигена Т-клеткам, что является важным этапом развития противоопухолевого ответа [49, 83]. Противовирусная активность ИФН основана на индукции и регуляции механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Связываясь с трансмембранными рецепторами, ИФН взаимодействуют с клетками, активируя различные регуляторные механизмы, в том числе пути апоптоза клеток. В результате снижается интенсивность связывания вируса и проникновение вирусных частиц в клетки, высвобождение нуклеокапсида вируса из оболочки подавляется. Нарушаются процессы транскрипции и трансляции структурных белков, что предотвращает образование новых вирионов и вызывает деградацию вирусной мРНК [8].

Таким образом, совокупность результатов многочисленных исследований в области изучения молекулярно-биологических основ продукции ИФН и механизмов их действия, разработка методов их очистки и концентрации позволила рассматривать ИФН в качестве перспективных белков для создания лекарственных средств и практического применения в лечебных и

профилактических целях. Действующим веществом препаратов на основе природного ИФН был лейкоцитарный ИФН альфа, выделенный из лейкоцитов донорской крови после воздействия на них вирусами [15].

Однако донорская кровь является дефицитным и дорогим сырьем. Для получения 1 г ИФН необходимо более 100000 л крови, полученной более чем от 4 млн доноров. Кроме того, недостатками природных ИФН является возможная контаминация вирусами, нестандартный состав, а также наличие других белков и биологически активных веществ в качестве примесей. В связи с этим в 70–80-х годах прошлого века были разработаны с применением технологии рекомбинантной ДНК первые биотехнологические лекарственные препараты ИФН альфа [15].

1.1.1. Рекомбинантный интерферон альфа

В состав лекарственных средств на основе рчИФН альфа входит рекомбинантный белок двух подтипов: рчИФН альфа-2а и рчИФН альфа-2b. Поскольку данный белок не имеет значимых для его активности гликановых модификаций, в обоих случаях в качестве продуцента используют модифицированные клетки *Escherichia coli*. Молекула данных подтипов рчИФН альфа состоит из 165 аминокислот. Отличие подтипов заключается в замене 23-го аминокислотного остатка: аргинин в молекуле рчИФН альфа-2b и лизин в молекуле рчИФН альфа-2а (Рисунок 1).

MCDLPQTHSLG	SRRTLMLLAQ	MRR[K]ISLFSCL
KDRHDFGFPQ	EEFGNQFQKA	ETIPVLHEMI
QQIFNLFSTK	DSSAAWDETL	LDKFYTELYQ
QLNDLEACVI	QGVGVTTETPL	MKEDSILAVR
KYFQRITLYL	KEKKYSPCAW	EVVRAEIMRS
FSLSTNLQES	LRSKE	

Рисунок 1 – Аминокислотная последовательность рчИФН альфа-2b (рчИФН альфа-2а)

Молекулярная масса белков около 19 кДа. Молекулы представляют собой одноцепочечные негликозилированные белки с двумя дисульфидными связями между остатками цистеина в положении 1-99 и 29-139, при этом

последняя (29-139) является значимой для проявления биологической активности белка [15, 73, 141].

В 1987 году Davis J.M. с соавторами изучали с помощью кругового дихроизма и флуоресцентной спектроскопии структурные особенности рЧИФН альфа-2b, полученного в *E. coli*. Спектры кругового дихроизма очищенного белка показали, что он имеет около 70% альфа-спирали и отчетливую третичную структуру. Эти структурные особенности сходны с таковыми для природного подтипа ИФН альфа-2 [58].

Установлено, что рЧИФН альфа-2b в кристаллическом состоянии представляет собой нековалентный димер, где каждый мономер состоит из 5 альфа спиралей А-Е и промежуточных петель. При этом для структурной целостности молекулы важны такие аминокислотные остатки, как F36, Y122, и Y129, а для связывания с рецептором большое значение имеют петля АВ и спирали В-D [118]. Позднее было обнаружено, что остатки лизина, близко расположенные к N-концу молекулы, и остатки тирозина, близко расположенные к С-концу молекулы, способствуют проявлению активности рЧИФН альфа-2b [122].

Применение препаратов рекомбинантного интерферона альфа в клинической практике

РЧИФН альфа-2a и рЧИФН альфа-2b занимают лидирующее положение среди рекомбинантных белков по степени изученности.

Лекарственные препараты на основе рЧИФН альфа применяются в лечении широкого круга заболеваний.

Первые исследования терапевтической эффективности препаратов на основе рЧИФН альфа проведены при лечении вирусных гепатитов. Показана способность рЧИФН альфа к подавлению репликации вирусов гепатитов В, С и Е. Изучена эффективность указанных препаратов при лечении конъюнктивальной папилломы, весеннего кератоконъюнктивита, инфекционного энтеровирусного заболевания у детей, а также меланомы конъюнктивы [18, 33, 41, 47, 53, 92, 95, 100, 121, 130, 132, 146, 147].

Показана способность рЧИФН альфа-2b индуцировать формирование противоопухолевого иммунитета, способствуя устранению нарушений в работе иммунной системы, наблюдаемых при Т-клеточной лимфоме кожи, раке мочевого пузыря и меланоме [39, 75, 116, 127].

В настоящее время установлено, что лечение коронавирусной инфекции COVID-19 препаратами рЧИФН альфа-2b в сочетании с арбидолом или без него значительно уменьшает длительность выявления вируса в верхних дыхательных путях и сокращает продолжительность госпитализации больных [107, 108, 139, 150]. Для профилактики коронавирусной инфекции Министерством Здравоохранения Российской Федерации рекомендовано использование препаратов на основе рЧИФН альфа-2b для интраназального применения [3].

При лечении отдельных заболеваний предусмотрено длительное применение указанных препаратов. Положительным моментом при длительном лечении рЧИФН альфа-2b является низкая частота появления в сыворотке крови нейтрализующих антиинтерфероновых антител, объяснением которой, по мнению некоторых авторов, является молекулярная структура данного белка [128].

Однако при применении препаратов на основе рЧИФН альфа выявлен ряд некоторых побочных эффектов, таких как хроническая усталость, боль в мышцах и суставах, лихорадка, головная боль, изменения в морфологии крови (анемия, нейтропения, тромбоцитопения), бессонница, депрессия, аллергия, кашель и сухость кожи. Отмечается, что многие побочные эффекты могут быть устранены путем коррекции дозы в ходе длительной терапии [68, 91, 126].

Также к недостаткам применения препаратов на основе рЧИФН альфа-2b можно отнести невысокую стабильность и короткий период полувыведения [142]. В течение нескольких часов после введения наблюдается быстрое снижение концентрации рЧИФН альфа-2b в крови, а через 24 ч после инъекции рЧИФН альфа-2b в плазме не определяется [54, 142].

В связи с этим важным достижением является разработка новой лекарственной формы – пегилированного рчИФН, введение которого в организм человека возможно один раз в неделю взамен ежедневного [98]. Было показано, что пегилирование увеличивает период полувыведения рчИФН из плазмы, уменьшает скорость клиренса и минимизирует антигенность белка. Фармакокинетика пегилированного рчИФН и его биологическая активность в значительной степени зависят от молекулярной массы полиэтиленгликоля (ПЭГ). Несмотря на то, что процесс присоединения ПЭГ не меняет структуру белка рчИФН альфа, у пегилированного рчИФН альфа специфическая активность меньше, чем у немодифицированного белка. Чем крупнее молекула ПЭГ, тем меньше активность пегилированного рчИФН и дольше период его полувыведения из плазмы. Недостатком процесса пегилирования является возможность образования гетерогенной смеси изомеров, имеющих разную активность и молекулярную массу [60, 76, 77, 93, 149].

Таким образом, лекарственные средства на основе рчИФН альфа-2b применяются в медицинской практике при лечении широкого круга заболеваний, при этом для терапии некоторых из них предусмотрено длительное применение указанных препаратов. Повышению эффективности препаратов и снижению риска развития побочных эффектов при их применении способствует обеспечение качества лекарственных средств.

1.1.2. Рекомбинантный интерферон бета

В медицинской практике применяют препараты двух подтипов рчИФН бета – рчИФН бета -1a и рчИФН бета-1b [42]. Данные белки имеют существенные структурные различия, обусловленные технологией их производства.

Структура молекулы интерферона бета

РчИФН бета-1a представляет собой гликозилированный белок с молекулярной массой около 22,5 кДа. Молекула углевода связана с аспарагином в позиции 80 (N-гликозилирование). Молекула состоит из 166

аминокислот. Первичная структура данного подтипа рчИФН бета идентична ИФН бета человека. Молекулы имеют сходный тип гликозилирования (Рисунок 2). Для производства рчИФН бета-1а в качестве клеток-продуцентов используют модифицированные клетки яичников китайского хомячка (*CHO - Chinese hamster ovary*).

MSYNLLGFLQ	RSSNFQCQKL	LWQLNGRLEY
CLKDRMNFDI	PEEIKQLQQF	QKEDAALTIY
EMLQNIFAIF	RQDSSSTGWN*	ETIVENLLAN
VYHQINHLKT	VLEEKLEKED	FTRGKLMSSL
HLKRYYGRIL	HYLKAKEYSH	CAWTIVRVEI
LRNFYFINRL	TGYLRN	

Рисунок 2 – Аминокислотная последовательность рчИФН бета-1а

Примечание: * - сайт гликозилирования

В результате исследований, проведенных в 1989 году, установлено, что вторичная структура ИФН бета-1а образована пятью альфа спиралями (А-Е) и связывающими петлями. Спираль А параллельна спирали В и антипараллельна спиралям С и Е. Спираль D представляет собой часть петли, связывающей спирали С и Е. Другая петля связывает параллельные спирали А и В и может быть структурно разделена на три участка: АВ1, АВ2 и АВ3. Позднее показано, что С31 петли АВ и С141 петли DE соединены дисульфидной связью. Предполагают, что данные петли играют важную роль при взаимодействии ИФН с рецептором [86, 115].

Известно, что ИФН бета, аналогично ИФН альфа, представляет собой димер. Ассиметричная единица образована двумя молекулами А и В. Димер ИФН бета, как и димер ИФН альфа, содержит атом цинка, который связывает Н121 молекулы А с Н93 и Н97 молекулы В. Молекула воды дополняет геометрию связанного цинком тетраэдра. Существуют полярные и гидрофобные взаимодействия между спиралями А и С молекулы В, а также спиралью D и петлей АВ3 молекулы А. Спираль D молекулы А частично развернута, поэтому короче на 6 аминокислотных остатков такой же спирали молекулы В, как предполагают, для предотвращения стехиометрических нарушений [86, 115].

Доказано, что рЧИФН бета-1а, в целом, представляет собой комплекс фукозилированных гликопротеинов, различающиеся разветвленностью и степенью сиалирования углеводной части молекулы [104]. Учитывая наличие большого количества гидрофобных остатков, близких к сайту гликозилирования, было высказано предположение, что углеводная цепь защищает гидрофобные остатки, что препятствует агрегации и увеличению растворимости. Отмечено влияние терминальной сиаловой кислоты на фармакокинетику и биологическую активность [56, 85].

Conradt H. S. с соавторами обнаружили, что углеводная часть молекулы важна для поддержания растворимости белка, о чем свидетельствует тот факт, что рЧИФН бета-1а осаждается после дегликозилирования гликопептидазой F [56].

При производстве рЧИФН бета-1b используют модифицированные клетки *E. coli*. В связи с этим рЧИФН бета-1b является негликозилированным белком, молекула которого состоит из 165 аминокислот (отсутствует метионин на N-конце молекулы в отличие от рЧИФН бета-1а). Также отличием данного белка от рЧИФН бета-1а является замена цистеина в положении 16 на серин. Молекулярная масса около 18,5 кДа [29]

Аминокислотная последовательность рЧИФН бета-1b представлена на рисунке 3.

SYNLLGFLQR	SSNFQSQKLL	WQLNGRLEYC
LKDRMNFDIP	EEIKQLQQFQ	KEDAALTIYE
MLQNIFAIFR	QDSSSTGWNE	TIVENLLANV
YHQINHLKTV	LEEKLEKEDF	TRGKLMSSLH
LKRYYYGRILH	YLKAKEYSHC	AWTIVRVEIL
RNFYFINRLT	GYLRN	

Рисунок 3 – Аминокислотная последовательность рЧИФН бета-1b

Технология производства рЧИФН бета-1b значительно упрощена по сравнению с технологией производства рЧИФН бета-1а, при этом рЧИФН бета-1b проявляет биологическую активность ИФН бета человека несмотря на

замену одной аминокислоты и отсутствие углеводного фрагмента в молекуле [27].

*Применение препаратов рекомбинантного интерферона
бета в клинической практике*

Как отмечено выше, начало разработки препаратов на основе рчИФН бета обусловлено наличием у него противоопухолевой активности [42]. Позднее изучена эффективность терапии рчИФН бета при лечении стероидоустойчивого язвенного колита, гломерулонефрита, хронического панкреатита [124, 129]. Доказана эффективность ИФН бета при лечении таких вирусных инфекций, как гепатит С, везикулярный стоматит [106, 133]. Последние исследования показали, что применение препаратов рчИФН бета снижает необходимость искусственной вентиляции легких, сокращает продолжительность лечения и снижает уровень смертности у пациентов с тяжелой формой COVID-19 [59, 114, 119].

Однако основной терапевтический эффект лекарственных средств на основе рчИФН бета наблюдается при лечении рассеянного склероза, который представляет собой хроническую форму аутоиммунного заболевания с повреждением миелиновой оболочки нервных волокон спинного и головного мозга. Количество людей в мире, у которых диагностирован рассеянный склероз, постоянно увеличивается и на сегодняшний день составляет около 3 млн человек. [16, 34, 41, 101, 143]. В России число больных рассеянным склерозом составляет около 150 тыс. человек, из которых 80% – это женщины в возрасте 20-35 лет и мужчины 35-45 лет [24]. Средний возраст возникновения заболевания составляет 30 лет, при этом соотношение женщин и мужчин 3:1 [13, 17].

Согласно современной концепции патогенеза рассеянного склероза развитие заболевания начинается с формирования аутоиммунного воспаления. При этом наблюдается воспаление в тканях мозга, активация лимфоцитов, проникновение Т-клеток через гематоэнцефалический барьер. [36].

При изучении механизма действия ИФН бета показано, что его иммуномодулирующий эффект связан со снижением уровня активации лимфоцитов и экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II типа, регуляцией продукции противовоспалительных цитокинов, активацией клеток-супрессоров, индукцией дифференциации нервных стволовых клеток в олигодендроциты, подавлением изменений проницаемости гематоэнцефалического барьера [32, 80].

В связи с этим препараты на основе рЧИФН бета в настоящее время применяются в качестве лекарственных средств первой линии терапии для снижения риска и степени тяжести рецидивов при рассеянном склерозе. Применение рЧИФН бета уменьшает частоту обострений примерно на 30% по сравнению с плацебо [67, 148].

Выбор лекарственного препарата, содержащего гликозилированную или негликозилированную форму рЧИФН бета, зависит от множества факторов, в том числе от индивидуальных особенностей пациента. В ходе исследования эффективности препаратов на основе рЧИФН бета-1b показана возможность замены препаратов рЧИФН бета-1a на рЧИФН бета-1b, однако такую возможность, по мнению ряда исследователей, не следует рассматривать как полную взаимозаменяемость указанных препаратов [30, 40, 78, 81].

К недостаткам применения препаратов на основе рЧИФН бета можно отнести образование нейтрализующих антител к белку [30, 37, 40, 81].

В целом, терапия рЧИФН бета безопасна и хорошо переносится. Типичные побочные эффекты, отмечаемые у пациентов при лечении рЧИФН бета, такие как отек, боль и зуд в месте инъекции, являются умеренными, обратимыми и управляемыми [46, 97, 148].

Также как и для рЧИФН альфа, с целью увеличения длительности действия активного белка разработаны препараты пэгилированного рЧИФН бета, применение которых позволяет сократить частоту инъекций [55].

1.1.3. Рекомбинантный интерферон гамма

С помощью методов генной инженерии создан рчИФН гамма-1b, препараты на основе которого применяются в медицинской практике для лечения инфекционных и онкологических заболеваний.

Структура молекулы интерферона гамма

Природный ИФН гамма представляет собой симметричный гомодимерный гликопротеин, состоящий из 143 аминокислотных остатка с молекулярной массой около 38,8 кДа и двумя сайтами гликозилирования. Дисульфидные связи отсутствуют [48, 57].

В исследованиях, проведенных S.E. Ealick с соавторами в 1991 году, установлено, что каждый мономер ИФН гамма состоит из шести альфа спиралей длиной от 9 до 21 остатка [62]. Позднее G. Waschutza с соавторами обнаружили, что N-концевая спираль А и АВ-петля имеют значение для разворачивания и термодинамической стабильности рчИФН гамма [140].

Показана важность спирали А для взаимодействия рецептора с лигандом и, следовательно, для проявления биологической активности ИФН гамма. Обнаружено, что три области молекулы ИФН гамма важны для связывания с рецептором: длинная петля, соединяющая спирали А и В, H111 в спирали F и участок С-конца. Эти три области молекулы могут образовывать один связывающий домен [94].

При изучении физических свойств установлено, что ИФН гамма чувствителен к теплу и необратимо денатурируется в растворе при температуре 40 – 65 °С [144].

РчИФН гамма получают, используя в качестве продуцента генномодифицированные клетки *E. coli* [44]. Так как синтезируемый в бактериальных клетках рчИФН гамма не гликозилирован, он имеет более короткий период полувыведения по сравнению с природным. Отсутствие углеводных фрагментов в молекуле рчИФН гамма не снижает активность молекулы, однако влияет на ее физико-химические и фармакокинетические свойства [123].

Аминокислотная последовательность рчИФН гамма-1b представлена на рисунке 4 [69].

QDPYVKEAEN	LKKYFNAGHS	DVADNGTLFL
GILKNWKEES	DRKIMQSQIV	SFYFKLFFKNF
KDDQSIQKSV	ETIKEDMNVK	FFNSNKKKRD
DFEKLTNYSV	TDLNVQRKAI	HELIQVMAEL
SPAAKTGKRK	RSQMLFRGR	

Рисунок 4 – Аминокислотная последовательность рчИФН гамма-1b

Применение препаратов рекомбинантного интерферона

гамма в клинической практике

Показано, что лекарственные препараты на основе рчИФН гамма проявляют терапевтический эффект при лечении онкологических заболеваний, а также туберкулеза, идиопатического легочного фиброза, муковисцидоза, склеродермии, инвазивных грибковых инфекций, атопического дерматита [43, 99, 105].

Показана эффективность и безопасность рчИФН гамма в составе антибактериальной терапии у пациентов с внебольничной пневмонией, в том числе у пациентов с бактериологически установленной резистентностью возбудителя заболевания. Применение рчИФН гамма сопровождалось достоверным сокращением продолжительности болезни и длительности госпитализации [1].

К недостаткам применения препаратов на основе рчИФН гамма можно отнести невысокую стабильность и короткий период полувыведения, что требует частого повторного введения цитокина [63, 120]. Это может приводить к развитию таких побочных эффектов, как лихорадка, усталость, тошнота, рвота, диарея, нейротоксичность и лейкопения [61, 90, 137, 138]. В некоторых случаях такие нарушения и симптомы могут ухудшать качество жизни пациентов, однако, в целом, отмечается безопасность терапии препаратами на основе рчИФН гамма, что позволяет его рекомендовать для применения в клинической практике [1, 84, 145].

1.2. Аналитический обзор номенклатуры лекарственных средств на основе интерферонов, зарегистрированных в Российской Федерации, Европейском Союзе и США

В Российской Федерации в основном применяют лекарственные препараты на основе рЧИФН альфа-2b отечественного производства, в том числе препараты полного цикла, включающие стадии производства фармацевтических субстанций (Таблица 1). Российскими производителями обеспечивается достаточно широкая номенклатура данных лекарственных препаратов различного назначения, лекарственных форм и дозировок. Также в Российской Федерации зарегистрированы два препарата рЧИФН альфа-2b зарубежного производства и один препарат пэгинтерферона альфа-2a («Пегасис», раствор для подкожного введения, Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария) (Таблица 2) [12].

Препараты рЧИФН бета-1b и бета-1a отечественного и зарубежного производства, зарегистрированные в Российской Федерации, представлены в таблице 3 [12].

Таблица 1 – Субстанции рЧИФН отечественного производства

Субстанция	Производитель
рЧИФН альфа-2b (безметиониновый)	ООО «Фармапарк»
рЧИФН альфа-2b (метиониновый)	ООО «Фармапарк»
рЧИФН альфа-2b (безметиониновый)	ЗАО «Вектор-Медика»
рЧИФН альфа-2b (безметиониновый)	ЗАО «Биокад»
рЧИФН альфа-2b (безметиониновый)	ЗАО «Биннофарм»
рЧИФН альфа-2b (метиониновый)	ООО НПП «Фармаклон»
рЧИФН альфа-2b (безметиониновый)	ЗАО «Фирн М»
рЧИФН бета-1b	ЗАО «Биокад»
рЧИФН бета-1b	АО «Генериум»

Таблица 2 – Препараты, содержащие в качестве основного действующего вещества рЧИФН альфа-2b

Торговое наименование	Международное непатентованное наименование	Производитель	Лекарственная форма
Реаферон-ЕС	рЧИФН альфа-2b	ЗАО «Вектор-Медика»	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения
Инфагель	рЧИФН альфа-2b	ЗАО «Вектор-Медика»	Гель для местного и наружного применения

Продолжение таблицы 2

Лайферон	рчИФН альфа-2b	ЗАО «Вектор-Медика»	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного, субконъюнктивального введения и закапывания в глаз
Виферон	рчИФН альфа -2b	ООО «Ферон»	Мазь для наружного и местного применения
Виферон	рчИФН альфа -2b	ООО «Ферон»	Суппозитории ректальные
Кипферон	рчИФН альфа -2b	ООО «Алфарм»	Суппозитории вагинальные и ректальные
Гриппферон	рчИФН альфа -2b	ЗАО «Фирн М»	Капли назальные
Реаферон-ЕС-Липинт	рчИФН альфа -2b	ЗАО «Вектор-Медика»	Лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь
Офтальмоферон	рчИФН альфа -2b+дифенгидами на гидрохлорид	ЗАО «Фирн М»	Капли глазные
Аллергоферон бета	рчИФН альфа -2b+бетаметазон	ЗАО «Фирн М»	Гель для местного и наружного применения
Бинноферон альфа	рчИФН альфа-2b	АО «Биннофарм»	Раствор для внутривенного и подкожного введения
Микоферон	рчИФН альфа-2b+метронидазол+тербинафин	ЗАО «Фирн М»	Гель для наружного применения
Генферон лайт	рчИФН альфа-2b + таурин	ЗАО «Биокад»	Капли назальные
Интерфераль	рчИФН альфа-2b	ФГУП «ГНИИОЧБ» ФМБА	Аэрозоль для местного применения
Альтевир	рчИФН альфа-2b	ООО «Фармапарк»	Раствор для инъекций
Аллергоферон	рчИФН альфа-2b + лоратадин	ЗАО «Фирн М»	Гель для местного и наружного применения
Генферон	рчИФН альфа-2b + Бензокаин+таурин	ЗАО «Биокад»	Суппозитории вагинальные и ректальные
Герпферон	рчИФН альфа-2b	ЗАО «Фирн М»	Мазь для местного и наружного применения
Интрон А	рчИФН альфа-2b	Шеринг Плау Лабо Н.В.	Раствор для внутривенного и подкожного введения
Эберон альфа Р	рчИФН альфа-2b	Эбер Биотек С.А.	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций

Таблица 3 – Препараты, содержащие в качестве основного действующего вещества рчИФН бета

Наименование препарата	Международное непатентованное наименование	Производитель	Лекарственная форма
Интерферон бета-1b	рчИФН бета-1b	ЗАО «Биокад», Россия	Раствор для подкожного введения

Продолжение таблицы 3

Ронбетал	рЧИФН бета-1b	ЗАО «Биокад», Россия	Раствор для подкожного введения
Инфибета	рЧИФН бета-1b	АО «Генериум», Россия	Лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения
Бетаферон	рЧИФН бета-1b	Шеринг, Германия	Лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения
Экставиа	рЧИФН бета-1b	Новартис Фарма, Швейцария	Лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения
Ребиф	рЧИФН бета-1a	Мерк Сероно, Италия	Раствор для подкожного введения
Генфаксон	рЧИФН бета-1a	Лаборатория Тьютор, Аргентина	Раствор для подкожного введения
Синновекс	рЧИФН бета-1a	СиннаГен Ко, Иран	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения
Гебериф	рЧИФН бета-1a	ЗАО «Биокад», Россия	Раствор для подкожного введения
Авонекс	рЧИФН бета-1a	Биоген Айдек Лимитед, Великобритания	Раствор для внутримышечного введения и лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения

Лекарственные средства на основе рЧИФН альфа-2b производят в различных лекарственных формах и применяют для лечения широкого круга заболеваний. Препараты «Альтевир», «Бинноферон альфа», «Интрон А» рекомендованы для лечения хронического гепатита В и С, а также волосатоклеточного лейкоза и карциноидных опухолей. «Офтальмоферон» рекомендован для лечения конъюнктивитов и кератитов, «Виферон» и «Гриппферон» - для лечения острых респираторных вирусных инфекций, в том числе гриппа. «Герпферон» применяют для лечения первичного и рецидивирующего герпеса кожи и слизистых оболочек, «Аллергоферон» - для лечения аллергического ринита и аллергического конъюнктивита [19, 20, 22, 23, 25].

Препараты рЧИФН бета применяют для лечения ремитирующего рассеянного склероза и вторично-прогрессирующего рассеянного склероза, который проявляется в виде нарушения неврологических функций и сопровождается периодическими обострениями, для замедления темпов прогрессирования заболевания.

В Европейском Союзе и США также зарегистрированы препараты рЧИФН альфа-2b, например, «Интрон А», рекомендованный для лечения гепатита В и С, волосатоклеточного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, фолликулярной лимфомы, меланомы и карциноидной опухоли, и препараты рЧИФН бета-1a (например, «Бифиронекс») и рЧИФН бета-1b (например, «Экставиа»).

В Российской Федерации зарегистрирован препарат рЧИФН гамма «Ингарон», производства ООО «НПП «Фармаклон», в США зарегистрирован препарат «АСТИММУНЕ» производства Vidara Therapeutics Research Ltd. [12].

В качестве вспомогательных веществ в препаратах на основе рЧИФН альфа-2b, представляющих собой растворы для инъекций, используют полисорбат 80, оксиглутатион, метилпарагидроксибензоат, метакрезол, декстран, макрогол. Препараты на основе рЧИФН альфа в виде мазей изготавливают на основе вазелина и ланолина с добавлением масел (например, персикового); суппозитории – на основе кондитерского жира с добавлением масла какао; гели – на основе поливинилового спирта.

В состав препаратов на основе рЧИФН бета, представляющих собой лиофилизат, в качестве стабилизирующих веществ могут быть добавлены человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и маннитол, а в состав препаратов, представляющих собой растворы, входят ЧСА, маннитол, а также аминокислоты (метионин, аргинин, лизин) и декстран.

Таким образом, полная оценка качества основного действующего вещества – рЧИФН, на стадии готовой лекарственной формы может быть затруднена вследствие наличия в составе веществ, оказывающих влияние на результаты.

1.3. Проблемные вопросы оценки подлинности структуры рекомбинантных интерферонов альфа и бета, входящих в состав фармацевтических субстанций

При производстве и контроле качества фармацевтических субстанций и лекарственных средств, выпускаемых на их основе, основные требования к ним регламентируются в Фармакопеях Европейского Союза, США, Японии, Великобритании, Индии, а также ГФ РФ. В Российской Федерации ГФ РФ гармонизируется с требованиями Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА). Соответствие качества установленным стандартам необходимо для обеспечения безопасности их применения в медицинской практике.

Многие лекарственные средства, получение которых из природных источников ранее было затруднено, сегодня можно получать, используя технологию рекомбинантной ДНК. Кроме того, указанная технология позволяет получать абсолютно новые продукты, а также модифицированные продукты, обладающие свойствами, отличающимися от природных аналогов [65].

Основное отличие контроля качества биотехнологических субстанций и препаратов, выпускаемых на их основе, от других фармацевтических препаратов заключается в особенностях используемых методов для оценки подлинности, стабильности, чистоты и примесей [135].

Требования к показателям качества должны обеспечивать безопасность и эффективность лекарственного средства [8, 31].

В XIV Государственной Фармакопее Российской Федерации приведены общие требования к оценке качества субстанций рчИФН, а также требования к оценке качества субстанций рчИФН альфа-2b, в частности [9]. В соответствии с данными требованиями подлинность субстанций рчИФН альфа-2b должна быть подтверждена биологическим методом, методами пептидного картирования, изоэлектрического фокусирования и электрофореза. Чистоту необходимо оценивать методом ВЭЖХ, а также методом

электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Для рекомбинантных белков необходимо количественное определение остаточных белков клеток-хозяина и остаточной ДНК клеток-продуцентов. Обязательным является определение специфической и расчет удельной активности [11].

Сведения о наличии/отсутствии монографий, регламентирующих требования к производству и контролю качества рЧИФН альфа-2b, в Фармакопеях разных стран мира приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Перечень монографий на рЧИФН альфа-2b, представленных в отечественной и международных Фармакопеях

Фармакопея	Монография на рЧИФН альфа-2b
XIV Государственная Фармакопея Российской Федерации	ФС 3.3.1.0069.18 “Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b, субстанция раствор, раствор замороженный”
Европейская Фармакопея	Монография 07/2015:1110 «Interferon Alfa-2 Concentrated Solution»
Фармакопея США	Отсутствует
Фармакопея Великобритании	Ссылка на монографию Европейской Фармакопеи 1110 «Interferon Alfa-2 Concentrated Solution»
Фармакопея Индии	Монография «Interferon Alfa-2 Concentrated Solution»
Фармакопея Китая	Отсутствует

В соответствии с требованиями монографии Европейской Фармакопеи 07/2015:1110 «Interferon alfa-2 concentrated solution» необходимо подтверждение подлинности следующими методами: подтверждение ожидаемой биологической активности биологическим методом; подтверждение аминокислотной последовательности методом пептидного картирования; определение изоэлектрической точки молекулы рЧИФН альфа методом изоэлектрического фокусирования; определение электрофоретической подвижности рЧИФН альфа методом электрофореза в восстанавливающих условиях. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле (восстанавливающие и невосстанавливающие условия) и изофокусирования рекомендована оценка наличия родственных соединений и примесей. Также с применением метода ВЭЖХ необходимо определение количества родственных (окисленных) примесей. Количество рЧИФН альфа в субстанции определяют спектрофотометрическим методом.

Рекомендована оценка количества бактериальных эндотоксинов, остаточных белков клеток-хозяина и остаточной ДНК клеток-хозяина. Активность субстанции определяют биологическим методом, оценивая противовирусную активность рЧИФН альфа-2b с использованием культуры клеток MDBK и вируса везикулярного стоматита VSV [73].

Требования Фармакопеи Великобритании и Фармакопеи Индии к оценке качества субстанций рЧИФН альфа-2b аналогичны требованиям, представленным в Европейской Фармакопее [51, 82].

В Фармакопее США отсутствует монография на субстанцию рЧИФН альфа-2b, указаны только общие требования к оценке качества рекомбинантных белков в монографии «Biotechnology-derived articles».

Сведения о наличии/отсутствии монографий на рЧИФН бета в Фармакопеех разных стран мира приведены в таблице 5 [52, 71].

Таблица 5 – Перечень монографий на рЧИФН бета-1a и бета-1b, представленных в отечественной и международных Фармакопеех

Фармакопея	Монография на рЧИФН бета-1a	Монография на рЧИФН бета-1b
XIV Государственная Фармакопея Российской Федерации	Отсутствует	Отсутствует
Европейская Фармакопея	Монография 01/2009:1639 «Interferon beta-1a concentrated solution»	Отсутствует
Фармакопея США	Отсутствует	Отсутствует
Фармакопея Великобритании	Ссылка на монографию Европейской Фармакопеи 1639 «Interferon beta-1a concentrated solution»	Отсутствует
Фармакопея Индии	Отсутствует	Отсутствует
Фармакопея Китая	Отсутствует	Отсутствует

В соответствии с монографией Европейской Фармакопеи 01/2009:1639 «Interferon beta-1a concentrated solution» необходимо подтверждение подлинности следующими методами: подтверждение ожидаемой биологической активности биологическим методом; метод масс-спектрометрии для анализа гликанов (распределение изоформ); подтверждение аминокислотной последовательности методом пептидного

картирования. Необходимо выявление родственных примесей методом электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях с применением СО CRS. Также рекомендован метод ВЭЖХ для определения количества окисленного рЧИФН бета-1а (данный анализ проводят одновременно с подтверждением подлинности первичной структуры методом пептидного картирования). Необходимо количественное определение белка методом ВЭЖХ, определение специфической противовирусной активности биологическим методом с использованием клеток WISH и вируса VSV (или клеток A549 и вируса энцефаломиокардита EMC). Кроме того, предусмотрено количественное определение бактериальных эндотоксинов, остаточной ДНК штамма-продуцента и остаточных белков клеток-хозяина, количественное определение димеров и родственных примесей с большей молекулярной массой [71].

В Международных и отечественной Фармакопеях требования к оценке качества субстанции рЧИФН бета-1b отсутствуют.

Оценку подлинности и чистоты рекомбинантных белков, в том числе рЧИФН, проводят с применением СО, которые являются мерой сравнения. Качество СО должно соответствовать их предназначению и должно быть охарактеризовано с использованием не только рутинных, но и более широкого диапазона методов. Количество примесей в СО регламентируется [66].

Монографиями Европейской Фармакопеи предусмотрено использование СО для оценки качества лекарственных средств. Все СО, указанные в монографиях Европейской Фармакопеи, представлены в каталоге Европейского Директората по качеству лекарственных средств (EDQM), который ежедневно обновляется [112].

В каталоге EDQM представлены химические СО (chemical reference substances - CRS), растительные СО (herbal reference standards - HRS) и биологические СО (biological reference preparations - BRP). В качестве кандидатов в СО выбирают серии субстанций, которые должны быть охарактеризованы в лабораториях EDQM в соответствии с правилами

Европейской Фармакопеи и документом ISO 17034 “General requirements for the competence of reference material producers”. После утверждения комиссией Европейской Фармакопеи разработанные и аттестованные СО становятся доступны для использования производителями лекарственных средств для количественного определения, оценки чистоты, подлинности или других показателей качества [113].

Монографиями Фармакопеи США также предусмотрено использование СО для оценки качества лекарственных средств. Фармакопея США в настоящее время предлагает более 3500 охарактеризованных СО (USP Reference Standards (RS)) лекарственных средств, вспомогательных веществ, примесей, пищевых ингредиентов и др. [125].

USP RS имеют официальный юридический статус в США. USP RS, в случае необходимости, аттестуются относительно международных СО, одобренных Всемирной Организацией Здравоохранения (World Health Organization - WHO) [136].

Для воспроизведения методов, указанных в Британской Фармакопее, рекомендованы СО Британской Фармакопеи (British Pharmacopoeia chemical reference substances (BP CRS) [50].

В случае отсутствия международных или фармакопейных СО для новых субстанций допустимо утверждение производителями в качестве СО охарактеризованной серии субстанции (СО предприятия) [64]. В случае наличия международных или фармакопейных СО допустимо применение СО предприятия, утвержденного и используемого в соответствии с нормативными документами предприятия, аттестованного в сравнении с международным или фармакопейным СО [6].

Допустимо использование одного СО для биологических и физико-химических методов испытаний. Однако при оценке качества отдельных групп препаратов для биологических и физико-химических методов требуются разные СО, отличающиеся, например, концентрацией белка [64].

Использование подходящих СО является важным аспектом оценки качества биотехнологических препаратов. Для некоторых биотехнологических препаратов существуют международные СО. В настоящее время международные СО широко используются производителями для определения активности, количественного определения, подлинности и чистоты отдельных групп биотехнологических препаратов [135].

Анализ подлинности в сравнении с СО является необходимым этапом оценки качества рекомбинантных белков для обеспечения безопасности и эффективности фармацевтических препаратов, изготовленных на их основе. Основным методом при подтверждении подлинности первичной структуры рекомбинантного белка является метод пептидного картирования, который предполагает гидролиз белка (ферментативный или химический), в результате которого образуются пептиды. Затем проводят разделение и идентификацию полученных пептидов. Для разделения и идентификации продуктов гидролиза в большинстве случаев используют метод ВЭЖХ [134].

Для пептидного картирования часто в качестве фермента выбирают трипсин, так как он гидролизует с высокой специфичностью со стороны СООН-конца молекулы лизина и аргинина. Несмотря на то, что связи кислых аминокислот расщепляются медленно, только связи лизин-пролин и аргинин-пролин чрезвычайно устойчивы к расщеплению трипсином. Другое преимущество трипсина (и химотрипсина) заключается в том, что он может легко гидролизовать белки, которые нерастворимы в 2М мочеvine, 0,1М гидрокарбонатном буфере. У химотрипсина специфичность значительно меньше, чем у трипсина, так как он расщепляет участки со стороны СООН-конца триптофана, тирозина и фенилаланина с дополнительным расщеплением связей после лейцина, метионина и других аминокислот, содержащих гидрофобные участки. Другой широко используемый фермент – лизилэндопептидаза, которая специфически гидролизует связи после лизина. Преимущество данного фермента заключается в том, что он образует фрагменты более крупного размера, чем трипсин. Протеаза V8 расщепляет

связи после остатков глутаминовой кислоты как в буфере бикарбоната аммония (рН 8,0), так и в буфере аммония ацетата (рН 4,0); и расщепляет связи после остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот в фосфатном буфере (рН 7,8) [87].

С помощью пептидного картирования можно идентифицировать единичные замены аминокислот, происходящие в результате ошибок в считывании последовательности ДНК или в результате точечных мутаций. Пептидное картирование представляет собой процедуру сравнения, так как сравнивают пептидную карту испытуемого образца с пептидной картой СО, гидролиз которых проводят одновременно в одинаковых условиях. На хроматограммах испытуемого образца и СО должно наблюдаться одинаковое количество пиков и одинаковое относительное время удерживания пиков. Таким образом подтверждают первичную структуру белка, оценивают стабильность технологического процесса и генетической конструкции [134].

Применение единой методики для оценки подлинности структуры различных белков методом пептидного картирования невозможно, необходима разработка методик и пептидных карт для каждого уникального белка. Пептидная карта представляет собой финальный продукт нескольких физико-химических процессов, обеспечивающих всестороннее исследование рекомбинантного белка [72].

Методом пептидного картирования анализируют подлинность первичной структуры молекулы белка до добавления вспомогательных веществ (стабилизаторов) белковой природы на стадии субстанции.

Для подтверждения подлинности рчИФН физико-химическими методами EDQM рекомендован СО рчИФН альфа-2b CRS (кат. № I0320301) и СО рчИФН бета-1a CRS (кат. № Y0001101) [131].

При получении пептидной карты в сравнении с СО характеристика пептидов, соответствующих каждому пику, не требуется. При этом проводят определение аминокислотной последовательности каждого пептида, полученного в результате гидролиза белка и соответствующего

определенному пику на пептидной карте, при валидации методики пептидного картирования. Для характеристики пиков рекомендована масс-спектрометрия [72]. Масс-спектрометрия представляет собой метод изучения вещества, в основе которого определение в газовой фазе отношения массы к числу элементарных положительных или отрицательных зарядов ионов, образованных из анализируемого вещества. Существуют базы данных, позволяющие сравнивать экспериментально полученный масс-спектр вещества с масс-спектрами известных веществ, внесенных в базу данных, что исключает необходимость «вручную» расшифровывать все масс-спектры. Данный подход имеет большое значение для исследования сложных смесей [21].

Как было отмечено ранее, рЧИФН могут отличаться структурно как от эндогенных ИФН того же типа, так и внутри одного подтипа. Данные отличия обусловлены технологией производства.

Рекомбинантный белок, полученный с помощью *E. coli*, может содержать на N-конце аминокислотной последовательности молекулы метионин, так как синтез молекулы белка в бактериальной клетке начинается с АТГ-кодона [96, 117]. Однако в настоящее время известна технология производства как метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (на N-конце молекулы метионин), так и рЧИФН альфа-2b, идентичного эндогенному белку (безметиониновая форма).

В Российской Федерации зарегистрированы две метиониновых и пять безметиониновых форм субстанций рЧИФН альфа-2b [12].

При оценке подлинности и чистоты безметиониновых субстанций рЧИФН альфа-2b в качестве образца сравнения производители используют безметиониновый рЧИФН альфа-2b CRS [73]. В связи со структурными различиями метиониновой и безметиониновой форм рЧИФН альфа-2b, указанный СО для метиониновых субстанций не используют. Производители метиониновых субстанций используют СОП для оценки подлинности

структуры данного белка методом пептидного картирования, требования к аттестации которого в настоящее время не регламентированы.

В Российской Федерации также зарегистрированы две фармацевтические субстанции рЧИФН бета-1b [12]. ФСО рЧИФН бета-1b отсутствует. Учитывая, что рЧИФН бета-1b устойчив только в кислой среде, в состав одной из субстанций производитель добавляет ЧСА (белок) для поддержания стабильности основного действующего вещества в буферном растворе с нейтральным рН. В связи с этим, в нормативной документации производителя отсутствует оценка подлинности первичной структуры методом пептидного картирования. Вторая из зарегистрированных субстанций рЧИФН бета-1b, рН которой составляет 4.0, не содержит стабилизаторов. Однако в нормативной документации производителя также отсутствует подтверждение подлинности молекулы методом пептидного картирования.

Таким образом, в настоящее время актуальной является разработка ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и ФСО рЧИФН бета-1b для оценки подлинности вновь выпускаемых серий соответствующих субстанций методом пептидного картирования, включая выбор кандидатов в ФСО, установление аттестованной характеристики данных ФСО, исследование стабильности и установление срока годности ФСО, разработку сопроводительной документации, а также разработку методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

2.1. Разработка требований к кандидату в фармакопейный стандартный образец метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b, выбор кандидата в стандартный образец и его формы выпуска, оценка его качества

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 (M₁).

Анализ нормативных документов отечественных производителей фармацевтических субстанций свидетельствует о том, что качество всех субстанций оценивается по следующим показателям: подлинность, количественное определение, чистота, специфическая и удельная активность, остаточное количество ДНК и белков штамма-производителя, бактериальные эндотоксины, токсичность, стерильность, прозрачность, цветность, рН и механические включения [12].

Изучение подлинности первичной структуры молекулы рекомбинантного белка с помощью пептидного картирования позволяет выявить замену, добавление или удаление одной аминокислоты. Первичная структура СО сравнения и испытуемого образца должны быть идентичны. Поскольку СО рЧИФН альфа-2b CRS (EDQM, кат. № I0320301) представляет собой безметиониновую субстанцию рЧИФН альфа-2b, то применение данного СО для оценки подлинности первичной структуры метиониновой формы рЧИФН альфа-2b некорректно. Поэтому, учитывая, что для разработки ФСО необходимо выбрать метиониновую субстанцию в качестве кандидата в ФСО, на первом этапе работы нами был проведен сравнительный анализ

нормативных документов двух отечественных субстанций данного типа, зарегистрированных в Российской Федерации (субстанции производства ООО «Фармапарк» и ООО НПП «Фармаклон» (Таблица 6).

Таблица 6 – Показатели качества метиониновых субстанций рчИФН альфа-2b и используемые СО в соответствии с нормативной документацией производителей (ООО «Фармапарк» и ООО НПП «Фармаклон»)

№ п.п.	Метод	ООО «Фармапарк» (используемый СО)	ООО НПП «Фармаклон» (используемый СО)
1	Подлинность		
	Реакция нейтрализации биологической противовирусной активности	+ WHO International Standard Interferon alpha-2b, NIBSC code 95/566	+ СО активности 42-28-90-67
	Пептидное картирование (ВЭЖХ) и используемый СО	+ стандартный образец предприятия (СОП) интерферона альфа-2b	-
	Изоэлектрическое фокусирование	+ Interferon alpha-2b CRS от EDQM	-
	Электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях	+ Interferon alpha-2b CRS (EDQM)	+ СОП
2	Специфическая активность		
	Биологический метод	+ WHO International Standard Interferon alpha-2b, NIBSC code 95/566	+ СО активности 42-28-90-67
3	Удельная активность		
	Расчетный метод	+	+
4	Содержание белка		
	Спектрофотометрический метод	+	+
5	Чистота. Специфические и неспецифические примеси		
	ВЭЖХ	+ Interferon alpha-2b CRS (EDQM)	+ СОП
	Электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях	+ Interferon alpha-2b CRS (EDQM)	+
	Электрофорез в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях	+ Interferon alpha-2b CRS (EDQM)	+ СОП
	Бактериальные эндотоксины	+	-

Продолжение таблицы 6

	Остаточная ДНК штамма-производителя	+	+
	Остаточные белки клеток-хозяина	+	+
6	Описание	+	+
	Цветность раствора	+	+
	Прозрачность раствора	+	+
	pH	+	+
	Стерильность	+	+
	Аномальная токсичность	+	+
	Механические включения	-	+
	Пирогенность	-	+

Как следует из данных, представленных в таблице 6, оценку подлинности методом пептидного картирования и методом изофокусирования проводит только ООО «Фармапарк», используя при этом для пептидного картирования в качестве СОП рЧИФН альфа-2b охарактеризованную серию метиониновой субстанции, что обосновано отсутствием коммерческого СО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b. Номенклатура показателей и все методики оценки качества субстанции данного производителя представлены в полном объеме и соответствуют требованиям Европейской Фармакопеи. В НД субстанции ООО НПП «Фармаклон», в отличие от ООО «Фармапарк», не предусмотрена оценка подлинности методом пептидного картирования и методом изоэлектрического фокусирования, и, кроме того, вместо определения количества бактериальных эндотоксинов оценивают пирогенность субстанции.

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»,

мы изменили концентрацию рЧИФН альфа-2b для кандидата в ФСО и вместо концентрации 2,5 мг/мл рЧИФН альфа-2b в субстанции мы использовали концентрацию 1 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 криопробирки 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 PN003726/01), за исключением раздела «Упаковка» (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты оценки качества кандидата в ФСО рЧИФН альфа-2b

Наименование показателей	Метод испытания	Требования НД	Результаты испытания
Описание	Визуальный	Раствор замороженный. Представляет собой плотную затвердевшую беловатого цвета массу. После размораживания образуется бесцветная, прозрачная, опалесцирующая жидкость.	Соответствует Раствор замороженный. Представляет собой плотную затвердевшую беловатого цвета массу. После размораживания образуется бесцветная, прозрачная, опалесцирующая жидкость.
Подлинность	Реакция нейтрализации противовирусной активности	Кандидат в СО должен инактивироваться анти-альфа-интерфероновыми поликлональными антителами аналогично международному стандартному образцу активности ИФН альфа-2b	Соответствует
	Изоэлектрическое фокусирование	Положение основных полос в изоэлектрофореграмме кандидата в СО должно соответствовать положению основных полос в изоэлектрофореграмме стандартного раствора. Изоэлектрическая точка между рН 5,8 и рН 6,3	Соответствует. Положение основных полос в изоэлектрофореграмме кандидата в СО соответствует положению основных полос в изоэлектрофореграмме стандартного раствора. Изоэлектрическая точка 6,2

Продолжение таблицы 7

	Электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях	Положение основной полосы на электрофореграмме кандидата в СО должно соответствовать положению основной полосы на электрофореграмме стандартного раствора.	Соответствует. Положение основной полосы на электрофореграмме кандидата в СО соответствует положению основной полосы на электрофореграмме стандартного раствора
	Пептидное картирование с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии	Должен быть представлен профиль хроматограммы раствора кандидата в СО после ферментативного гидролиза трипсином	Соответствует. Профиль хроматограммы раствора кандидата в СО после ферментативного гидролиза трипсином воспроизводится
Прозрачность	ГФ XII	Кандидат в СО должен быть прозрачным или по степени мутности не должен превышать эталон I	Соответствует. По степени мутности не превышает эталон I
Цветность	ГФ XII	Кандидат в СО должен быть бесцветным по сравнению с водой	Соответствует. Бесцветный по сравнению с водой
pH	Потенциометрический, ГФ XII	От 5,0 до 5,5	5,0
Специфические и неспецифические примеси	Метод электрофореза: - в восстанавливающих условиях при окрашивании нитратом серебра	На электрофореграмме испытуемого раствора могут присутствовать дополнительные менее интенсивные полосы с более низкой молекулярной массой, чем основная полоса. Ни одна из дополнительных полос не может быть более интенсивной, чем основная полоса, полученная для 1,0% стандартного раствора, и должно быть не более трех дополнительных полос, более интенсивных, чем основная полоса, полученная для 0,2% стандартного раствора.	Соответствует

Продолжение таблицы 7

	- в невосстанавливающих условиях при окрашивании нитратом серебра	На электрофореграмме испытуемого раствора могут присутствовать дополнительные менее интенсивные полосы с более высокой молекулярно массой, чем основная полоса. Ни одна из дополнительных полос не может быть более интенсивной, чем основная полоса, полученная для 1,0% стандартного раствора, и должно быть не более трех дополнительных полос, более интенсивных, чем основная полоса, полученная для 0,2% стандартного раствора	Соответствует
	ВЭЖХ	На хроматограмме испытуемого раствора площадь основного пика должна составлять не менее 95% от суммы площадей всех пиков. Площадь любого дополнительного пика должна составлять не более 3% от суммы площадей всех пиков. Сумма площадей дополнительных пиков должна составлять не более 5% от суммы площадей всех пиков.	Соответствует. Площадь основного пика 98,89% от суммы площадей всех пиков. Площади двух дополнительных пиков 0,2% и 0,91% от суммы площадей всех пиков. Сумма площадей дополнительных пиков составляет 1,11% от суммы площадей всех пиков.
Стерильность	Метод мембранной фильтрации, ГФ XII	Кандидат в СО должен быть стерильный	Стерильный
Остаточная ДНК штамма продуцента	Иммуноферментный анализ с использованием Threshold системы	Не более 2,0 пг/мкг белка	Менее 0,1 пг/мкг белка
Бактериальные эндотоксины	Качественный анализ (Метод А), ГФ XII	Не более 100 ЕЭ на 1,0 мг белка	Менее 3,0 ЕЭ на 1,0 мг белка
Остаточные белки клеток хозяина	ИФА	Не более 0,2 нг/мкг белка	Менее 0,01 нг/мкг белка

Продолжение таблицы 7

Белок	Метод Лоури (метод А), ГФ XII	Не менее 1,0 мг/мл	1,0 мг/мл
Специфическая активность	Определение противовирусной активности на культуре клеток	Не менее $1,7 \times 10^8$ МЕ/мл	$1,7 \times 10^8$ МЕ/мл
Удельная активность	Расчетный	Не менее $1,4 \times 10^8$ МЕ/мг	$1,6 \times 10^8$ МЕ/мг
Упаковка	По 0,5 мл в стерильных полипропиленовых криопробирках вместимостью 1,0 мл, соответствующих требованиям USP VI. По 1 крипробирке в картонной пачке		Соответствует. По 0,5 мл в стерильных полипропиленовых криопробирках вместимостью 1,0 мл, соответствующих требованиям USP VI. По 1 криопробирке в картонной пачке.

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 высокого разрешения. 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 между парами остатков C2-C99 и C30-C139 и установили, что возможные мутации, отклонения и ошибки в первичной структуре кандидата в ФСО не превышали 1%, что соответствует известной структуре молекулы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b [26].

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.

2.2. Установление аттестованной характеристики фармакопейного стандартного образца метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b, разработка сопроводительной документации

Для установления аттестованной характеристики СО, применяемых при рутинном контроле качества биологических лекарственных средств и субстанций, как правило, используют методику, с помощью которой анализируют вновь выпускаемые серии целевого продукта. В связи с этим, СО является комплексом СО и методики [35].

Для установления аттестованной характеристики кандидата в ФСО метиониновой формы рчИФН альфа-2b использовали методику, предусмотренную Монографией Европейской Фармакопеи 07/2015:1110. Методика предусматривает предварительный ферментативный гидролиз (трипсинолиз) молекулы рчИФН альфа-2b, который может влиять на стабильность получаемых результатов. При этом используют фермент трипсин, который выделяют из поджелудочной железы животных. При этом активность и чистота трипсина, выделенного из разных источников, может отличаться. Например, наряду с трипсином, обычно содержащим примесь в виде химотрипсина, существует реактив трипсин, обработанный L-1-тозиламид-2-фенилэтилхлорметилкетонем, который инактивирует химотрипсин. Учитывая возможное влияние трипсина разных производителей и разных серий на профиль получаемой пептидной карты, мы провели сравнительное исследование с применением трипсина с разным составом и разной активностью (Таблица 8).

Таблица 8 – 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 тридцать пептидных карт с использованием четырех хроматографов: 8 пептидных карт с «трипсином 1»; 9

пептидных карт с «трипсином 2»; 8 пептидных карт с «трипсином 3», 5 пептидных карт с «трипсином 4» (Рисунок 5 – 8).

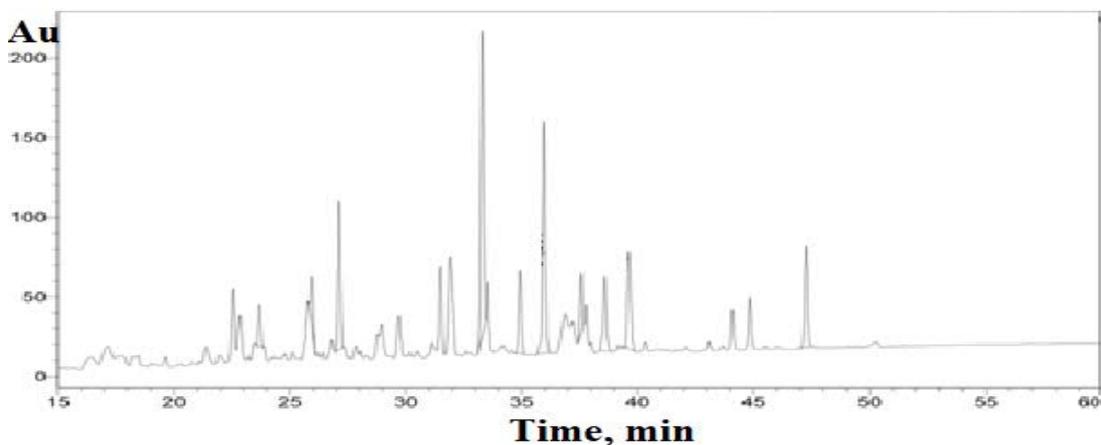


Рисунок 5 – Пептидная карта кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (Трипсин 3)

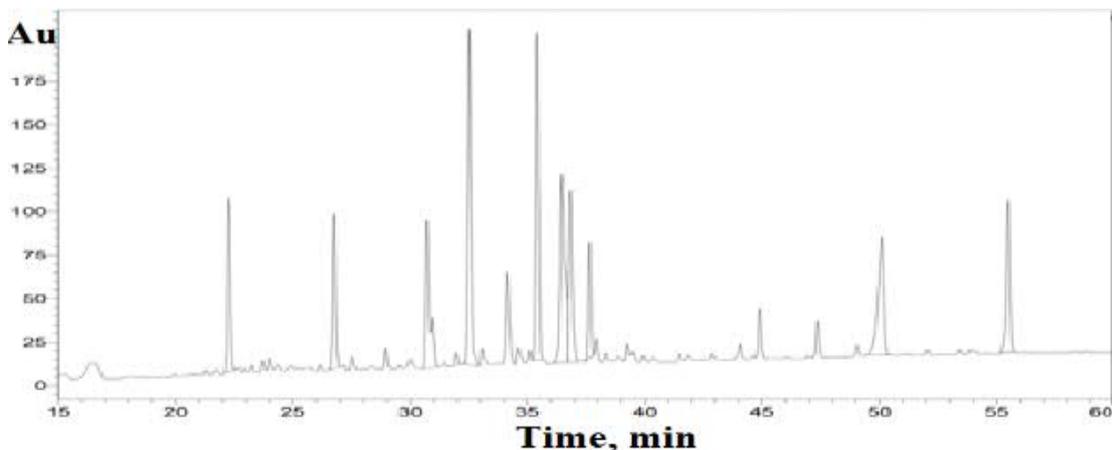


Рисунок 6 – Пептидная карта кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (Трипсин 4)

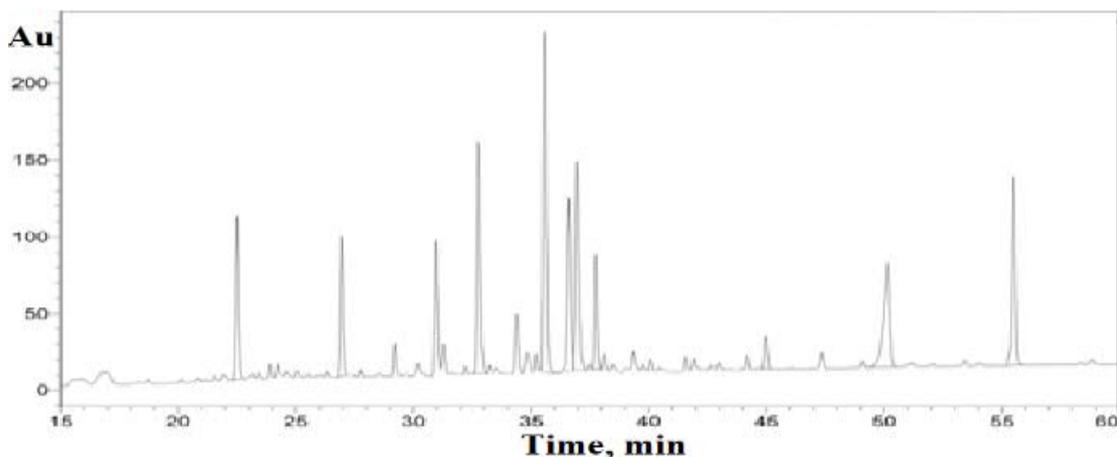


Рисунок 7 – Пептидная карта кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (Трипсин 1)

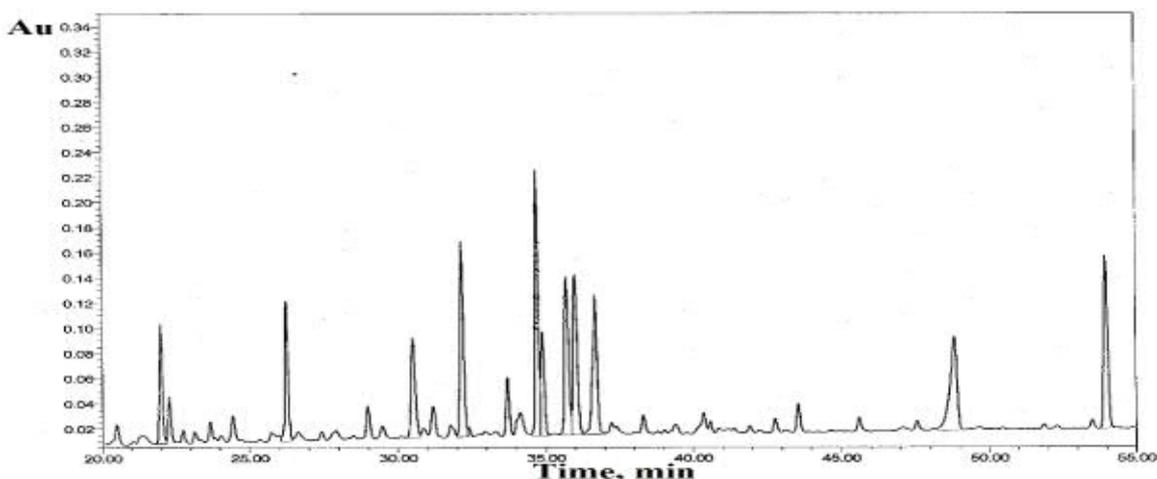


Рисунок 8 – Пептидная карта кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (Трипсин 2)

Как видно на рисунке 5, на пептидной карте, которую получили с применением «трипсина 3», наблюдается большое количество кластерных пиков с плохим разрешением, что, предположительно, обусловлено недостаточной степенью гидролиза молекулы рЧИФН альфа-2b вследствие низкой активности фермента (3203 ЕД/мг).

Как видно на рисунке 6, на пептидной карте, которую получили с применением «трипсина 4», наблюдается большое количество пиков со сходной высокой интенсивностью, что, предположительно, обусловлено слишком глубоким гидролизом молекулы рЧИФН альфа-2b вследствие высокой активности фермента (13165 ЕД/мг).

Однако профили пептидных карт, представленных на рисунках 7 и 8, которые получены с применением «трипсина 1» и «трипсина 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). Характеристические пики, выбранные на основании визуальной оценки пептидных карт кандидата в ФСО, полученных с применением «трипсина 1» и «трипсина 2», были охарактеризованы по площади пика и стабильности времени удерживания (Рисунок 9, Таблица 9).

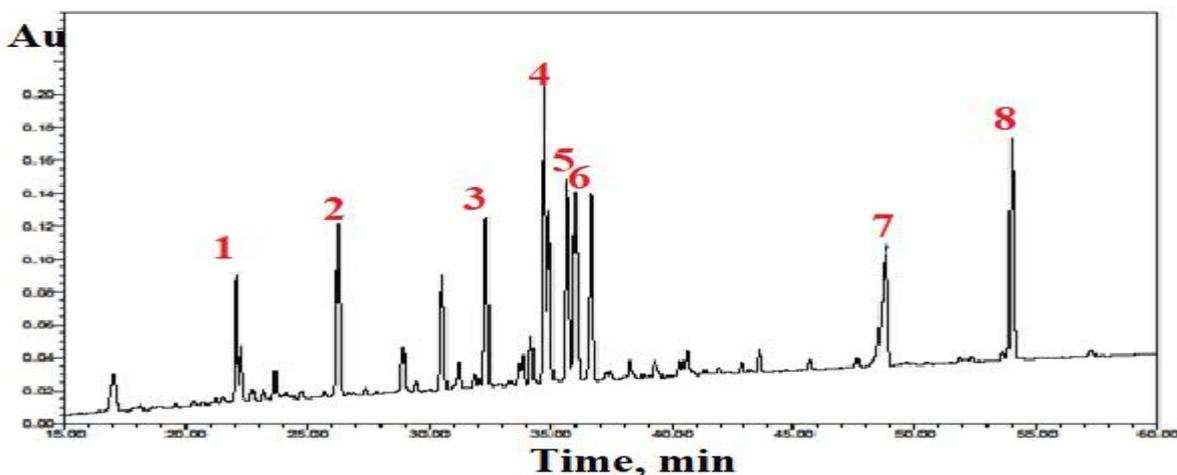


Рисунок 9 – Характеристические пики кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b

Таблица 9 – Оценка характеристических пиков на хроматограммах кандидата в ФСО рЧИФН альфа-2b, полученных с применением трипсина 1 и 2 (n = 17)

Номер пептидной карты	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5	Пик 6	Пик 7	Пик 8
	Абсолютное время удерживания, мин							
1	21,73	26,027	32,106	34,6	35,516	35,875	48,805	54,101
2	23,906	27,812	33,493	35,656	36,463	36,786	48,689	53,472
3	22,014	26,246	32,277	34,748	35,702	36,032	48,871	54,102
4	22,056	26,268	32,358	34,745	35,691	36,025	48,776	53,986
5	23,483	27,717	33,661	36,191	37,222	37,555	50,51	55,638
6	23,551	28,005	34,253	36,541	37,372	37,715	50,479	55,738
7	22,772	27,312	33,49	36,027	36,881	37,252	50,193	55,635
8	22,502	26,944	32,759	35,57	36,611	36,956	50,155	55,494
9	21,532	25,888	31,868	34,517	35,469	35,818	48,832	54,23
10	21,786	26,068	32,132	34,63	35,555	35,913	48,812	54,078
11	21,994	26,226	32,267	34,722	35,689	36,018	48,867	54,099
12	22,024	26,238	30,516	34,889	35,644	35,984	48,735	53,948
13	23,588	27,996	34,251	36,563	37,393	37,728	50,474	55,725
14	22,465	26,948	32,766	35,627	36,675	37,022	50,321	55,661
15	22,649	27,226	33,429	36,06	36,89	37,263	50,298	55,781
16	23,417	27,705	33,652	36,175	37,211	37,547	50,509	55,631
17	20,787	25, 287	31,100	34,180	35,300	35,640	49,123	54,700
Абс время удерживания (Среднее)	22,49	26,91	32,73	35,38	36,31	36,65	49,56	54,82

Продолжение таблицы 9

S (Абс время удерживания)	0,87	0,78	1,05	0,79	0,77	0,77	0,80	0,85
Площадь пика (среднее значение)	641856	755382	1036466	1698978	1155673	1162756	1161020	1287807

Как следует из таблицы 9, 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. Оценка и сравнение пиков по таким параметрам, как разрешение, число теоретических тарелок и фактор асимметрии не представляется возможным, так как данные параметры нестабильны (относительное стандартное отклонение по данным параметрам для характеристических пиков составляет 3,5–73,6%, 7,8–30,3%, 0–15,8% соответственно). Это, предположительно, является следствием ферментативного процесса с применением фермента (трипсина), гидролизующего белок по остаткам лизина и аргинина, в составе которого присутствует примесь химотрипсина, который способен расщеплять молекулу белка по таким аминокислотам, как аланин, лейцин и метионин, что может быть причиной незначительных изменений в пептидной карте при многократном воспроизведении методики в разные дни.

Для идентификации аминокислотной последовательности пептидов, соответствующих восьми выбранным характеристическим пикам (Рисунок 9), 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). Отобранные фракции (объем каждой фракции около 200 мкл) содержали 0,5 – 1,0 мкг пептида.

Далее фракции исследовали с помощью метода масс-спектрометрии высокого разрешения для установления аминокислотной последовательности пептидов, составляющих основу отобранных фракций (Таблица 10).

Таблица 10 – 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	DSSAAWDETL	72 ÷ 84
Пик 5	DRHDFGFPQEEFGNQFQK	33 ÷ 50
Пик 6	HDFGFPQEEFGNQFQK	35 ÷ 50
Пик 7	AETIPVLHEMIQQIF	51 ÷ 65
Пик 8	FYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMK	85 ÷ 113

Результаты масс-спектрометрического исследования пептидов, составляющих фракции кандидата в ФСО рчИФН альфа-2b, показали, что пик 2 представлен N-концевым участком метионинового белка, а пик 8 представлен наибольшим участком белка (29 аминокислотных остатка). Суммарно в результате анализа аминокислотной последовательности восьми пептидов подтвердили 56% первичной структуры кандидата в ФСО (Рисунок 10).

MCDLPQTHSLG	SRRTLMLLAQ	MRKISLFSCL
KDRHDFGFPQ	EEFGNQFQKA	ETIPVLHEMI
QQIFNLFSTK	DSSAAWDETL	LDKFYTELYQ
QLNDLEACVI	QGVGVTTETPL	MKEDSILAVR
KYFQRITLYL	KEKKYSPCAW	EVVRAEIMRS
FSLSTNLQES	LRSKE	

Рисунок 10 – Покрывание известной последовательности метиониновой формы рчИФН альфа-2b в результате масс-спектрометрического исследования пептидов соответствующих фракций

Примечание: зеленым цветом обозначены идентифицированные фрагменты молекулы

На основании проведенного нами исследования установили аттестованную характеристику как среднее арифметическое абсолютного и относительного времени удерживания охарактеризованных 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 11).

Таблица 11 – 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 восьми характеристических пиков. В связи с наибольшей площадью и высотой основным пиком выбрали пик 4. Отметим, что второй пик характеризует N-конец молекулы (отличие метиониновой формы рЧИФН от безметиониновой формы рЧИФН альфа-2b). При этом восьмой пик характеризует участок молекулы, составляющий 17% покрытия аминокислотной последовательности белка.

Далее для разработанного и аттестованного ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b составили сопроводительную документацию (паспорт, инструкцию по применению, макеты этикеток) (Приложение 1). Инструкция по применению включает описание методики применения разработанного ФСО с указанием производителя и каталожного номера трипсина, с которым проводили аттестацию.

Учитывая, что разработанный и аттестованный ФСО предназначен для оценки качества субстанций разных производителей, на следующем этапе работы мы провели сравнительный анализ хроматограмм, 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 (Рисунки 11 – 15).

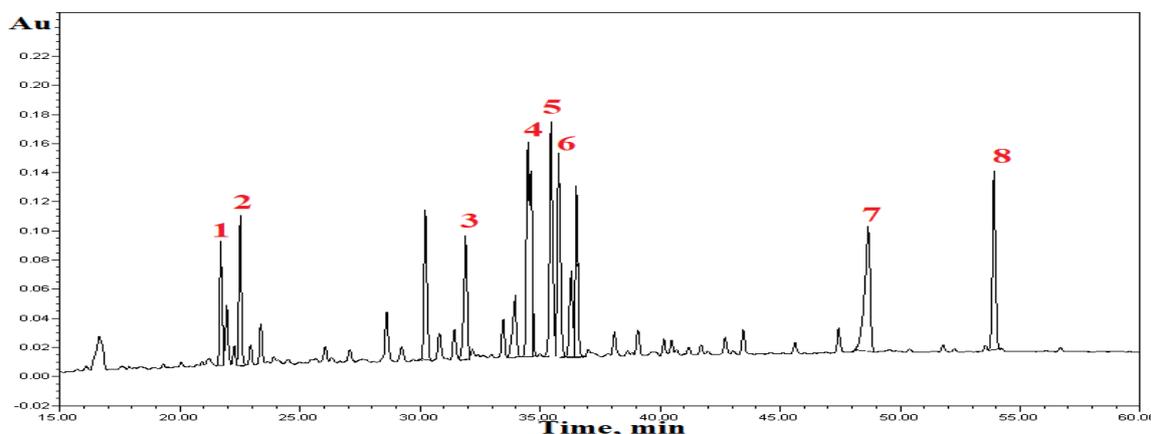


Рисунок 11 – Пептидная карта рЧИФН альфа-2b CRS

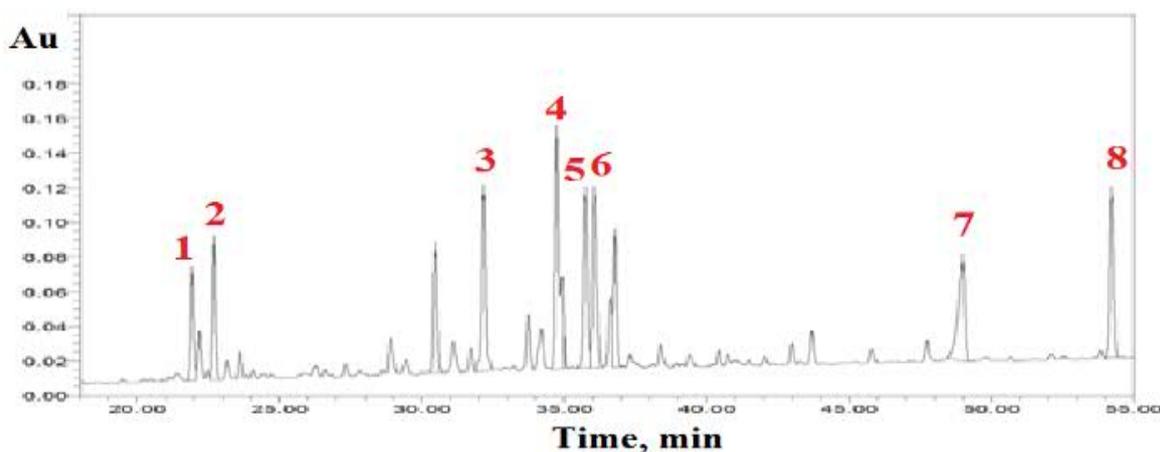


Рисунок 12 – Пептидная карта рЧИФН альфа-2b (Образец 2: безметиониновая форма рЧИФН альфа-2b, субстанция. Производитель ООО «Фармапарк», Россия)

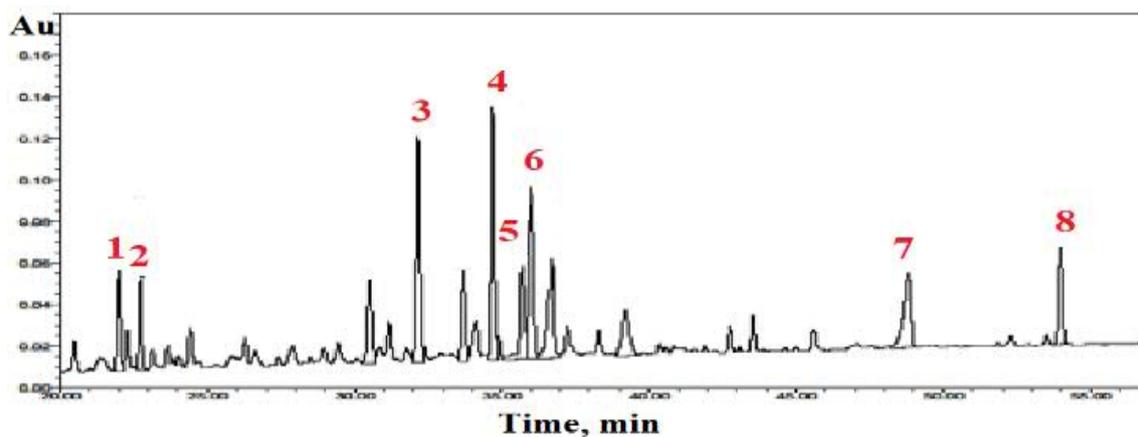


Рисунок 13 – Пептидная карта рЧИФН альфа-2b (Образец 3: безметиониновая форма рЧИФН альфа-2b, субстанция. Производитель ЗАО «Вектор-Медика», Россия)

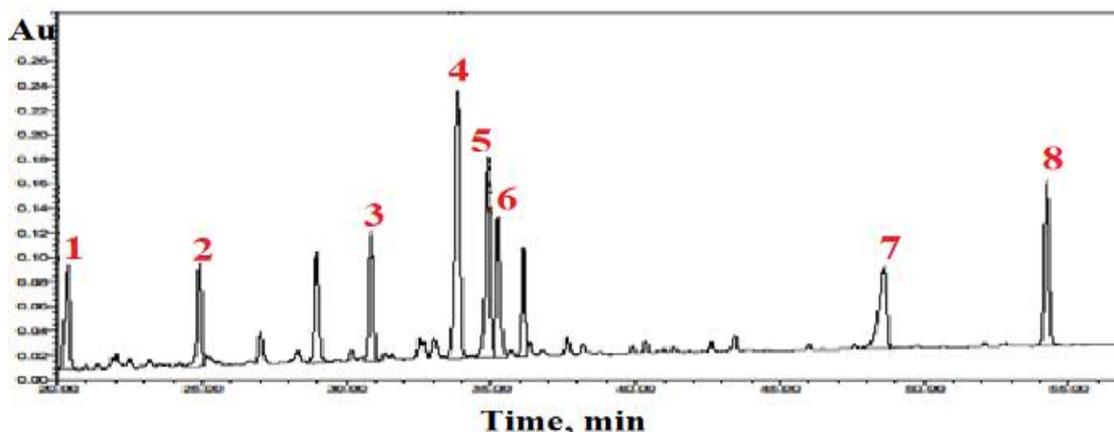


Рисунок 14 – Пептидная карта рчИФН альфа-2b (Образец 4: метиониновая форма рчИФН альфа-2b, субстанция. Производитель ООО «Фармапарк», Россия)

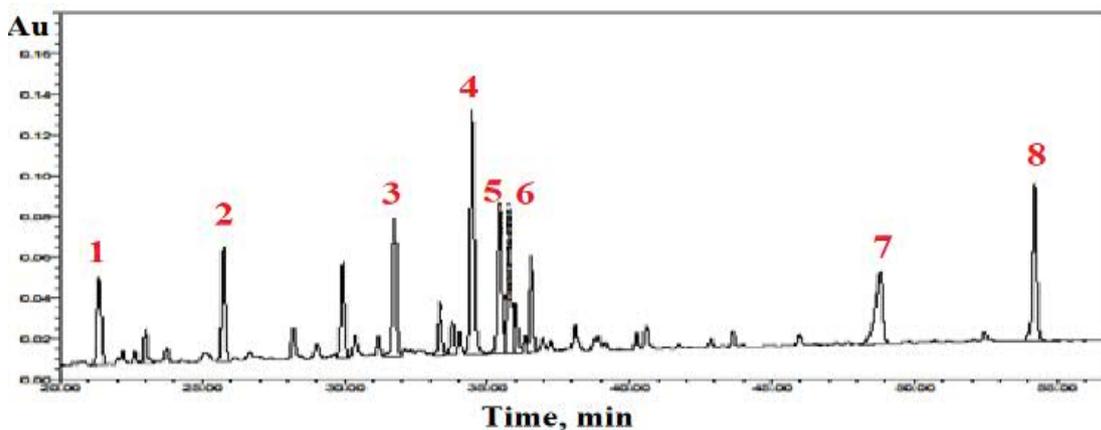


Рисунок 15 – Пептидная карта рчИФН альфа-2b (Образец 5: метиониновая форма рчИФН альфа-2b, субстанция. Производитель ООО НПП «Фармаклон», Россия)

На хроматограмме рчИФН альфа-2b CRS (Рисунок 11) наблюдали отличие времени удерживания второго пика от времени удерживания второго пика метиониновых образцов 4 и 5 (Рисунок 14, 15) и разработанного ФСО (Рисунок 9) в интервале 21-28 мин, обусловленное метионином на N-конце молекул. При этом хроматограммы метиониновых образцов и хроматограмма аттестованного ФСО идентичны и отличаются от хроматограмм безметиониновых образцов 2 и 3 (Рисунок 12, 13) в диапазоне 21-28 мин. Сравнение абсолютного и относительного времени удерживания характеристических пиков рчИФН альфа-2b CRS, метиониновых образцов 4

и 5 и аттестованной характеристики разработанного ФСО рЧИФН альфа-2b представлено в таблице 12.

Таблица 12 – Сравнение абсолютного и относительного времени удерживания характеристических пиков на хроматограммах рЧИФН альфа-2b CRS, образцов 4 и 5

Пик	Время удерживания пика	Наименование образца			Аттестованная характеристика ФСО
		рЧИФН альфа-2b CRS	Образец 4	Образец 5	
Пик 1	Относительное время удерживания характеристического пика	0,63	0,63	0,62	0,61-0,66
Пик 2		0,65	0,75	0,75	0,74-0,78
Пик 3		0,92	0,93	0,92	0,90-0,95
Пик 4	Абсолютное время удерживания характеристического пика	34,48 (мин)	34,47 (мин)	34,46 (мин)	33,80-36,95 (мин)
Пик 5	Относительное время удерживания характеристического пика	1,03	1,03	1,03	1,02-1,03
Пик 6		1,04	1,04	1,04	1,03-1,04
Пик 7		1,41	1,41	1,42	1,37-1,43
Пик 8		1,56	1,56	1,57	1,51-1,59

Как следует из данных таблицы 12, 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.

2.3. Оценка стабильности фармакопейного стандартного образца метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b и установление его срока годности

С целью установления срока годности разработанного ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b провели исследование его стабильности. Стабильность ФСО оценивали по содержанию окисленных

примесей в процессе длительного хранения (в реальном времени), а также на основании соответствия профилей пептидных карт, которые получили в процессе длительного хранения (в реальном времени), на соответствие аттестованным характеристикам с применением методик, представленных в монографии 07/2015:1110 Европейской Фармакопеи (Таблица 13, 14, 15) [73].

Таблица 13 – Результаты количественного определения окисленных примесей ФСО рчИФН альфа-2b

Дата анализа	Основное вещество, %	Окисленные примеси, %
01.2016	98,2	1,8
03.2018	97,8	2,2
07.2018	97,5	2,5
01.2019	97,4	2,6
04.2020	97,4	2,6

В соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи и НД производителя, количество окисленных примесей должно быть не более 5%. Проведенное нами исследование показало, что количество окисленных примесей при хранении разработанного ФСО в течение 5 лет не превышает 3%, что соответствует нормативным требованиям (Таблица 13).

Анализ профилей пептидных карт, полученных в процессе длительного хранения разработанного ФСО, проводили на основании данных абсолютного и относительного времени удерживания характеристических пиков, установленного в ходе аттестации (Таблица 14,15; Рисунок 16, 17).

Таблица 14 – Абсолютное время удерживания основного характеристического пика в процессе длительного хранения разработанного ФСО рчИФН альфа-2b

Дата анализа	Пик 4	
	Абсолютное время удерживания, мин	Аттестованная характеристика. Абсолютное время удерживания (диапазон), мин
02.2016	34,49	33,80-36,95
03.2018	34,70	
07.2018	34,53	
12.2018	33,85	
05.2020	33,98	

Таблица 15 – Относительное время удерживания характеристических пиков в процессе длительного хранения разработанного ФСО рЧИФН альфа-2b

Дата анализа	Относительное время удерживания							
	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5	Пик 6	Пик 7	Пик 8
02.2016	0,63	0,75	0,93	–	1,03	1,04	1,41	1,56
03.2018	0,63	0,76	0,93	–	1,03	1,04	1,41	1,56
07.2018	0,63	0,75	0,92	–	1,03	1,04	1,41	1,56
12.2018	0,60	0,74	0,91	–	1,03	1,04	1,44	1,60
05.2020	0,59	0,73	0,91	–	1,03	1,04	1,45	1,61
Аттестованная характеристика	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

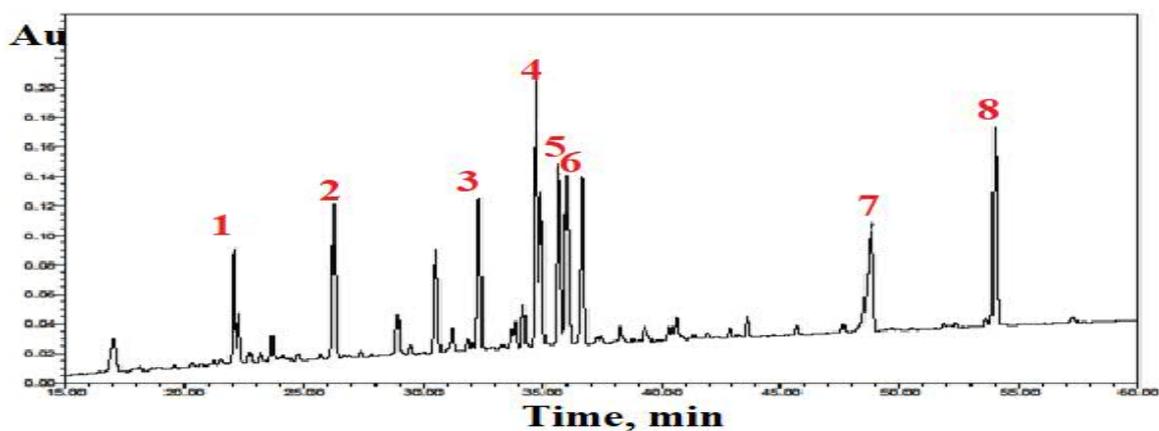


Рисунок 16 – Пептидная карта ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (2016 год)

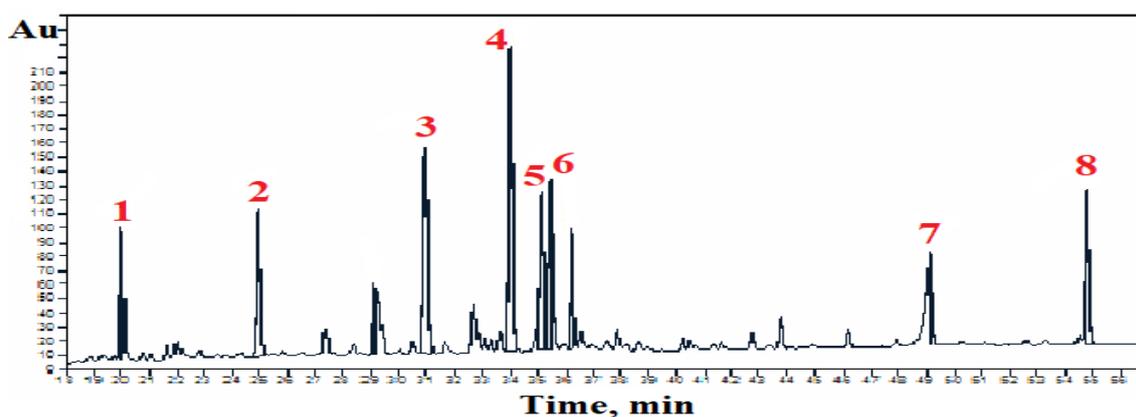


Рисунок 17 – Пептидная карта ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (2020 год)

Как следует из таблиц 14 и 15, в течение трех лет абсолютное и относительное время удерживания характеристических пиков соответствовало аттестованному диапазону, что является свидетельством его стабильности в течение вышеуказанного времени.

Проведенные эксперименты показали, что по истечении трех лет наблюдалось отсутствие пиков в диапазоне 20,74-24,22 мин и 25,36-28,46 мин, но при этом появлялись пики со временем удерживания 20,34 мин и 24,92 мин. Также относительное время удерживания 7 и 8 пика по истечении трех лет не соответствовало аттестованному диапазону.

Кроме того, на пептидной карте, полученной в мае 2020 года, в диапазоне 28–30 мин наблюдалось появление кластерных пиков, отсутствующих на хроматограмме 2016 года (Рисунки 16, 17).

Следовательно, в ходе экспериментального исследования стабильности разработанного ФСО установили срок годности данного ФСО – 2 года, в течение которого профиль пептидной карты и время удерживания характеристических пиков стабильно и количество окисленных примесей соответствует нормативным требованиям.

2.4. Резюме

В ходе проведенного исследования нами был разработан ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования, а именно:

- разработаны требования к кандидату в ФСО рЧИФН альфа-2b:
 - более полная оценка качества в соответствии с международными требованиями; соответствие требованиям разработанной спецификации, включающей показатели спецификации на субстанцию, за исключением раздела «Упаковка», и анализ аминокислотной последовательности молекулы методом масс-спектрометрии с покрытием не менее 95%;
- в качестве кандидата в ФСО на основании теоретического анализа спектра методов, используемых для оценки качества субстанций, выбрана метиониновая субстанция, более полно охарактеризованная в соответствии с международными требованиями;
- изменена концентрация рЧИФН альфа-2b (концентрация белка составила 1,0 мг/мл вместо исходной 2,5 мг/мл) и выбрана форма

- выпуска ФСО (замороженный раствор в стерильных полипропиленовых криопробирках, объем розлива 0,5 мл);
- проведена оценка качества ФСО в соответствии с разработанной спецификацией, включая подтверждение аминокислотной последовательности молекулы ФСО (покрытие 100%) и подтверждение наличия дисульфидных связей методом масс-спектрометрии;
 - установлена аттестованная характеристика ФСО в виде абсолютного времени удерживания четвертого пика (пика с максимальной интенсивностью) 33,8–37,0 мин, относительное время 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;
 - экспериментально обоснован срок годности разработанного ФСО (2 года) на основании результатов исследования стабильности;
 - разработана сопроводительная документация на ФСО: паспорт, макеты этикеток и инструкция по применению ФСО, содержащая описание методики его применения;
 - показана возможность применения данного ФСО для оценки подлинности метиониновых субстанций разных производителей.

ГЛАВА 3. Разработка фармакопейного стандартного образца рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования

3.1. Разработка требований к кандидату в фармакопейный стандартный образец рекомбинантного интерферона бета-1b, выбор кандидата в стандартный образец и его формы выпуска, оценка его качества

В Российской Федерации зарегистрированы две субстанции рчИФН бета-1b отечественного производства. Данный подтип рчИФН стабилен в кислой среде, так как в его молекуле, в отличие от рчИФН бета-1a, отсутствуют гликаны. В связи с этим одна отечественная субстанция представляет собой рчИФН бета-1b в ацетатном буферном растворе (рН 3,7–4,3), другая субстанция – раствор рчИФН бета-1b со стабилизатором белковой природы (человеческий сывороточный альбумин - ЧСА) для поддержания стабильности молекулы рчИФН бета-1b при рН 7,1–7,8, который является более предпочтительным для 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 НД указанных субстанций отсутствует подтверждение подлинности молекулы рчИФН бета-1b методом пептидного картирования. Кроме того, в составе одной из них наличие ЧСА является мешающим фактором при пептидном картировании, поскольку молекула стабилизатора белковой природы подвергается ферментативному гидролизу одновременно с основным действующим веществом белковой природы фармацевтической субстанции (рчИФН бета-1b), что оказывает влияние на профиль пептидной карты анализируемого рекомбинантного белка (рчИФН бета-1b) и препятствует интерпретации результатов при оценке его подлинности.

В связи с этим нами были разработаны требования к ФСО рчИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования:

- отсутствие вспомогательных веществ белковой природы, влияющих на профиль пептидной карты;
- стабильность раствора ФСО;
- соответствие требованиям спецификации на субстанцию за исключением показателей, изменяемых направленно (например, формы выпуска, рН и т.д.);
- соответствие аминокислотной последовательности молекулы известным данным (не менее 95%) [29].

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 - ЧСА. Для обеспечения стабильности раствора рчИФН бета-1b при отсутствии белкового стабилизатора, полупродукт разбавляли в глициновом буфере (рН 3,0), содержащем трегалозу (50 мг/мл) и полисорбат 80 (0,05 мг/мл). Водородный показатель доводили 2М раствором хлористоводородной кислоты до значения рН 3,0 - 3,5, конечное содержание рчИФН бета-1b составляло 0,25 мг/мл. Полученный раствор разливали по 1 мл во флаконы формата 2R из стекла I гидролитического класса (ООО «ШОТТ Фармасьютикал Пэккэджинг», Россия), прикрывали бромбутиловыми пробками и лиофилизировали в камере лиофильной установки («Labconco», США) в следующих условиях: флаконы замораживали в морозильной камере при температуре минус 70 °С в течение 8 ч, затем проводили первичную сушку в течение 24 ч при температуре плиты сублиматора 30 °С, вакууме от 7 до 10 Па и скорости повышения температуры около 2 °С/ч, досушивание (вторичную сушку) проводили в течение 4 ч до конечной температуры продукта 25 °С. Лيوфилизированные образцы после высушивания имели вид хорошо сформированной таблетки белого цвета, плотно прилегающей к стеклу. 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 8).

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 шестнадцать показателей качества и позволяющая наиболее полно охарактеризовать ФСО. В соответствии с разработанной нами спецификацией мы изучили качество кандидата в ФСО рЧИФН бета-1b. Результаты оценки качества представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты оценки качества кандидата в ФСО рЧИФН бета-1b

Наименование показателей	Метод испытания	Требования НД	Результаты испытания
Описание	Визуальный	Аморфная масса от белого до слегка желтоватого цвета. После восстановления прозрачный или опалесцирующий, бесцветный или слегка желтоватого цвета раствор	Аморфная масса белого цвета. После восстановления – прозрачный, бесцветный раствор
Время растворения	Визуальный, хронометрический	Не более 5 мин. Допускается легкое вспенивание	4 мин

Продолжение таблицы 16

Подлинность	Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях	Основная полоса интерферона бета-1b должна соответствовать молекулярной массе $18,5 \pm 1,5$ кДа	Соответствует
Прозрачность	Визуальный	Должен быть прозрачным или не превышать эталон сравнения III	Соответствует
Цветность	Визуальный	Должен быть бесцветным или не превышать эталон B6	Соответствует
pH раствора	Потенциометрический или индикаторный	3,0-3,5	3,25
Бактериальные эндотоксины	Гель-тромб тест с ЛАЛ реактивом	Не более 28 ЕЭ/мг ИФН бета-1b	Менее 1 ЕЭ/мг ИФН бета-1b
Хроматографическая чистота. Олигомеры и фрагменты молекул	ВЭЖХ эксклюзионная	Не более 5% суммарно	1%
Родственные примеси. Дезамидированные формы	ВЭЖХ обращенно-фазовая	Не более 8%	6%
Количественное определение. Интерферон бета-1b	Спектрофотометрический	0,22-0,28 мг/мл	0,24 мг/мл
Специфическая активность	Биологический	Не менее 4 млн МЕ/мл	8,2 млн МЕ/мл
Микробиологическая чистота	Биологический	Категория 5.2.Б.	Соответствует
Остаточные белки клеток-хозяина	ИФА	Не более 200 нг/мг ИФН бета-1b	3,1 нг/мг ИФН бета-1b
Остаточная ДНК штамма-продуцента	Метод молекулярной гибридизации	Не более 40 пг/мг ИФН бета-1b	1,78 пг/мг ИФН бета-1b
Маркировка	Визуальный	В соответствии со Спецификацией №ОКК-СПЦ-710-01	Соответствует
Упаковка	Визуальный	В соответствии со Спецификацией №ОКК-СПЦ-710-01	По 0,25 мг интерферона бета-1b в стеклянных флаконах, закупоренных пробками резиновыми с обкаткой колпачками алюминиевопластиковыми

В связи с тем, что кандидат в ФСО предназначен для оценки подлинности первичной структуры вновь выпускаемых серий субстанций рчИФН бета-1b и является образцом сравнения, мы проанализировали аминокислотную последовательность молекулы кандидата в ФСО с помощью метода масс-спектрометрии высокого разрешения. 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 [29].

Таким образом, разработка ФСО рчИФН бета-1b заключалась в разработке нами требований к кандидату в ФСО, выборе кандидата в ФСО и его формы выпуска, оценке качества в соответствии с разработанной нами спецификацией, включающей подтверждение структуры (более 97%-ной характеристике аминокислотной последовательности) и положения дисульфидной связи методом масс-спектрометрии.

3.2. Разработка и валидация методики пептидного картирования рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры

РчИФН бета-1a и бета-1b имеют ряд существенных структурных различий в силу особенностей технологий 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 необходим подбор фермента для гидролиза рЧИФН бета-1b, способного гидролизовать белок в условиях, в которых он стабилен, а также подбор условий гидролиза (состав буферного раствора, pH 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 два фермента (пепсин и эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8), рекомендованные Монографией Европейской Фармакопеи 01/2010:20255 «Peptide mapping» и способные гидролизовать белок в кислой среде (в условиях, при которых рЧИФН бета-1b стабилен и не подвергается денатурации). Для пепсина характерен неспецифический гидролиз при $\text{pH} \leq 6$. Для эндопротеиназы Glu-C характерен специфический гидролиз (расщепление пептидных связей молекулы белка после остатков глутаминовой кислоты) при $\text{pH} 4,0-9,0$.

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-1b, 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 в результате ферментативного гидролиза белка, с оптимальным разрешением пиков на пептидной карте [71, 73, 87].

При изучении возможности использования пепсина для стадии гидролиза рЧИФН бета-1b в исследование включали образец 6 (Образец 6 - рЧИФН бета-1b, субстанция, не содержащая стабилизаторы белковой природы; производитель ЗАО «Биокад»). Для поддержания pH среды во время гидролиза выбрали раствор соляной кислоты (pH 2,0).

При проведении гидролиза к 50 мкл образца 6 добавляли 6 мкл раствора пепсина (концентрация 0,5 мкг/мкл) и 17 мкл раствора соляной кислоты (pH 2,0), перемешивали и выдерживали в термостате 18 ч при 37°C. Далее добавляли 0,2 мл раствора гуанидина гидрохлорида (концентрация 6 моль/л) и 7 мкл раствора дитиотреитола (концентрация 2 моль/л), перемешивали и выдерживали в термостате 1 мин при 100°C. Далее испытуемый образец охлаждали до 2-8°C и использовали для хроматографического разделения пептидов, полученных в результате гидролиза. В качестве контрольного раствора использовали ацетатный буферный раствор (pH 4,0) после обработки пепсином аналогично образцу 6 для оценки вероятности аутогидролиза пепсина. Полученные пептидные карты представлены на рисунках 18 и 19.

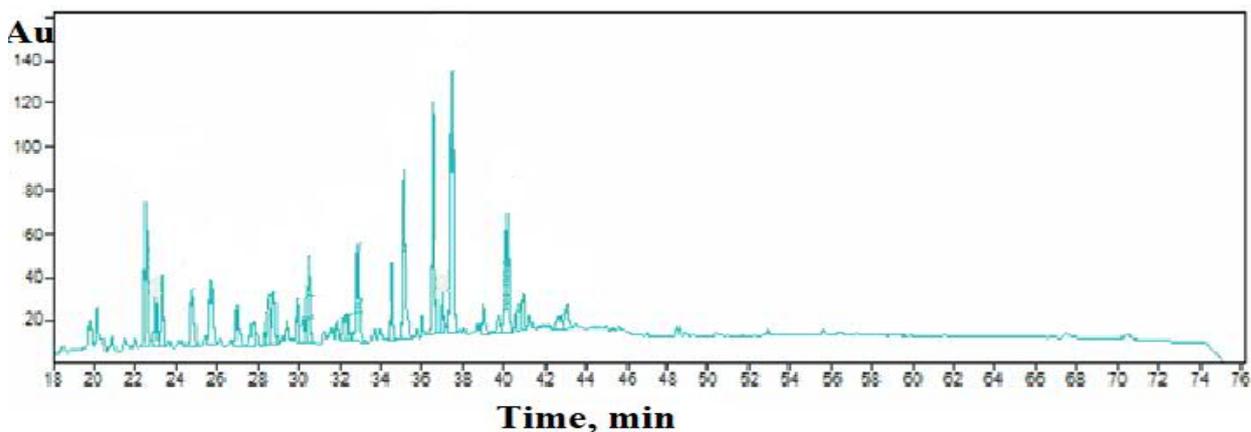


Рисунок 18 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент - пепсин

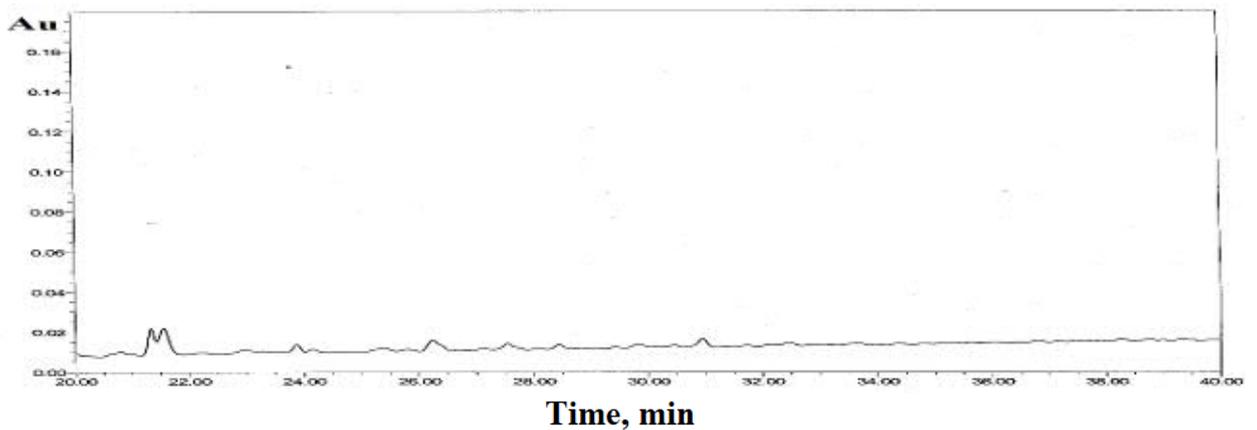


Рисунок 19 – Пептидная карта контрольного раствора. Используемый фермент – пепсин

Как можно заметить на рисунках 18 и 19, при использовании пепсина для гидролиза рЧИФН бета-1b в вышеуказанных условиях наблюдался полный гидролиз белка с образованием слишком большого количества пептидов вследствие неспецифического действия фермента, при этом фермент не подвергался аутогидролизу, так как пики на хроматограмме, полученной при обработке контрольного раствора, отсутствуют. В связи с этим профиль пептидной карты, представленный на рисунке 18, не характеризуется уникальностью и специфичностью, и, следовательно, пепсин при оценке подлинности рЧИФН бета-1b методом пептидного катирования не может быть использован.

На следующем этапе работы мы изучили возможность использования фермента «эндопротеиназа Glu-C» для пептидного картирования рЧИФН бета-1b. При разработке условий гидролиза рЧИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-C» мы выбрали ацетатный буферный раствор для создания необходимого pH реакционной среды. Состав выбранного нами ацетатного буферного раствора (ГОСТ 4919.2 – 77) аналогичен составу буферного раствора образца 6, представленному в таблице 17.

Таблица 17 – Состав субстанции рЧИФН бета-1b производства ЗАО «Биокад», не содержащей стабилизаторы белковой природы (образец 6)

Действующие и вспомогательные вещества	Количество в 1 мл субстанции
рЧИФН бета-1b	Не менее 0,3 мг
Натрия ацетат тригидрат	0,408 мг

Продолжение таблицы 17

Уксусная кислота ледяная	До рН 4,0
Вода для инъекций	До 1 мл

Образец 6 концентрировали до содержания рЧИФН бета-1b 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.

50 мкл сконцентрированного испытуемого образца 6 (концентрация белка около 0,6 мг/мл) помещали в пробирку, прибавляли 3 мкл раствора Endoproteinase Glu-C и 20 мкл ацетатного буферного раствора (рН 4,0; 4,2; 4,3; 4,5; 4,54; 4,57), перемешивали и помещали в термостат при температуре 37 °С. Через 18 ч прибавляли 0,2 мл 6М раствора гуанидина гидрохлорида, перемешивали и прибавляли 0,007 мл 2М раствора дитиотреитола. Перемешивали и помещали пробирку в термостат при температуре 100 °С на 1 минуту и затем охлаждали до температуры 2– 8 °С. Вероятность аутогидролиза эндопротеиназы Glu-C оценивали путем анализа контрольной пептидной карты, полученной при обработке эндопротеиназой Glu-C контрольного раствора - ацетатного буферного раствора (Рисунок 20). Образцы, полученные в результате гидролиза, использовали при проведении хроматографического разделения (Рисунок 21–26).

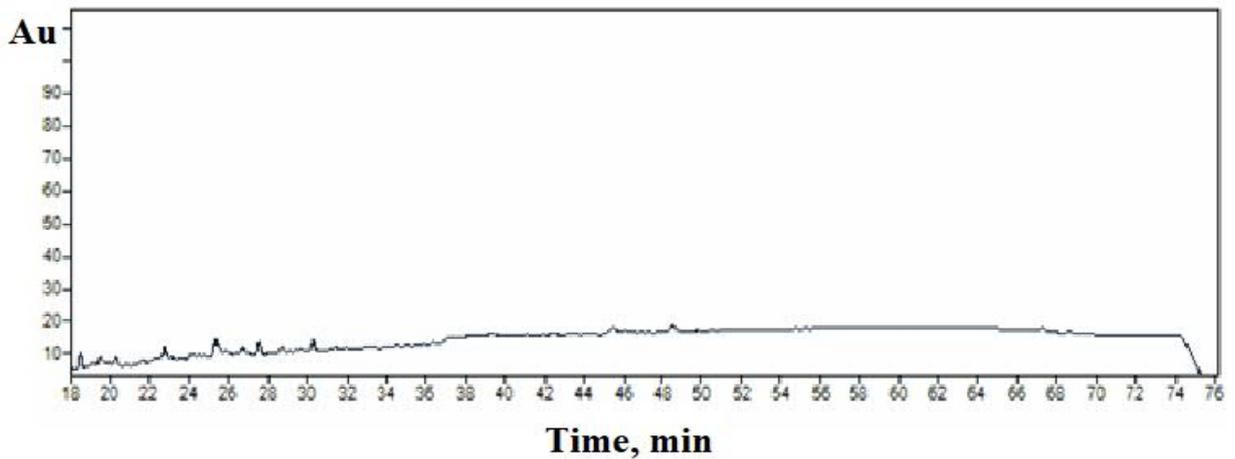


Рисунок 20 - Пептидная карта контрольного раствора. Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C

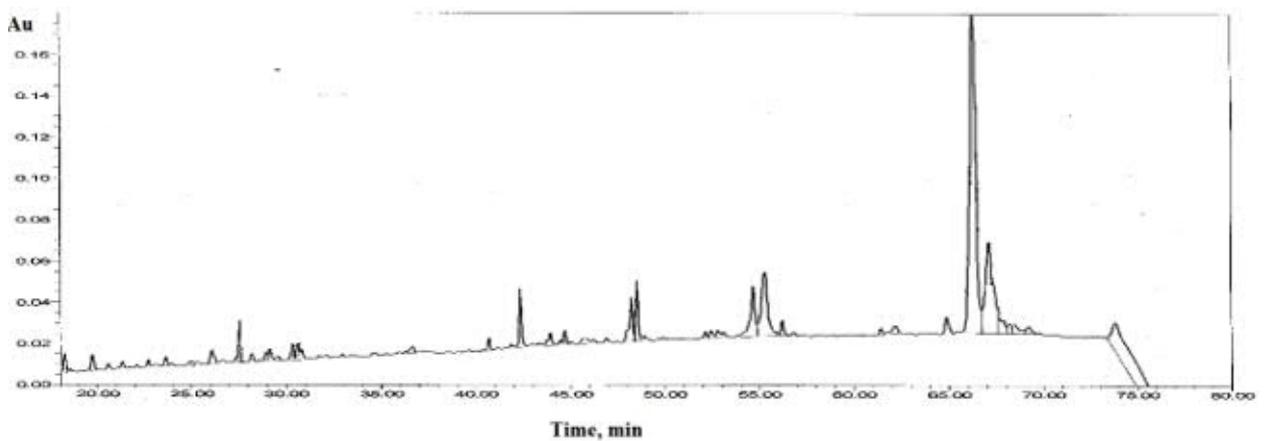


Рисунок 21- Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,0)

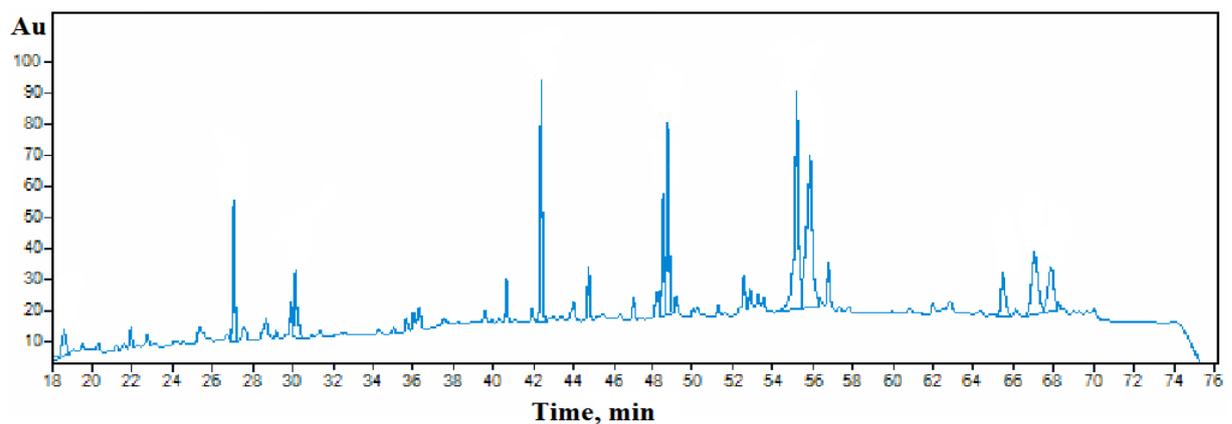


Рисунок 22 - Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,2)

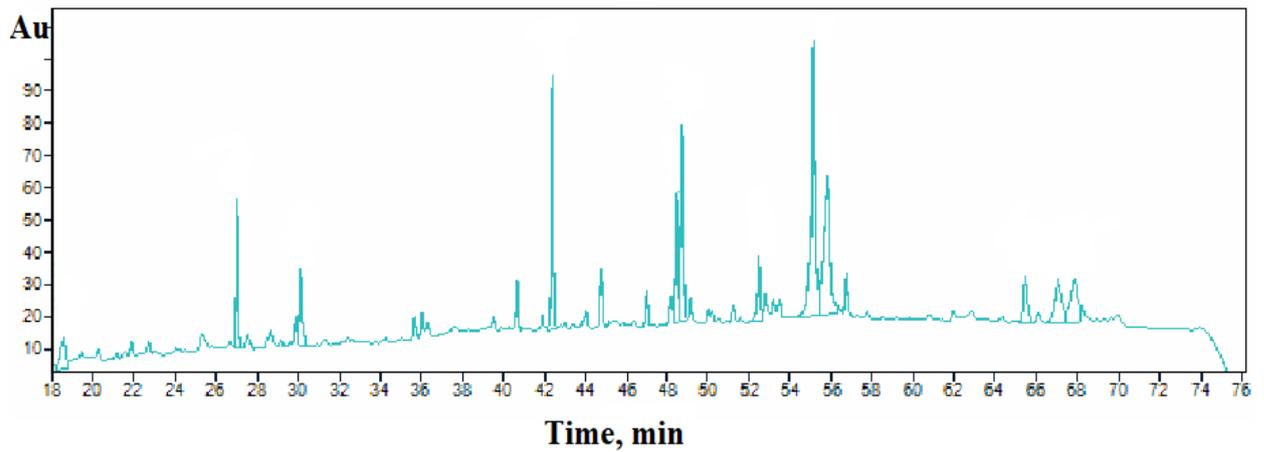


Рисунок 23 - Пептидная карта рчИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,3)

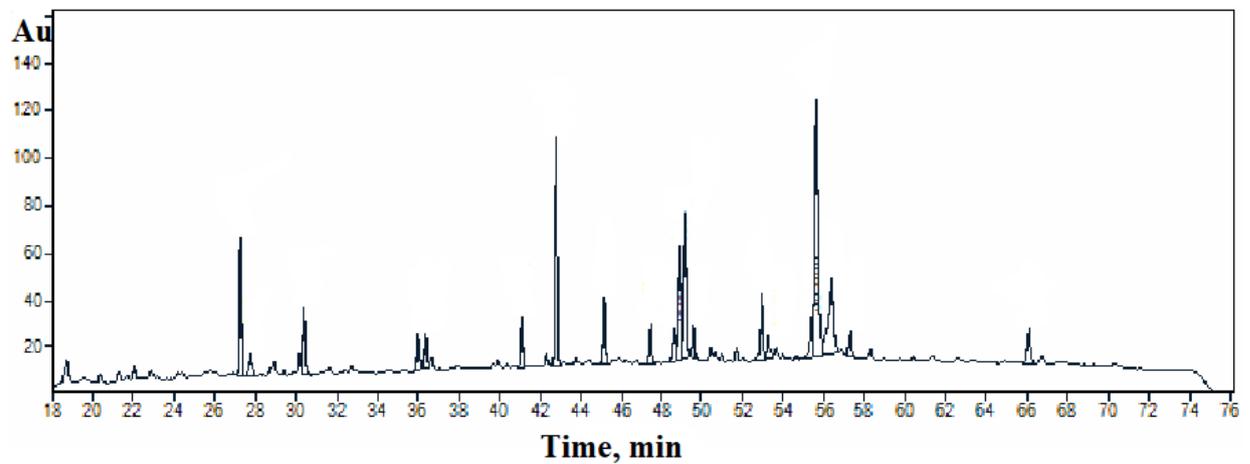


Рисунок 24 – Пептидная карта рчИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,50)

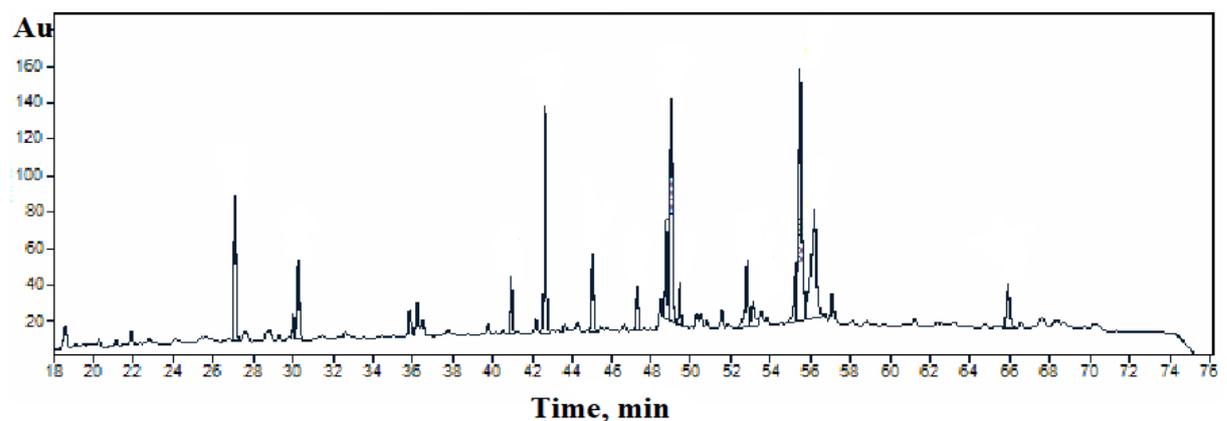


Рисунок 25 – Пептидная карта рчИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,54)

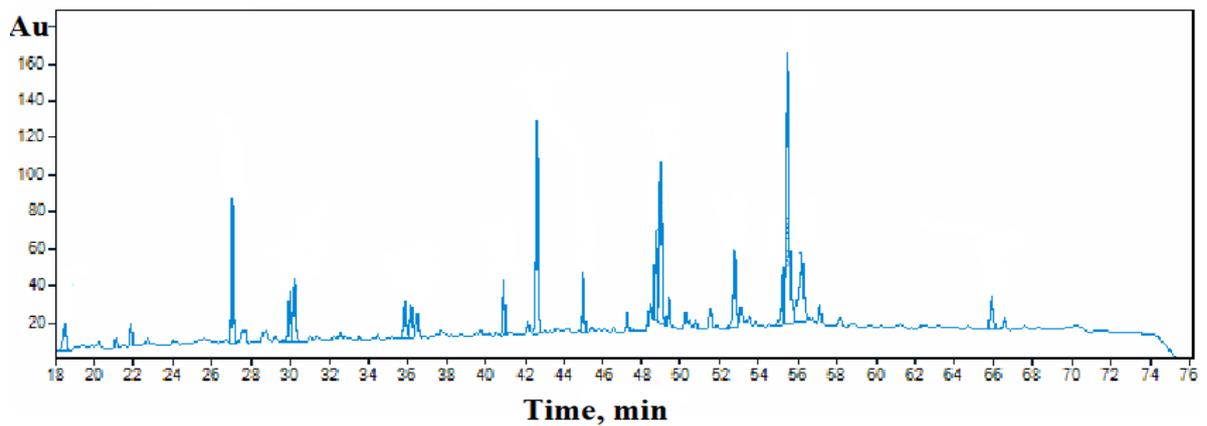


Рисунок 26 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 6). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (рН 4,57)

Как можно заметить на рисунке 20, пики на хроматограмме, которую получили при обработке контрольного раствора эндопротеиназой Glu-C, отсутствуют. В связи с этим можно сделать вывод о том, что аутогидролиз фермента в разработанных нами условиях отсутствует, и, следовательно, данный фермент белковой природы не оказывает влияния на профиль пептидной карты рЧИФН бета-1b.

На пептидных картах, представленных на рисунках 21, 22 и 23, в диапазоне 63-70 мин присутствуют кластерные пики, свидетельствующие о том, что при рН 4,0–4,3 наблюдается недостаточная степень гидролиза молекулы рЧИФН бета-1b.

На пептидных картах, представленных на рисунках 24, 25 и 26 кластерные пики в диапазоне 63-70 мин отсутствуют и, следовательно, молекула рЧИФН бета-1b гидролизуется полностью при рН 4,50-4,57. При этом хроматограммы, полученные в диапазоне рН 4,50-4,57, стабильны, наблюдаются хорошо разрешенные пики с разной интенсивностью, являющиеся следствием специфического действия фермента.

Также нами были получены хроматограммы с применением эндопротеиназы Glu-C при рН 4,50; 4,54 и 4,57 для образцов 7 и 8. Образец 7 концентрировали с применением центрифужных фильтров до содержания рЧИФН бета-1b около 0,6 мг/мл (процедура концентрирования образца 7 аналогична процедуре концентрирования образца 6). Образец 8 растворили в

воде (концентрация полученного раствора около 0,6 мг/мл). (Рисунки 27 – 32).

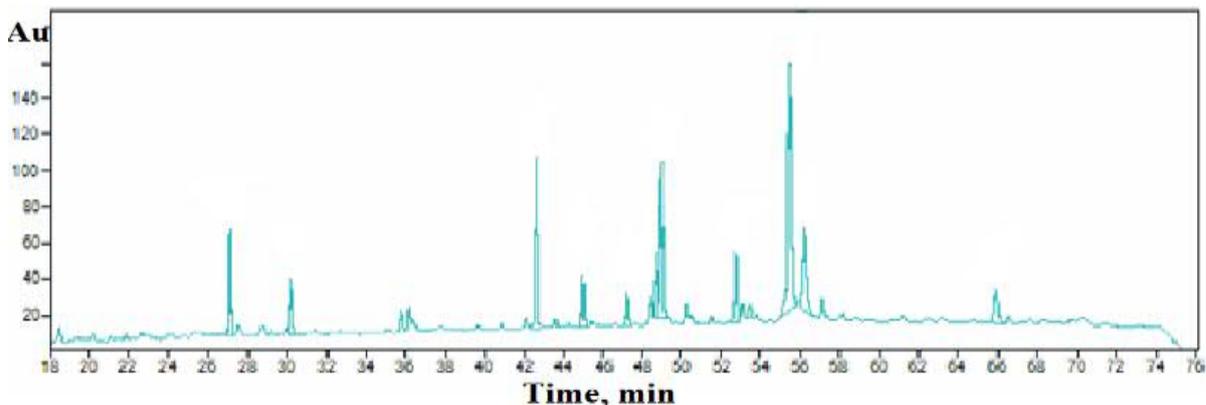


Рисунок 27 - Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 7). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,50)

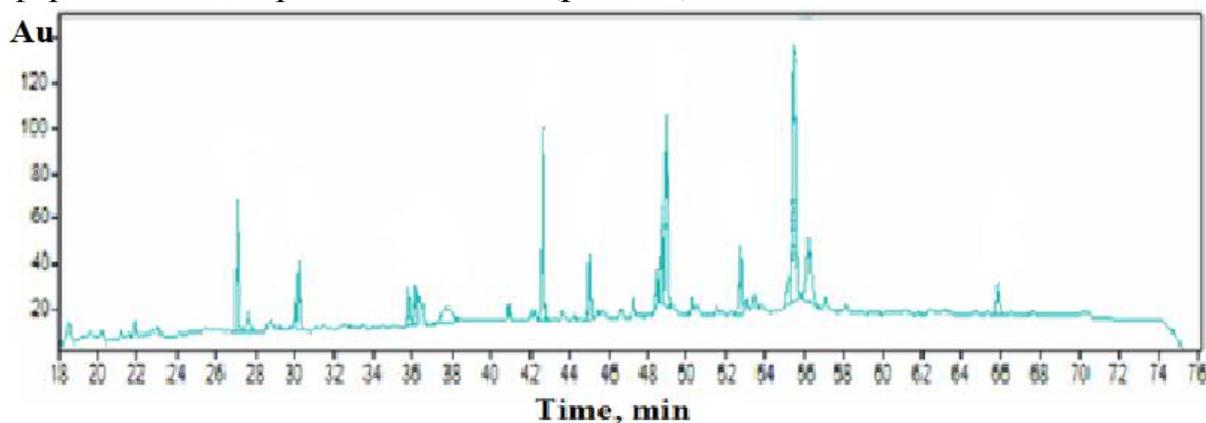


Рисунок 28 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 7). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,54)

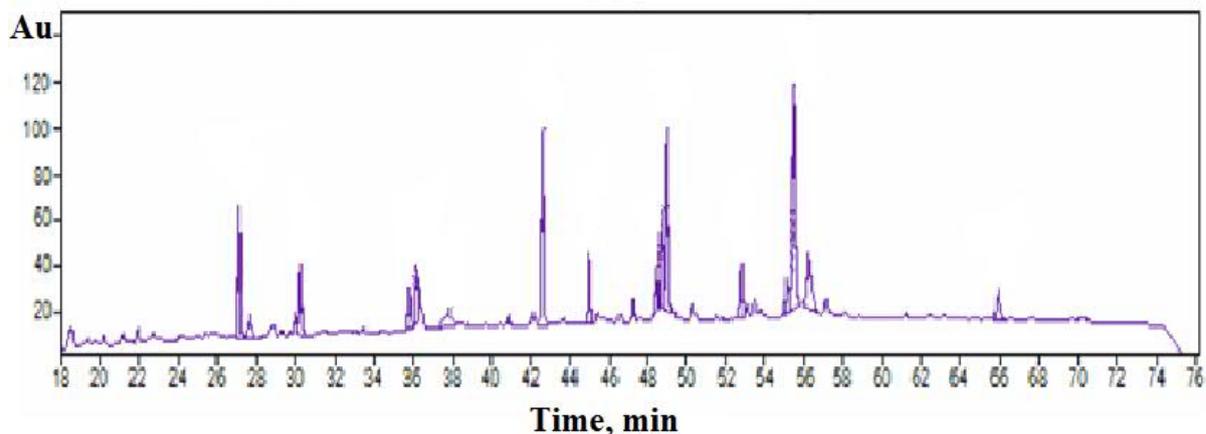


Рисунок 29 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 7). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,57)

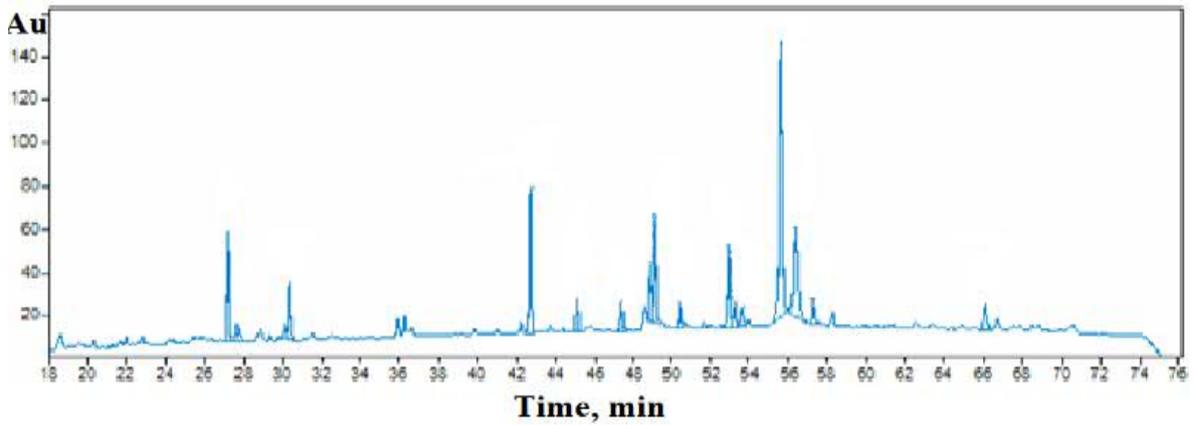


Рисунок 30 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 8). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,50)

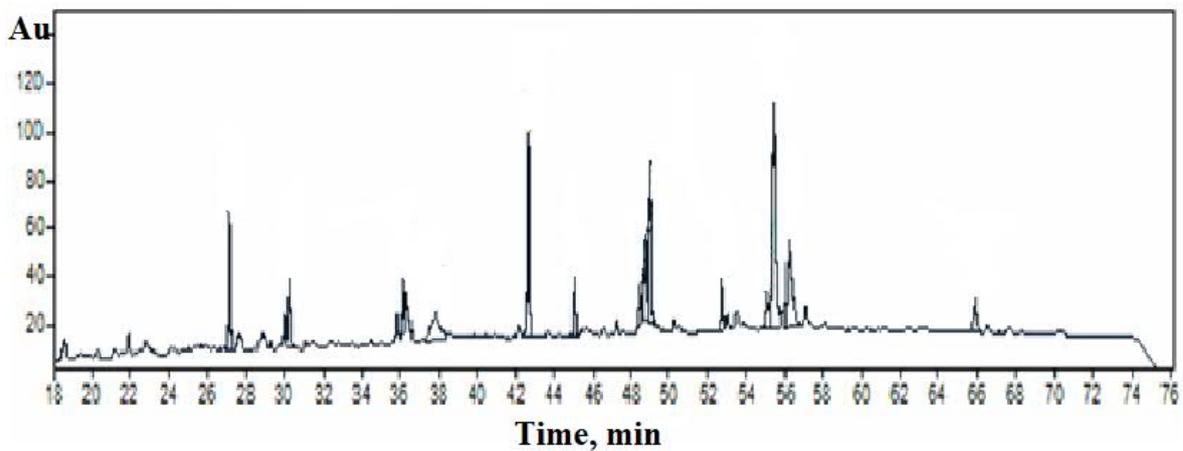


Рисунок 31 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 8). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,54)

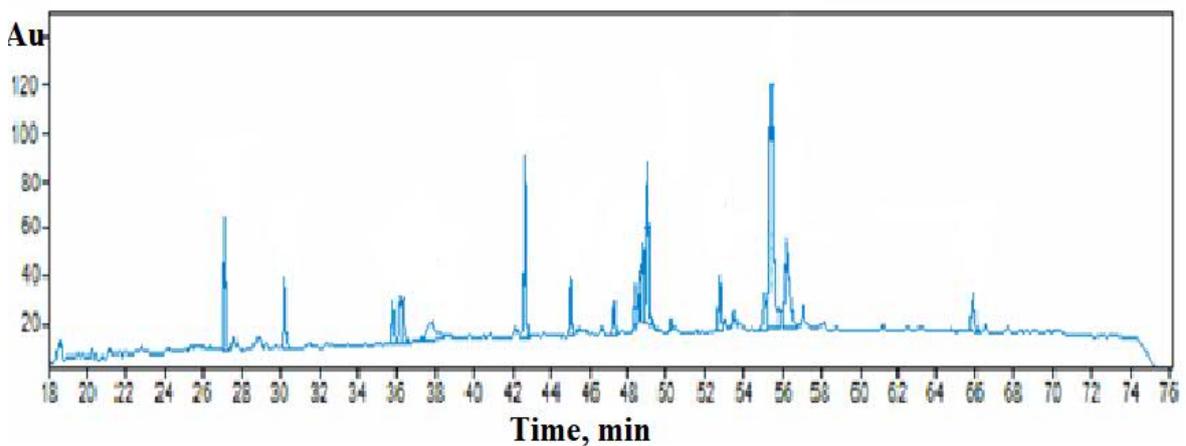


Рисунок 32 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (образец 8). Используемый фермент – эндопротеиназа Glu-C (pH 4,57)

На рисунках 24-32 наблюдаются стабильные идентичные пептидные карты, полученные в диапазоне рН 4,50-4,57 для образцов разных производителей. Незначительным отличием является область 39-42 мин (на пептидной карте образца 6 в данной области присутствует минорный пик, в отличие от пептидных карт образцов 7 и 8) и профиль кластерных областей в интервалах 47-50 мин и 52-54 мин.

Для экспериментального доказательства того, что методика пригодна для подтверждения подлинности первичной структуры данного белка нами были проведены эксперименты по валидации методики. Валидацию проводили в два этапа, при этом проводили оценку специфичности и прецизионности разработанной нами методики [7].

На первом этапе изучили специфичность разработанной методики. Для оценки специфичности получили хроматограммы для каждого образца рЧИФН бета-1b разных производителей, не содержащих стабилизаторы белковой природы, и хроматограмма контрольного раствора (Рисунок 33-36).

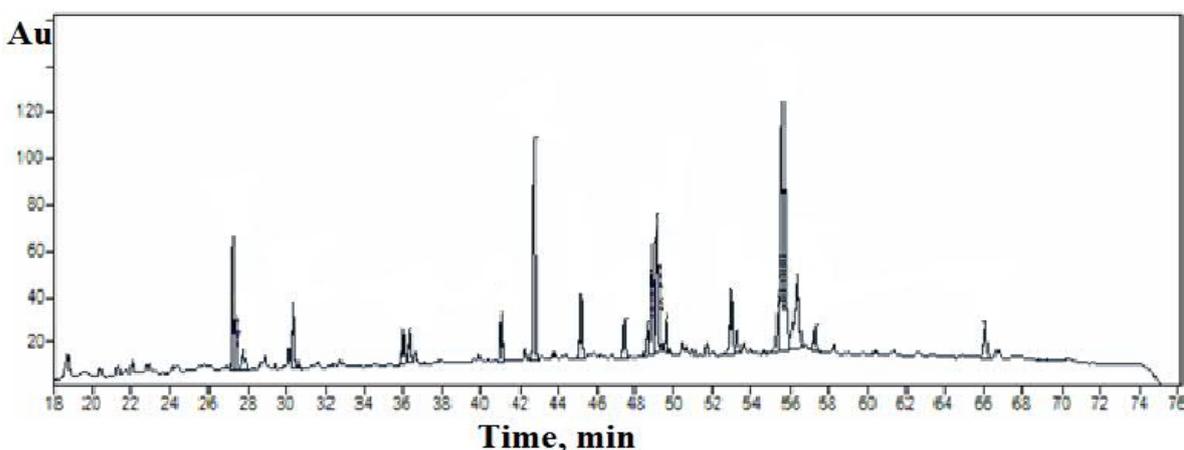


Рисунок 33 – Пептидная карта рЧИФН бета-1b (Образец 6 - РЧИФН бета-1b, субстанция, не содержащая стабилизаторы белковой природы. Производитель ЗАО «Биокад», Россия)

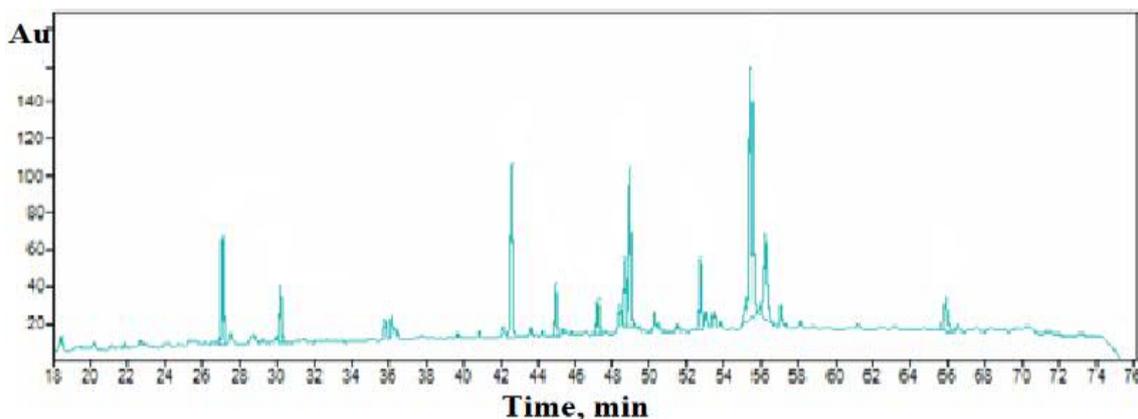


Рисунок 34 – Пептидная карта рчИФН бета-1b (Образец 7 - раствор рчИФН бета-1b, отобранный на промежуточной стадии производства субстанции до добавления стабилизаторов белковой природы. Производитель АО «Генериум», Россия)

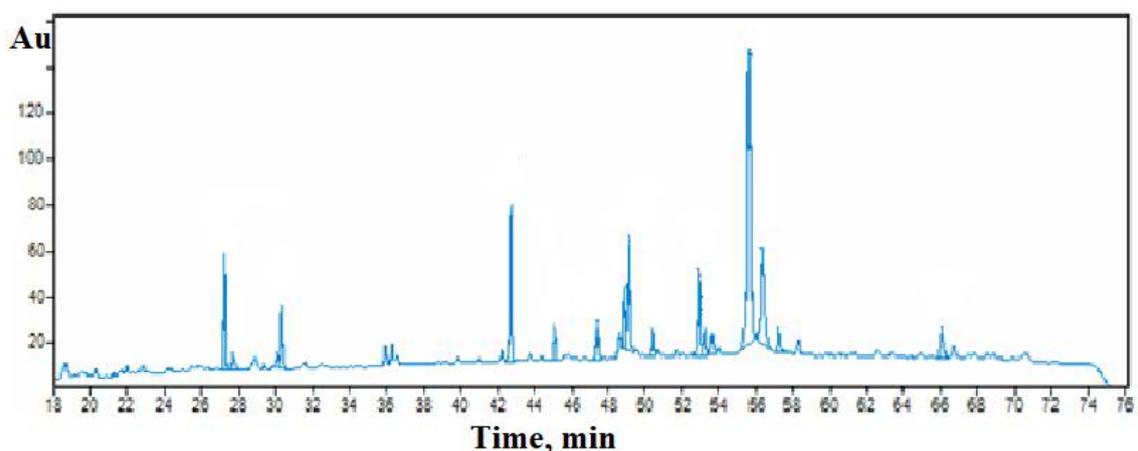


Рисунок 35 – Пептидная карта рчИФН бета-1b (Образец 8 - лиофилизат раствора рчИФН бета-1b, отобранного на промежуточной стадии производства субстанции до добавления стабилизаторов белковой природы. Производитель АО «Генериум», Россия)

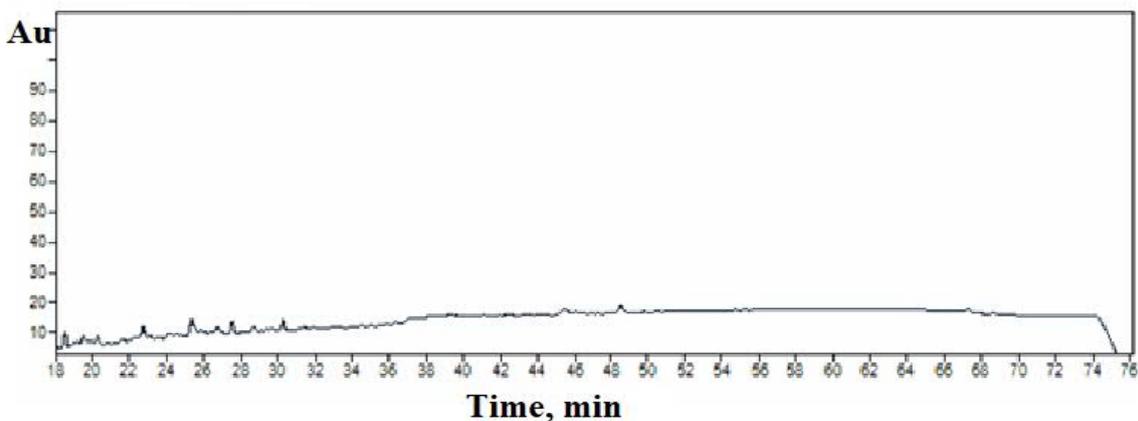


Рисунок 36 – Пептидная карта контрольного раствора

Как можно заметить на рисунках 33-36, пептидные карты образцов разных отечественных производителей идентичны за исключением минорных пиков (пик со временем удерживания около 41 мин присутствует на хроматограмме образца 6 и отсутствует на хроматограмме образцов 7 и 8; различаются кластерные области в интервале 48-50 мин и 52-54 мин). Аутогидролиз фермента не наблюдался, так как отсутствуют пики на контрольной хроматограмме.

На полученных пептидных картах для образца 6, образца 7 и образца 8 наблюдали семь пиков с высокой интенсивностью и хорошим разрешением, которые нами были выбраны в качестве основных и пронумерованы на хроматограмме (Рисунок 37).

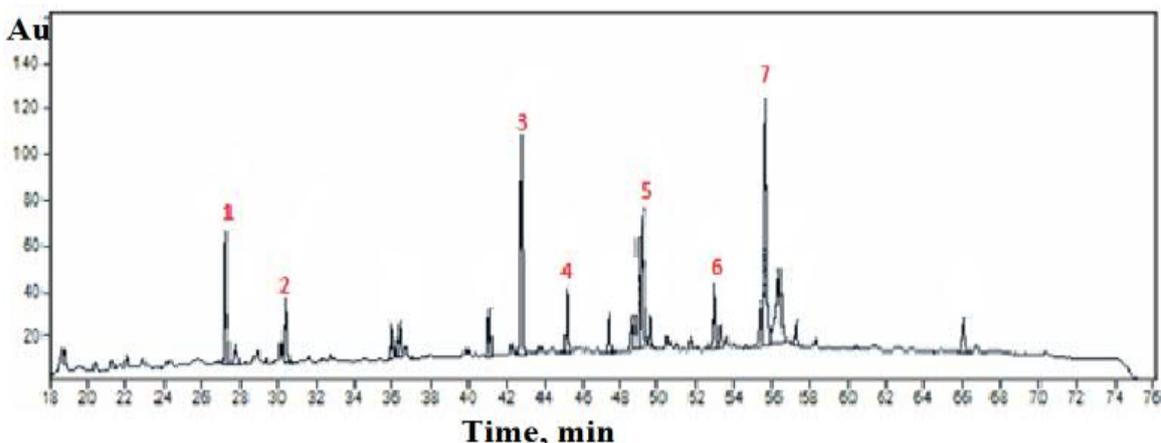


Рисунок 37 – Типичная пептидная карта рЧИФН бета-1b

Далее оценили стабильность абсолютного времени удерживания выбранных нами пиков на типичной пептидной карте рЧИФН бета-1b, получаемой при использовании фермента эндопротеиназа Glu-C и ацетатного буферного раствора для стадии гидролиза (Таблица 18).

Таблица 18 – Статистический анализ основных пиков на пептидной карте рЧИФН бета-1b (абсолютное время удерживания)

Наименование образца	Абсолютное время удерживания, мин						
	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5	Пик 6	Пик 7
Образец 6	27,23	30,35	42,76	45,14	49,11	52,88	55,56
	27,05	30,17	42,51	44,88	48,84	52,60	55,26
	27,06	30,22	42,62	44,99	48,93	52,73	55,40
	27,01	30,17	42,60	44,96	48,92	52,71	55,39
Образец 7	27,03	30,17	42,58	44,95	48,92	52,72	55,40
	27,06	30,17	42,53	44,89	48,84	52,61	55,26

Продолжение таблицы 18

	27,07	30,22	42,61	44,98	48,93	52,70	55,38
	27,08	30,21	42,59	44,96	48,91	52,73	55,40
Образец 8	27,17	30,30	42,73	45,11	49,10	52,89	55,56
	27,06	30,18	42,54	44,90	48,86	52,60	55,26
	27,10	30,23	42,62	44,99	48,93	52,72	55,39
	27,06	30,19	42,60	44,97	48,92	52,70	55,38
Среднее арифметическое (n=12)	27,08	30,21	42,61	44,98	48,93	52,71	55,39
S	0,06	0,05	0,07	0,08	0,08	0,09	0,09
RSD, %	0,22	0,18	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18

Как следует из данных, представленных в таблице 18, коэффициент вариации абсолютного времени удерживания каждого из пиков, рассчитанный на основании пептидных карт, которые мы получили для образцов разных производителей, не превышал 0,3%, что свидетельствовало о стабильности получаемых результатов.

Также нами было рассчитано относительное время удерживания основных пиков на пептидной карте рЧИФН бета-1b . Пик № 3 выбрали в качестве пика с установленным абсолютным временем удерживания на основании стабильности его выхода (коэффициент вариации 0,17%), интенсивности, высоком разрешении, факторе асимметрии (1,0) и данных масс-спектрометрического анализа аминокислотной последовательности каждого пептида (образец 8 – кандидат в ФСО), согласно которым основной пептид данной фракции состоит из 28 аминокислот – это наибольший пептид из тех, которые соответствуют пикам с максимальной интенсивностью на хроматограмме (Таблица 19, 20).

Таблица 19 – Относительное время удерживания основных пиков на пептидной карте рЧИФН бета-1b

Наименование образца	Относительное время удерживания					
	Пик 1	Пик 2	Пик 4	Пик 5	Пик 6	Пик 7
Образец 6	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
	0,63	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
	0,63	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
Образец 7	0,63	0,71	1,05	1,15	1,24	1,30

Продолжение таблицы 19

	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
Образец 8	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30
	0,64	0,71	1,06	1,15	1,24	1,30

Таблица 20 – Масс-спектрометрический анализ пептидов, представляющих фракции кандидата в ФСО

Пик	Фрагмент молекулы	Пептид
1	43-52	IKQLQQFQKE
2	53-60	DAALTIYE
3	109-136	DFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKE
4	149-165	ILRNFYFINRLTGYLRN
5	85-102	NLLANVYHQNHLKTVLE
6	1-42	SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIP EE
7	81-102	TIVENLLANVYHQNHLKTVLE

Следовательно, на основании данных, представленные в таблицах 18 и 19, можно сделать вывод о стабильности получаемых результатов при воспроизведении разработанной нами методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b. При этом в результате исследования аминокислотной последовательности получаемых в результате гидролиза пептидов было подтверждено 77% аминокислотной последовательности молекулы рЧИФН бета-1b (Таблица 20, Рисунок 38).

SYNLLGFLQR	SSNFQSQKLL	WQLNGRLEYC
LKDRMNFDIP	EEIKQLQQFQ	KEDAALTIYE
MLQNIFAIFR	QDSSSTGWNE	TIVENLLANV
YHQNHLKTV	LEEKLEKEDF	TRGKLMSSLH
LKRYYGRILH	YLKAKELYSHC	AWTIVRVEIL
RNFYFINRLT	GYLRN	

Рисунок 38 – Аминокислотная последовательность кандидата в ФСО рЧИФН бета-1b

Примечание: зеленым цветом обозначены идентифицированные фрагменты молекулы

Далее мы провели сравнительный анализ хроматограмм рЧИФН бета-1b (образец 8 – кандидат в ФСО) и рЧИФН бета-1a CRS. Пептидные карты,

полученные в результате одного хроматографического анализа, представлены на рисунках 39 и 40. Сравнение времени удерживания основных пиков представлено в таблице 21.

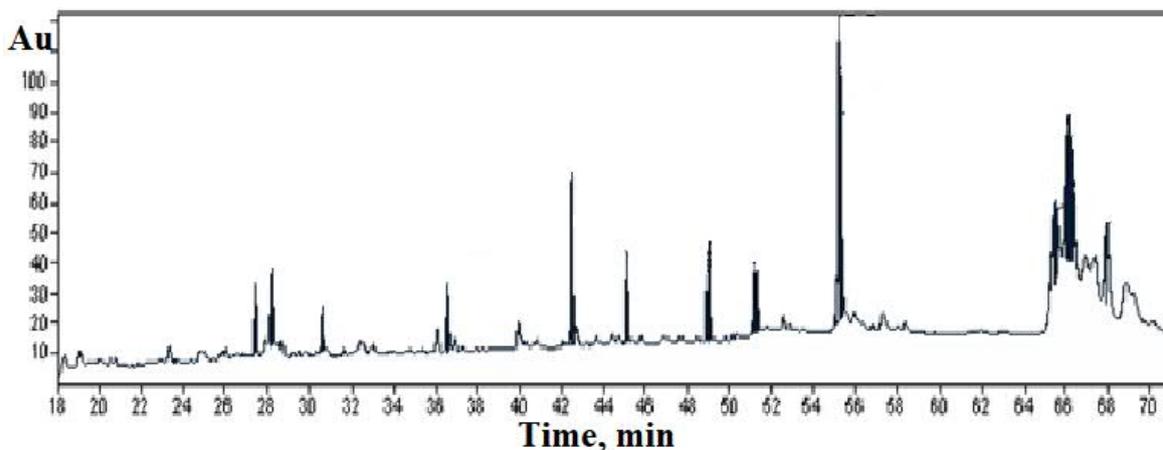


Рисунок 39 – Пептидная карта рчИФН бета-1а CRS

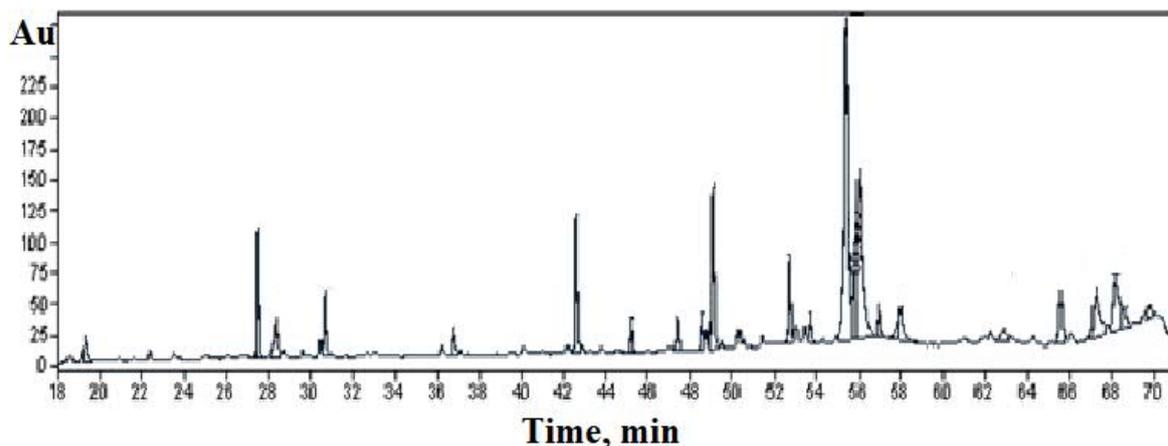


Рисунок 40 – Пептидная карта рчИФН бета-1b (образец 8)

Таблица 21 – Время удерживания пиков на пептидных картах рчИФН бета-1b и рчИФН бета-1а CRS

Пик	РчИФН бета-1а CRS, время удерживания (мин)	РчИФН бета-1b, время удерживания (мин)
1	27,390	27,439
2	30,589	30,677
3	42,434	42,540
4	45,026	45,130
5	48,899	49,013
6	51,224	52,682
7	55,170	55,334

На рисунках 39 и 40 можно заметить, что профили пептидных карт рчИФН бета-1b (образец 8) и рчИФН бета-1а CRS различаются в диапазоне

54,5 – 58 мин. При этом на хроматограмме рчИФН бета-1а CRS наблюдается значительное количество негидролизованного белка (кластерные пики в диапазоне 64 – 69 мин). Как следует из данных таблиц 20 и 21, на полученных хроматограммах время удерживания основных пиков рчИФН бета-1b практически совпадают с временами удерживания основных пиков рчИФН бета-1а CRS, кроме 6 пика, который характеризует N-конец молекулы (наличие или отсутствие метионина) и замену аминокислоты в 16(17) позиции.

Следовательно, представленные результаты подтверждают специфичность разработанной нами 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 (образец 8), с которым были проведены двадцать испытаний с применением четырех хроматографов. В результате анализа полученных пептидных карт выбрали 7 пиков со стабильным временем удерживания. Прецизионность оценивали по абсолютному и относительному времени удерживания пиков.

Результаты оценки прецизионности методики приведены в таблице 22 и таблице 23: абсолютное (RSD не превышает 2%) и относительное (RSD не превышает 2%) время удерживания каждого пика свидетельствуют 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.

Таблица 22 – Абсолютное время удерживания основных пиков на пептидной карте рЧИФН бета-1b (образец 8)

№ п. п.	Дата	Абс время удерживания 1 пика	Абс время удерживания 2 пика	Абс время удерживания 3 пика	Абс время удерживания 4 пика	Абс время удерживания 5 пика	Абс время удерживания 6 пика	Абс время удерживания 7 пика
1	06.08.2019	27,179	30,306	42,730	45,116	49,101	52,892	55,561
2	14.08.2019	27,068	30,182	42,542	44,902	48,862	52,608	55,267
3	21.08.2019	27,107	30,238	42,625	44,991	48,936	52,724	55,395
4	21.08.2019	27,063	30,199	42,609	44,973	48,924	52,703	55,388
5	24.09.2019	26,972	30,065	42,437	44,751	48,705	52,483	55,158
6	06.11.2019	27,015	30,095	42,510	44,805	48,788	52,547	55,256
7	07.05.2020	27,404	30,439	42,408	44,705	48,561	52,254	54,865
8	13.05.2020	27,393	30,438	42,462	44,757	48,617	52,331	54,950
9	13.05.2020	27,377	30,428	42,450	44,745	48,603	52,309	54,931
10	13.05.2020	27,373	30,419	42,444	44,738	48,597	52,304	54,922
11	14.05.2020	27,365	30,411	42,451	44,731	48,584	52,291	54,919
12	07.07.2020	27,433	30,542	42,908	45,061	48,974	52,572	55,399
13	07.07.2020	27,637	30,533	42,853	44,995	48,908	52,540	55,372
14	07.07.2020	27,648	30,538	42,859	45,001	48,917	52,558	55,391
15	18.07.2020	26,442	29,342	42,459	44,478	48,537	52,405	55,230
16	18.07.2020	26,360	29,250	42,310	44,360	48,370	52,220	55,040
17	25.07.2020	26,860	29,810	42,590	44,770	48,700	52,470	55,270
18	18.08.2020	26,575	29,378	42,446	44,301	48,298	52,297	54,967
19	25.08.2020	26,189	29,020	42,901	44,727	48,867	52,987	55,770
20	25.08.2020	26,261	29,047	42,863	44,677	48,826	52,929	55,707
Среднее время удерживания		27,036	30,034	42,593	44,779	48,734	52,521	55,238
S		0,453	0,527	0,191	0,219	0,211	0,232	0,268
RSD, %		1,68	1,75	0,45	0,49	0,43	0,44	0,49

Таблица 23 – Относительное время удерживания основных пиков на пептидной карте рЧИФН бета-1b (образец 8)

Дата	Относит время удерживания 1 пика	Относит время удерживания 2 пика	Абс время удерживания 3 пика	Относит время удерживания 4 пика	Относит время удерживания 5 пика	Относит время удерживания 6 пика	Относит время удерживания 7 пика
06.08.2019	0,636	0,71	42,730	1,06	1,15	1,24	1,30
14.08.2019	0,636	0,71	42,542	1,06	1,15	1,24	1,30
21.08.2019	0,636	0,71	42,625	1,06	1,15	1,24	1,30
21.08.2019	0,635	0,71	42,609	1,06	1,15	1,24	1,30
24.09.2019	0,636	0,71	42,437	1,05	1,15	1,24	1,30
06.11.2019	0,635	0,71	42,510	1,05	1,15	1,24	1,30
07.05.2020	0,646	0,72	42,408	1,05	1,15	1,23	1,29
13.05.2020	0,645	0,72	42,462	1,05	1,14	1,23	1,29
13.05.2020	0,645	0,72	42,450	1,05	1,14	1,23	1,29
13.05.2020	0,645	0,72	42,444	1,05	1,14	1,23	1,29
14.05.2020	0,645	0,72	42,451	1,05	1,14	1,23	1,29
07.07.2020	0,639	0,71	42,908	1,05	1,14	1,23	1,29
07.07.2020	0,645	0,71	42,853	1,05	1,14	1,23	1,29
07.07.2020	0,645	0,71	42,859	1,05	1,14	1,23	1,29
18.07.2020	0,623	0,69	42,459	1,05	1,14	1,23	1,30
18.07.2020	0,623	0,69	42,310	1,05	1,14	1,23	1,30
25.07.2020	0,631	0,70	42,590	1,05	1,14	1,23	1,30
18.08.2020	0,626	0,69	42,446	1,04	1,14	1,23	1,29
25.08.2020	0,610	0,68	42,901	1,04	1,14	1,24	1,30
25.08.2020	0,613	0,68	42,863	1,04	1,14	1,23	1,30
Среднее время удерживания	0,635	0,705	42,593	1,05	1,144	1,233	1,297
S	0,011	0,013	0,191	0,004	0,003	0,004	0,003
RSD, %	1,73	1,84	0,45	0,38	0,26	0,32	0,23

3.3. Установление аттестованной характеристики фармакопейного стандартного образца рекомбинантного интерферона бета-1b, разработка сопроводительной документации

Экспериментальные данные, полученные при оценке прецизионности разработанной методики пептидного картирования (описанной в п. 3.2.), использовали для установления неопределенности значений аттестованной характеристики ФСО рчИФН бета-1b [7, 35].

На основании результатов 20 испытаний, полученных в условиях воспроизводимости совместно с лабораторией АО «Генериум» (4 оператора, 2 лаборатории, 4 хроматографа), были рассчитаны диапазоны абсолютного и относительного времени удерживания характеристических пиков, представляющих собой аттестованную характеристику ФСО (Таблица 24).

Таблица 24 – Аттестованная характеристика ФСО рчИФН бета-1b

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

Как следует из данных, представленных в таблице 24, аттестованная характеристика представляет собой диапазон абсолютного времени удерживания основного пика 3 и диапазон относительного времени удерживания других шести пиков.

Таким образом, был разработан и аттестован ФСО 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.

Для ФСО рЧИФН бета-1b была составлена сопроводительная документация (инструкция по применению, паспорт, макеты этикеток) (Приложение 2). В инструкции по применению описана методика применения данного ФСО с указанием производителя и каталожного номера фермента, с которым проводилась аттестация.

Также на основании экспериментальных данных, представленных в таблицах 18 и 19, можно сделать вывод о том, что времена удерживания характеристических пиков, полученные для образцов рЧИФН бета-1b разных производителей (образец 6 и образец 7), соответствовали установленной аттестованной характеристике ФСО рЧИФН бета-1b (Таблица 24). Таким образом, экспериментально доказана возможность применения разработанного и аттестованного ФСО для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций рЧИФН бета-1b разных производителей.

3.4. Оценка стабильности фармакопейного стандартного образца рекомбинантного интерферона бета-1b и установление его срока годности

Для оценки стабильности ФСО рЧИФН бета-1b проводили анализ профилей пептидных карт, полученных в процессе длительного хранения ФСО. Результаты учитывали на основании соответствия абсолютного и относительного времени удерживания характеристических пиков, диапазонам, установленным в ходе аттестации. Результаты представлены в таблицах 25, 26.

Таблица 25 – Абсолютное время удерживания основного характеристического пика в процессе длительного хранения ФСО рЧИФН бета-1b

Дата анализа	Пик 3	
	Абсолютное время удерживания, мин	Аттестованная характеристика. Абсолютное время удерживания (диапазон), мин
11.2019	42,510	42,0 – 43,2
08.2020	42,863	
12.2020	42,540	
02.2021	42,371	
11.2021	42,817	

Таблица 26 – Относительное время удерживания характеристических пиков в процессе длительного хранения ФСО рчИФН бета-1b

Дата анализа	Относительное время удерживания						
	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5	Пик 6	Пик 7
11.2019	0,64	0,71	-	1,05	1,15	1,24	1,30
08.2020	0,61	0,68	-	1,04	1,14	1,23	1,30
12.2020	0,65	0,72	-	1,06	1,15	1,24	1,30
02.2021	0,64	0,72	-	1,06	1,15	1,24	1,30
11.2021	0,61	0,68	-	1,04	1,14	Отсутствует	1,30
Аттестованная характеристика	0,61-0,66	0,67-0,73	-	1,04-1,06	1,14-1,15	1,22-1,24	1,29-1,30

Как следует из таблиц 25 и 26, в течение двух лет абсолютное и относительное время удерживания характеристических пиков соответствовали аттестованному диапазону ФСО, что является свидетельством его стабильности в течение вышеуказанного времени, при этом профиль пептидной карты ФСО был стабилен и не изменился после двух лет хранения.

По истечении двух лет наблюдалось отсутствие пиков в диапазоне 51,5-53,5 мин. При этом появлялся пик со временем удерживания 25,421 мин. Кроме того, на пептидной карте, полученной в ноябре 2021 года, в диапазоне 55-58 мин наблюдалось изменение интенсивности и формы пиков (Рисунок 41, 42).

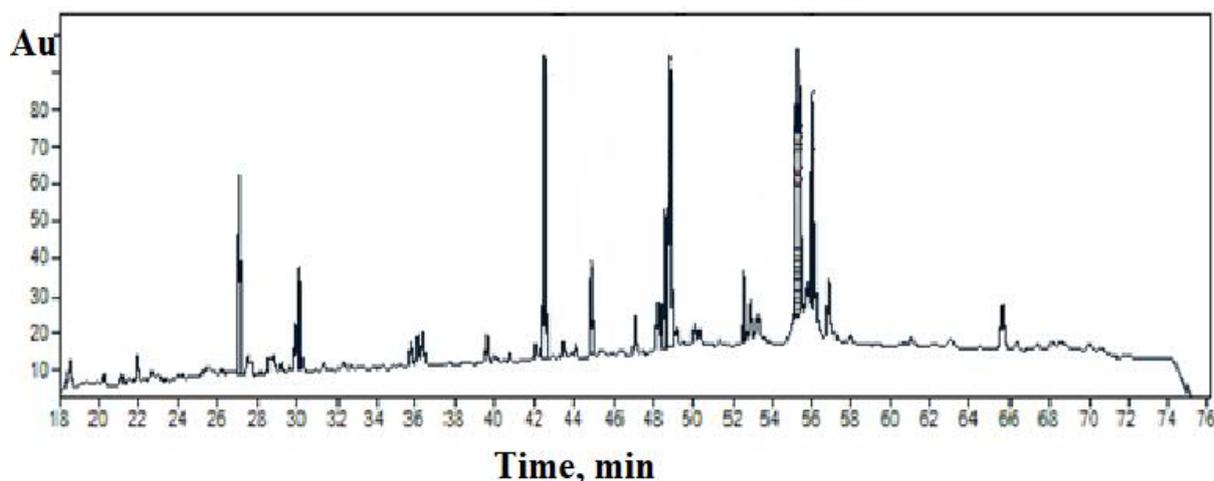


Рисунок 41 – Пептидная карта ФСО рчИФН бета-1b (ноябрь 2019 г.)

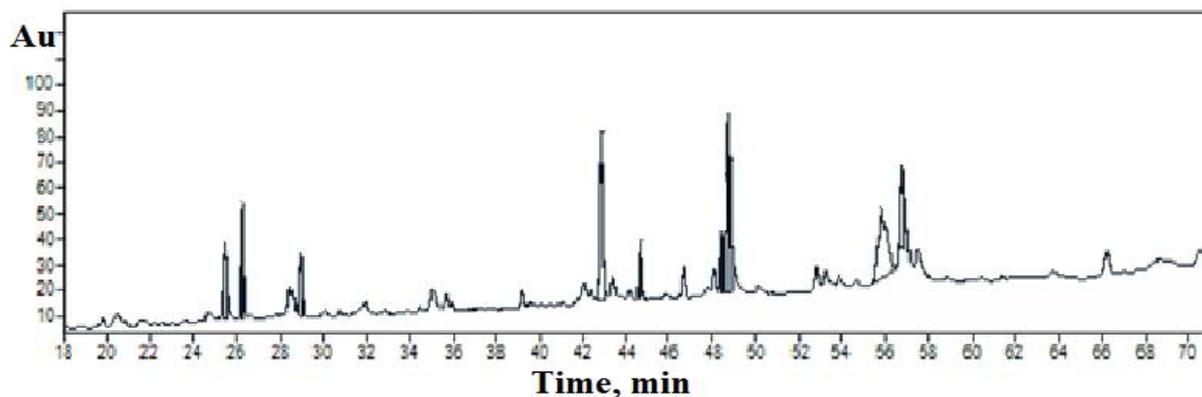


Рисунок 42 – Пептидная карта ФСО рЧИФН бета-1b (ноябрь 2021 г.)

Таким образом, в результате проведенного исследования стабильности ФСО рЧИФН бета-1b обосновано установление срока годности данного ФСО – 2 года, в течение которого профиль пептидной карты и время удерживания характеристических пиков стабильно.

3.5. Резюме

В ходе проведенного исследования нами был разработан ФСО рЧИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования, а именно:

- разработаны требования к кандидату в ФСО рЧИФН бета-1b: отсутствие в составе вспомогательных веществ белковой или иной природы, потенциально влияющих на профиль пептидной карты; стабильность раствора ФСО рЧИФН бета-1b; соответствие требованиям разработанной спецификации, включающей показатели спецификации на субстанцию за исключением показателей, изменяемых направленно (например, формы выпуска, pH и т.д.) и оценку аминокислотной последовательности молекулы методом масс-спектрометрии с покрытием не менее 95%;
- в качестве кандидата в ФСО выбран полупродукт рЧИФН бета-1b производства АО «Генериум», отобранный на финальной стадии очистки до добавления ЧСА;
- выбрана форма выпуска ФСО рЧИФН бета-1b (лиофилизат во флаконах формата 2R из стекла I гидролитического класса – 0,25 мг/флакон);

- проведена оценка качества ФСО рчИФН бета-1b в соответствии с разработанной спецификацией, включая подтверждение аминокислотной последовательности молекулы ФСО рчИФН бета-1b (покрытие более 97%) и подтверждение наличия дисульфидной связи;
- установлена аттестованная характеристика ФСО рчИФН бета-1b в виде абсолютного времени удерживания третьего пика (пика с максимальной интенсивностью) 42,0– 43,2 мин, относительное время удерживания первого пика 0,61–0,66, второго пика 0,67–0,73, четвертого пика 1,04–1,06, пятого пика 1,14–1,15, шестого пика 1,22–1,24, седьмого пика 1,29 –1,30;
- экспериментально обоснован срок годности разработанного ФСО рчИФН бета-1b (2 года) на основании исследования стабильности;
- разработана сопроводительная документация на ФСО рчИФН бета-1b: паспорт, макеты этикеток и инструкция по применению ФСО, содержащая описание методики его применения;
- показана возможность применения ФСО рчИФН бета-1b для оценки подлинности субстанций разных производителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с требованиями ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» (Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIV издание) и «Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (дата утверждения 03.11.2016 г.) и требованиями Европейской Фармакопеи, Фармакопеи Великобритании и США при производстве белков, получаемых с помощью технологии рекомбинантной ДНК и являющихся основным действующим веществом лекарственных препаратов, необходимо подтверждение подлинности первичной структуры молекулы методом пептидного картирования в сравнении со стандартным образцом [8, 51, 72, 73, 134]. На сегодняшний день в Российской Федерации зарегистрированы две метиониновые и пять безметиониновых форм субстанций рЧИФН альфа-2b и две субстанции рЧИФН бета-1b [12]. При этом международный стандартный образец сравнения для оценки подлинности первичной структуры метиониновой формы рЧИФН альфа-2b отсутствует, требования к аттестации и применению стандартных образцов предприятий не регламентированы, а применение для данного типа субстанций в качестве образца сравнения CRS кат. № I0320301 (Стандартный образец EDQM, безметиониновая форма рЧИФН альфа-2b) некорректно из-за структурных различий молекул [73].

Также отсутствует международный стандартный образец рЧИФН бета-1b, методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b в Европейской Фармакопее и нормативной документации производителей отсутствует. В Европейской Фармакопее представлена методика пептидного картирования рЧИФН бета-1a в сравнении со стандартным образцом CRS (кат. № Y0001101), в соответствии с которой гидролиз рЧИФН бета-1a проводят с применением фермента «эндопротеиназа LysC» в 0,05M трисгидрохлоридном буферном растворе pH 9,0 [71]. Также в Европейской Фармакопее представлена методика пептидного картирования рЧИФН альфа-2b, в соответствии с которой гидролиз рЧИФН альфа-2b в сравнении со стандартным образцом CRS (кат. № I0320301) проводят с

применением фермента «трипсин» в фосфатном буферном растворе рН 8,0 [73]. Однако в щелочной среде происходит быстрая денатурация рЧИФН бета-1b с образованием осадка, который исключает возможность проведения анализа.

В связи с этим актуальной является разработка фармакопейных стандартных образцов (ФСО) метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b, а также разработка методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b, для оценки подлинности первичной структуры молекул при производстве вновь выпускаемых серий субстанций. Разработанные ФСО могли бы успешно применять на фармацевтических предприятиях при контроле качества субстанций с целью единообразия проведения испытаний, что способствует повышению уровня оценки качества для обеспечения эффективности и безопасности лекарственных средств, выпускаемых на их основе.

Целью представленного исследования явилась разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности первичной структуры молекул рЧИФН альфа-2b (метиониновая форма) и рЧИФН бета-1b с изучением возможности их применения для контроля качества вновь выпускаемых серий субстанций разных производителей. При проведении исследования применены общенаучные подходы и специальные методы: высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия высокого разрешения.

При создании ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b на первом этапе работы мы разработали требования к кандидату в ФСО, а именно: наиболее полная оценка качества субстанции производителем в соответствии с требованиями международных документов; форма выпуска, удобная для применения и пригодная для условий хранения; соответствие аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным (не менее 95%). В соответствии с разработанными нами требованиями в качестве кандидата в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b мы выбрали субстанцию ООО «Фармапарк», номенклатура показателей и методики оценки качества которой соответствуют в полном объеме требованиям Европейской Фармакопеи. Далее предложили форму выпуска ФСО (замороженный раствор в стерильных

полипропиленовые криопробирках вместимостью 1 мл, соответствующие требованиям USP VI, объем розлива составил 0,5 мл), провели оценку качества кандидата в ФСО в соответствии со спецификацией на субстанцию (НД PN003726/01), за исключением раздела «Упаковка» в связи с изменением формы выпуска, и подтвердили аминокислотную последовательность молекулы кандидата в ФСО методом масс-спектрометрии с покрытием 100%, что позволяет оценить подлинность структуры молекулы и чистоту кандидата в ФСО.

Разработаны требования к кандидату в ФСО рчИФН бета-1b, а именно: 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 (например, формы выпуска, pH и т.д.); соответствие аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным (не менее 95%). В соответствии с данными требованиями в качестве кандидата в ФСО рчИФН бета-1b выбран полупродукт производства АО «Генериум», отобранный на финальной стадии очистки до добавления ЧСА. Для обеспечения стабильности молекулы рчИФН бета-1b установлен pH 3,0 - 3,5, выбрана форма выпуска (флаконы формата 2R из стекла I гидролитического класса), полученный раствор лиофилизирован. Таким образом, ФСО представляет собой лиофилизат рчИФН бета-1b без стабилизаторов белковой природы (0,25 мг/флакон). Качество ФСО соответствует разработанной спецификации № ОКК-СПЦ-710-01. Подтверждена аминокислотная последовательность молекулы кандидата в ФСО с помощью масс-спектрометрии с покрытием более 97%.

При создании ФСО рчИФН бета-1b на первом этапе работы мы разработали требования к кандидату в ФСО, а именно: 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 (например, формы выпуска, pH и т.д.); соответствие

аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным (не менее 95%). В соответствии с данными требованиями в качестве кандидата в ФСО рЧИФН бета-1b мы выбрали полупродукт производства АО «Генериум», отобранный на финальной стадии очистки до добавления человеческого сывороточного альбумина (стабилизатор белковой природы). Для обеспечения стабильности молекулы рЧИФН бета-1b установили рН 3,0 - 3,5, в качестве первичной упаковки использовали флаконы формата 2R из стекла I гидролитического класса. Полученный раствор лиофилизировали. Таким образом, ФСО представляет собой лиофилизат рЧИФН бета-1b без стабилизаторов белковой природы (0,25 мг/флакон). Качество ФСО оценили в соответствии с разработанной нами спецификацией (№ ОКК-СПЦ-710-01). При изучении первичной структуры подтверждена аминокислотная последовательность молекулы кандидата в ФСО с помощью масс-спектрометрии с покрытием более 97%.

На следующем этапе работы для установления аттестованной характеристики ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b мы предложили следующие критерии:

- наличие методики пептидного картирования, обладающей достаточной специфичностью для выявления значимых структурных фрагментов молекул;
- анализ аминокислотной последовательности основных пептидов с покрытием теоретической последовательности молекул;
- установление диапазонов времен удерживания основных (характеристических) пиков на основании результатов, полученных в условиях воспроизводимости.

Для установления аттестованной характеристики СО, применяемых при рутинном контроле качества биологических лекарственных средств и субстанций, как правило, используют методику, с помощью которой анализируют вновь выпускаемые серии целевого продукта. В связи с этим, СО является комплексом СО и методики [35].

Для установления аттестованной характеристики метиониновой формы рЧИФН альфа-2b мы выбрали предусмотренную для безметиониновой формы методику пептидного картирования, представленную в Монографии Европейской Фармакопеи 07/2015:1110. При этом в результате масс-спектрометрического анализа полученных в процессе гидролиза пептидов выявили, что второй пик характеризует N-концевую последовательность метионинового белка, а восьмой пик характеризует наибольший участок молекулы (29 аминокислот). В связи с этим установленной аттестованной характеристикой разработанного ФСО является абсолютное время удерживания четвертого пика (пика с максимальной интенсивностью) 33,8–37,0 мин, относительное время 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.

На разработанный и аттестованный ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b составлена сопроводительная документация (инструкция по применению, паспорт, макеты этикеток), присвоен статус фармакопейного стандартного образца (ФСО) и номер 3.2.00433 (ранее ОСО 42-28-433). Разработанная инструкция по применению содержит описание методики с указанием фермента (Трипсин, производитель Sigma-Aldrich, кат. № 8658, 8000-9000 U/mg), с которым проводили аттестацию.

В ходе исследования стабильности разработанного ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433) в режиме реального времени, на основании анализа стабильности пептидных карт, экспериментально обосновали срок годности ФСО – 2 года. В течение данного срока профиль пептидной карты и время удерживания характеристических пиков стабильны, количество окисленных примесей соответствует нормативным требованиям.

При изучении возможности применения разработанного ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433) для оценки подлинности вновь выпускаемых серий метиониновых субстанций разных производителей мы сравнили пептидные карты всех метониновых форм субстанций рЧИФН альфа-2b, зарегистрированных в

Российской Федерации. При этом время удерживания характеристических пиков, полученное для всех образцов метиониновых субстанций, соответствовало установленным диапазонам ФСО. Результаты свидетельствовали о возможности применения разработанного ФСО для оценки подлинности вновь выпускаемых серий метиониновых субстанций, выпускаемых разными фармацевтическими предприятиями.

В связи с отсутствием методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b в Европейской Фармакопее и в нормативной документации производителей нами был разработан способ пептидного картирования рЧИФН бета-1b с использованием ацетатного буферного раствора для гидролиза и фермента Эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8, рабочая область pH которого соответствует pH, при котором стабилен раствор рЧИФН бета-1b, не содержащий стабилизаторов белковой природы. В результате масс-спектрометрического анализа полученных в процессе гидролиза пептидов выявлено, что 6 пик характеризует N-конец молекулы (наличие или отсутствие метионина) и замену аминокислоты в 16(17) позиции. С применением разработанной методики мы установили аттестованную характеристику ФСО в виде абсолютного времени удерживания третьего пика (пика с максимальной интенсивностью) 42,0–43,2 мин, относительное время удерживания первого пика 0,61–0,66, второго пика 0,67–0,73, четвертого пика 1,04–1,06, пятого пика 1,14–1,15, шестого пика 1,22–1,24, седьмого пика 1,29–1,30.

Далее на разработанный и аттестованный ФСО рЧИФН бета-1b разработали сопроводительную документацию (инструкция по применению, паспорт, макет этикеток). Разработанному нами стандартному образцу присвоен статус фармакопейного стандартного образца (ФСО) и номер 3.2.00447 (ранее ОСО 42-28-447). Разработанная нами инструкция по применению содержит описание методики с указанием фермента (Эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8, производитель Sigma-Aldrich, кат № P2922; 500-1000 U/mg), с которым проводили аттестацию.

В ходе исследования стабильности ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447) в режиме реального времени, на основании анализа стабильности пептидных карт, экспериментально обосновали срок годности – 2 года. В течение данного срока профиль пептидной карты и время удерживания характеристических пиков стабильны.

При изучении возможности применения разработанного ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447) для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций рЧИФН бета-1b разных производителей мы сравнили пептидные карты всех субстанций рЧИФН бета-1b, зарегистрированных в Российской Федерации [12]. При этом время удерживания характеристических пиков, полученное для всех образцов субстанций рЧИФН бета-1b, соответствовало установленным диапазонам ФСО. Результаты свидетельствовали о возможности применения разработанного ФСО для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций рЧИФН бета-1b, выпускаемых разными фармацевтическими предприятиями.

Изложенное выше доказывает целесообразность и перспективность применения разработанных нами фармакопейных стандартных образцов метиониновой формы рЧИФН альфа-2b ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433) и бета-1b ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447) в качестве образца сравнения для оценки первичной структуры молекул при рутинном анализе на фармацевтических предприятиях в связи с отсутствием соответствующих международных стандартных образцов.

Итогом представленной диссертационной работы явилась разработка нового способа пептидного картирования рЧИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры молекулы. Впервые на его основе разработан Стандартный образец рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)). Впервые разработан Стандартный образец метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)). Разработанные ФСО могут быть использованы при рутинном контроле качества субстанций на фармацевтических предприятиях при оценке подлинности первичной структуры молекул методом пептидного картирования,

что позволяет унифицировать и стандартизовать подтверждение подлинности структуры выпускаемых серий соответствующих фармацевтических субстанций и имеет практическое значение для отечественного здравоохранения.

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 ПААГ с целью стандартизации требований к данным показателям.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ	–	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ РФ	–	Государственная Фармакопея Российской Федерации
Да	–	дальтон
ИФА	–	иммуноферментный анализ
ИФН	–	интерферон
М	–	моль в литре
мг	–	миллиграмм
мл	–	миллилитр
МСО	–	международный стандартный образец
нг	–	нанограмм
НД	–	нормативная документация
ОСО	–	отраслевой стандартный образец
ОФС	–	общая фармакопейная статья
ПЭГ	–	полиэтиленгликоль
рчИФН	–	интерферон человеческий рекомбинантный
СО	–	стандартный образец
СОП	–	стандартный образец предприятия
ФС	–	фармакопейная статья
ФСО	–	фармакопейный стандартный образец
ЧСА	–	человеческий сывороточный альбумин
CRS	–	Chemical reference standard – химический стандартный образец
EDQM	–	European Directorate for the Quality of Medicines – Европейский директорат по качеству лекарственных средств и здравоохранения
S	–	стандартное отклонение
USP	–	United States Pharmacopeia – Фармакопея США

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Белевский, А.С. Эффективность и безопасность гамма-интерферона при лечении внебольничной пневмонии: результаты открытого рандомизированного исследования IN/100000-317 / А.С. Белевский, С.А. Бернс, О.А. Ларцева // Медицина. – 2019. – Т.7, № 4. – С. 110 – 125.

2 Бондарев, В.П. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов / В.П. Бондарев, И.В. Борисевич, Р.А. Волкова // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения – 2013. – № 2. – С. 28 – 32.

3 Временные методические рекомендации: Лекарственная терапия острых респираторных вирусных инфекций в амбулаторной практике в период эпидемии COVID-19. Версия 2 от 16.04.2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://static-0.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/033/original/RESP_REC_V2.pdf (дата обращения: 27.02.2022).

4 ГОСТ 4919.2-77. Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов = Reagents and matters of special purity. Methods for preparation of buffer solutions: Межгосударственный стандарт: издание официальное: утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 28 февраля 1977 г. N 515: введен впервые: 1978-01-01. – Москва: Стандартиформ, 2006.

5 ГОСТ Р ИСО 21748-2012. Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений = Statistical methods. Guidance for the use of repeatability, reproducibility and truenesses estimates in measurement uncertainty estimation: национальный стандарт Российской Федерации: издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. N 1419-ст: введен впервые: дата введения 2013-12-01/ подготовлен Автономной

некоммерческой организацией "Научно-исследовательский центр контроля и диагностики технических систем". – Москва: Стандартинформ, 2019.

6 Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС 1.1.0007.18 «Стандартные образцы».

7 Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик».

8 Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС 1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

9 Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС 1.7.1.0012.18 «Интерфероны».

10 Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ОФС 1.2.1.2.0001.15 «Хроматография».

11 Государственная Фармакопея Российской Федерации (XIV издание), ФС 3.3.1.0069.18 «Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b, субстанция раствор, раствор замороженный».

12 Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения: 15.02.2022).

13 Гусева, Е.И. Клинические рекомендации. Неврология и нейрохирургия / Е.И. Гусева. – Москва, 2015. – 424 с.

14 Ершов, Ф.И. Интерферон и его индукторы / Ф.И. Ершов, А. С. Новохатский. – Москва: Медицина, 1980. – 174 с.

15 Ершов, Ф.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) / Ф.И.Ершов. – Москва: Гэотар-Медиа, 2005. – 368 с.

16 Есауленко, И.Э. Основные принципы оказания неврологической помощи больным с рассеянным склерозом в условиях многопрофильного городского стационара (30–летний опыт) / И. Э. Есауленко // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. – 2016. – №7. – С. 37 – 41.

17 Завалишина, И.А. Аутоиммунные заболевания в неврологии. Клиническое руководство / И.А. Завалишина. – Москва, 2014. – 400 с.

18 Киселев, О.И. Антивирусные препараты для лечения гриппа и ОРЗ. Дизайн препаратов на основе полимеразных носителей / О.И. Киселев, Э.Г. Деева, А.В. Слита. – СПб.: Время, 2000. – 132 с.

19 Корочкина, О.В. Эффективность и безопасность препарата “Альтевир” при лечении больных хроническим гепатитом С / О.В. Корочкина, Н.И. Гейвандова, Л.И. Ратникова // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2009. – №4. – С. 22–28.

20 Корягина, М.С. Герпферон: опыт применения при герпесвирусной инфекции / М.С. Корягина, Л.В. Посисеева // Эффективная фармакотерапия. – 2015. – №33. – С. 14–17.

21 Лебедев, А.Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов / А.Т. Лебедев. – Москва: Техносфера, 2012. – 176 с.

22 Майчук, Ю.Ф. Расширение области применения Офтальмоферона при различных глазных заболеваниях. Обзор литературы и собственные наблюдения / Ю.Ф. Майчук // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 54–58.

23 Малиновская, В.В. Виферон - рекомбинантный интерферон альфа-2b: применение в педиатрии / В.В. Малиновская, М.Г. Романцов. – Москва, 1997. – 78 с.

24 Минздравсоцразвития РФ (2005): Протокол ведения больных. Рассеянный склероз [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://lawrussia.ru/bigtexts/law_1507/index.htm? (дата обращения: 02.02.2022).

25 Нестерова, А.А. Аллергоферон, как препарат выбора в лечении аллергического ринита / А.А. Нестерова, А.И. Драчук, И.Н. Одарченко // Сборник научных трудов – Омск, 2015. – С. 356–357.

26 Патент 2242516 Российская Федерация, МПК C12N15/21, A61K38/19 Способ получения рекомбинантного человеческого интерферона альфа-2b, рекомбинантная плазида и штамм продуцент для его осуществления / П.А. Черепанов, Т.Г. Михайлова, П.П. Черепанов; заявитель и патентообладатель

Общество с ограниченной ответственностью "ФАРМАПАРК". – № 2003136404/15; заявл. 18.12.2003; опубл. 20.12.2004. – 18 с.

27 Патент 2261913 Российская Федерация, МПК C12N15/22 Рекомбинантная плазмидная ДНК pES6-1, кодирующая полипептид интерферон бета-1b человека, и штамм *Escherichia coli* BDEES6 – продуцент рекомбинантного интерферона бета-1b человека / Д.И. Баирамашвили, И.И. Воробьев, А.Г. Габиров; заявитель и патентообладатель ЗАО «Мастерклон». – № 2004100722/13, заявл. 15.01.2004; опубл. 10.10.2005. – 10 с.

28 Патент 2432401 Российская Федерация, МПК C12P21/06 Способ получения безметионинового интерферона альфа-2b человека / Д.А. Широков, В.В. Рябиченко, Р.И. Акишина; заявитель и патентообладатель ФГУП ГосНИИгенетика – № 2009148626/10; заявл. 28.12.2009; опубл. 27.10.2011, Бюл. №30. – 19 с.

29 Патент 2473696 Российская Федерация, МПК C12P21/02 Промышленный способ получения и очистки рекомбинантного интерферона бета-1b человека из телец включения / А.И. Бобрусин, Н.В. Кононова, В.А. Мартьянов; заявитель и патентообладатель ЗАО «Генериум». – № 2011129033/10; заявл. 14.07.2011; опубл. 27.01.2013, Бюл. №3. – 11 с.

30 Попова, Е.В. Опыт применения российского биоаналога интерферона бета-1b в лечении детского рассеянного склероза / Е.В. Попова, А.Н. Бойко, О.В. Быкова // Журнал неврологии и психиатрии. – 2016. – № 6. – Р. 73 – 75.

31 Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. Глава 1: Оценка качества биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК. – Москва: Полиграф-плюс, 2014. – 344 с.

32 Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV. Глава 8: Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции интерферон бета – Москва: Полиграф-плюс, 2014. – 172 с.

- 33 Соловьев, В.Д. Интерфероны в теории и практике медицины / В. Д. Соловьев, Т. А. Бектемиров. – 2-е изд. – Москва: Медицина, 1981. – 400 с.
- 34 Спирина, Н.Н. Ведение больных с рассеянным склерозом: метод. рекомендации / Н.Н. Спирина. – Москва, 2015. – 68 с.
- 35 Фадейкина, О.В. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств / О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, №8. – С. 44 – 50.
- 36 Шмидт, Т.Е. Воспаление и нейродегенерация при рассеянном склерозе / Т.Е. Шмидт // Неврол.журн. – 2006. – №3. – С. 46 – 51.
- 37 Adams, A. Interferon beta-1b and childhood multiple sclerosis / A. Adams, W. Tyor, K. Holden // Pediatric Neurology. – 1999. – Vol. 21 (1). – P. 481–483.
- 38 Adolf, G.R. Purification and characterization of natural human interferon Omega. Two alternative cleavage sites for the signal peptidase / G.R. Adolf, I. Maurer-Fogy, I. Kalsner // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 265 (16). – P. 9290 – 9295.
- 39 Ahmad, A.T. IFN- α in the treatment of melanoma / A.T. Ahmad, G. Helen, J.M. Kirkwood // J Immunol. – 2012. – Vol. 189 (8). – P. 3789 – 3793.
- 40 Alenda, R. Blood lymphocyte subsets identify optimal responders to interferon-beta in MS / R. Alenda, L. Costa – Frossard // J Neurol. – 2018. – Vol. 265 (1). –P. 24 – 31.
- 41 Anantharamu, T. A review of the current anti-HCV therapy: are we finally ready for interferon-free regimens / T. Anantharamu, S. Sharma, A.K. Sharma // Inter. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis. – 2014. – Vol. 4 (5). – P. 6 –11.
- 42 Angelucci, C. Recombinant human IFN-beta affects androgen receptor level, neuroendocrine differentiation, cell adhesion, and motility in prostate cancer cells / C. Angelucci, F. Iacopino, S. Ferracuti // J Interferon Cytokine Res. – 2007. – Vol. 27 (8). – P. 643 – 652.
- 43 Armstrong-James, D. Exogenous interferon-gamma immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients / D. Armstrong-James, I.A. Teo, S. Shrivastava // Am. J. Transplant. – 2010. – Vol. 10 (8). – P. 1796 –1803.

- 44 Babaeipour, V. Enhancement of human γ -interferon production in recombinant *E. coli* using batch cultivation / V. Babaeipour, S. Shojaosadati, R. Khalilzadeh // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 160 (8). – P. 2366 – 2376.
- 45 Bandurska, K. Interferons: between structure and function / K. Bandurska, I. Krol, M. Myga-Nowak // *Postepy Hig Med Dosw.* – 2014. – Vol. 68. – P. 428 – 440.
- 46 Barone, D.A. Survey of US patients with multiple sclerosis: comparison of the new electronic interferon beta-1b autoinjector (BETACONNECT™) with mechanical autoinjectors / D.A. Barone, B.A. Singer, L. Merkov // *Neurol Ther.* – 2016. – Vol. 5 (2). – P. 155 – 167.
- 47 Belloni, L. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome / L. Belloni, L. Allweiss, F. Guerrieri // *J Clin Invest.* – 2012. – Vol. 122 (2). – P. 529 – 537.
- 48 Borden, E. C. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine / E.C. Borden, G.C. Sen, G. Uze // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2007. – Vol.6 (12). – P. 975 – 990.
- 49 Boyer, C.M. Differential induction by interferons of major histocompatibility complex-encoded and non-major histocompatibility complex-encoded antigens in human breast and ovarian carcinoma cell lines / C.M. Boyer, D.V. Dawson, S.E. Neal // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49 (11). – P. 2928 – 2934.
- 50 British Pharmacopoeia chemical reference substances (2022) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.pharmacopoeia.com/reference-standards> (дата обращения: 01.02.2022).
- 51 British Pharmacopoeia, «Interferon alfa-2 concentrated solution».
- 52 British Pharmacopoeia, «Interferon beta-1a concentrated solution».
- 53 Chaparro, T.T. Resolution of conjunctival melanoma with topical interferon alpha 2b in a patient with mitomycin C intolerance / T.T. Chaparro, A.L. Diaz, R. Secondi // *Arch Soc Esp Oftalmol.* – 2018. – Vol. 93 (11). – P. 558 – 561.
- 54 Chatelut, E. Pharmacokinetic model for alpha interferon administered subcutaneously / E. Chatelut // *Br.J. Clin Pharmacol.* – 1999. – Vol. 47. – P. 365 – 371.

55 Cocco, E. Profile of PEGylated interferon beta in the treatment of relapsing- remitting multiple sclerosis / E. Cocco, M. G. Marrosu // *Ther Clin Risk Manag.* – 2015. – Vol.11. – P. 759 –766.

56 Conradt, H.S. Structure of the carbohydrate moiety of human interferon-beta secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line / H.S. Conradt, H.Egge // *J Biol Chem.* – 1987. – Vol. 262 (30). – P. 14600 – 14605.

57 Crisafulli, S. Interferon gamma: activity and ELISA detection comparisons / S. Crisafulli, Y. Pandya, K. Moolchan // *Biotechniques.* – 2008. – Vol. 45 (1). – P. 101–102.

58 Davis, J.M. Conformation and stability of two recombinant human interferon-alpha analogs / J.M. Davis, M.A. Narachi, H.L. Levine // *Int J Pept Protein Res.* – 1987. – Vol. 29 (6). – P. 685 – 691.

59 Davoudi-Monfared, E. A randomized clinical trial of the efficacy and safety of interferon β -1a in treatment of severe COVID-19 / E. Davoudi –Monfared, H. Rahmani, H. Khalil // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2020. – Vol. 64 (9). – P. 01061.

60 Der Auwera, P. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of single doses of subcutaneous pegylated human G-CSF mutant (Ro 25–8315) in healthy volunteers: comparison with single and multiple daily doses of filgrastim / P. Der Auwera, E. Platzer, Z. X. Xu // *Am. J. Hematol.* – 2001. – Vol. 66 (4). – P. 245 – 251.

61 Devane, J.G. A short 2 week dose titration regimen reduces the severity of flu-like symptoms with initial interferon gamma-1b treatment / J.G. Devane, M.L. Martin, M.A. Matson // *Curr Med Res Opin.* – 2014. – Vol. 30 (6). – P. 1179 –1187.

62 Ealick, S.E. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma / S.E. Ealick, W.J. Cook, S. Vijay-Kumar // *Science.* – 1991. – Vol. 252 (5006). – P. 698 – 702.

63 Estrov, Z. Interferons: basic principles and clinical applications / Z. Estrov, M. Talpaz. – Portland: Book News Inc, 1993. – 113 p.

64 European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (2012): «Pharmaceutical Reference Standards» (11th International Symposium, Strasbourg, France) [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

https://www.edqm.eu/medias/fichiers/session_2b_addressing_the_challenges_in_the_charac.pdf (дата обращения: 03.02.2022).

65 European Medicines Agency (1994): Production and quality control of medicinal products derived by recombinant DNA technology [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ema.europa.eu/en/production-quality-control-medicinal-products-derived-recombinant-dna-technology> (дата обращения: 27.01.2022).

66 European Medicines Agency (2000): Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf (дата обращения: 27.01.2022).

67 European Medicines Agency (2013): Guideline on similar biological medicinal products containing interferon beta [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ema.europa.eu/en/similar-biological-medicinal-products-containing-interferon-beta> (дата обращения: 28.01.2022).

68 European Medicines Agency (2015): Concept paper on the revision of the reflection paper on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant interferon alpha or pegylated recombinant interferon alpha [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-concept-paper-revision-reflection-paper-non-clinical-clinical-development-similar-biological_en.pdf (дата обращения: 25.01.2022).

69 European Pharmacopoeia, 01/2008:1440 «Interferone gamma-1b concentrated solution».

70 European Pharmacopoeia, 01/2008:20243 «Mass-spectrometry».

- 71 European Pharmacopoeia, 01/2009:1639 «Interferon beta-1a concentrated solution».
- 72 European Pharmacopoeia, 01/2010:20255 «Peptide mapping».
- 73 European Pharmacopoeia, 07/2015:1110 «Interferon alfa-2 concentrated solution».
- 74 Feinstein, S.I. Family of human alpha-interferon like sequences / S.I. Feinstein, Y. Mory, Y. Chernajovsky // *Mol. Cell. Biol.* – 1985. – Vol. 5 (3). – P. 510 – 517.
- 75 Ferrantini, M. Interferon- α and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use / M. Ferrantini, C. Imerio, B. Filippo // *Biochimie.* – 2007. – Vol. 89 (6). – P. 884 – 893.
- 76 Foser, S. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon alpha-2a (PEGASYS) / S. Foser, A. Schacher, K. A. Weyer // *Protein Expression Purif.* – 2003. – Vol. 30 (1). – P. 78 – 87.
- 77 Grace, M. Structural and biologic characterization of pegylated recombinant IFN-alpha 2b / M. Grace, S. Youngster, G. Gitlin // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2001. – Vol. 21 (12). – P. 1103 – 1115.
- 78 Hahn, N. Therapeutic interferon interchange in relapsing multiple sclerosis lowers health care and pharmacy expenditures with comparable safety / N. Hahn, K. Palmer // *The Permanente Journal.* – 2018. – Vol. 22. – P. 18 – 46.
- 79 Hauptmann, R. A novel class of human type I interferons / R. Hauptmann, P. Swetly // *Nucleic Acids Res.* – 1985. – Vol. 13 (13). – P. 4739 – 4749.
- 80 Hojati, Z. Multiple sclerosis. A mechanistic view / Z. Hojati. – Academicpress, 2015. – 538 p.
- 81 Hyun, J.W. Neutralizing antibodies against interferon-beta in Korean patients with multiple sclerosis / J.W. Hyun, G. Kim, Y. Kim // *J Clin Neurol.* – 2018. – Vol. 14 (2). – P. 186 – 190.
- 82 Indian Pharmacopoeia, «Interferon alfa-2 concentrated solution».
- 83 Joffre, O.P. Cross-presentation by dendritic cells / O.P. Joffre, E. Segura, A. Savina // *Nat Rev Immunol.* – 2012. – Vol. 12 (8). – P. 557 – 569.

- 84 Jonasch, E. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities / E. Jonasch // *Oncologist*. – 2001. – Vol. 6 (1). – P. 34 – 55.
- 85 Karpusas, M. The crystal structure of human interferon β at 2.2 Å resolution / M. Karpusas, M. Nolte // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1997. – Vol. 94 (22). – P. 11813 – 11818.
- 86 Karpusas, M. The structure of human interferon- β : implications for activity / M. Karpusas, A. Whitty, L. Runkel // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1998. – Vol. 54 (11). – P. 1203–1216.
- 87 Kenneth, R. Enzymatic cleavage and HPLC peptide mapping of proteins / R. Kenneth // *Molecular Biotechnology*. – 1997. – Vol. 8 (2). – P. 155 – 167.
- 88 Kontsek, P. Human type I interferons: structure and function / P. Kontsek // *Acta Virol.* – 1994. – Vol. 38 (6). – P. 345 – 360.
- 89 Kontsek, P. Forty years of interferon / P. Kontsek, E. Kontsekova // *Acta virologica*. – 1997. – Vol. 41 (6). – P. 349 – 353.
- 90 Kurzrock, R. Pharmacokinetics, single-dose tolerance, and biological activity of recombinant gamma-interferon in cancer patients / R. Kurzrock, M.G. Rosenblum, S.A. Sherwin // *Cancer Res.* – 1985. – Vol. 45 (6). – P. 2866 – 2872.
- 91 Li, G. Current therapy for chronic hepatitis C: the role of direct-acting antivirals / G. Li, E. De Clercq // *Antivir.* – 2017. – Vol. 142. – P. 83 – 122.
- 92 Lin, H. Efficacy and safety of interferon- α 2b spray in the treatment of hand, foot, and mouth disease: a multicenter, randomized, double-blind trial / H. Lin, L. Huang, J. Zhou // *Arch Virol.* – 2016. – Vol. 161 (11). – P. 3073 – 3080.
- 93 Lindsay, K.L. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C / K.L. Lindsay, C. Trepo, T. Heintges // *Hepatology*. – 2001. – Vol. 34 (2). – P. 395 – 403.
- 94 Lundell, D.L. Structural elements required for receptor recognition of human interferon-gamma / D.L. Lundell, S.K. Narula // *Pharmacol. Ther.* – 1994. – Vol. 64 (1). – P. 1–21.

- 95 Marcello, T. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics / T. Marcello, A. Grakoui, G. Barba-Spaeth // *Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 131 (6). – P.1887–1898.
- 96 Mariusz, K. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli* / K. Mariusz // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2011. – Vol. 12. – P. 268–274.
- 97 Maurelli, M. Interferon-beta injection site reactions in patients with multiple sclerosis / M. Maurelli, R. Bergamaschi // *J Dermatolog Treat.* – 2018. – Vol. 29 (8). – P. 831–834.
- 98 Mazzaro, C. Survival and prognostic factors in mixed cryoglobulinemia: data from 246 cases / C. Mazzaro, L.D. Maso, E. Mauro // *Diseases*. – 2018. – Vol. 6 (2). – P. 35.
- 99 Miller, C.H. Clinical use of interferon-gamma / C.H. Miller, S.G. Maher, H.A. Young // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1182. – P. 69–79.
- 100 Muller, R. Treatment of chronic hepatitis B with interferon alfa-2b / R. Muller, R. Baumgarten, R. Markus // *J Hepatol.* – 1990. – Vol. 11. – P.137–140.
- 101 Multiple Sclerosis International Federation (2013): Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World (London) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf> (дата обращения: 05.02.2022).
- 102 Nyman, T.A. Identification of nine interferon-alpha subtypes produced by sendai virus-induced human peripheral blood leucocytes / T.A. Nyman, H. Tolo, J. Parkkinen // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 329. – P. 295–302.
- 103 Nyman, T.A. Structural characterization of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon-a 2b and interferon-a14c produced by sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes / T.A. Nyman, N. Kalkkinen, H. Tolo // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 253 (2). – P. 485–493.

- 104 Orru, S. Structural analysis of modified forms of recombinant IFN-beta produced under stress-simulating conditions / S. Orru, A. Amoresano, R. Siciliano // *Biol Chem.* – 2000. – Vol. 381 (1). – P. 7–17.
- 105 Panahi, Y. Recombinant human interferon gamma (Gamma Immunex) in treatment of atopic dermatitis / Y. Panahi, S.M. Davoudi, N. Madanchi // *Clin. Exp. Med.* – 2012. – Vol. 12 (4). – P. 241–245.
- 106 Pedersen, I.M. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism / I. M. Pedersen, G. Cheng, S. Wieland // *Nature.* – 2007. – Vol. 449 (7164). – P. 919–922.
- 107 Pereda, R. Therapeutic effectiveness of interferon alpha 2b treatment for COVID-19 patient recover / R. Pereda, G. Daniel, B.R. Hubert // *J Interferon Cytokine Res.* – 2020. – Vol. 40 (12). – P. 578 – 588.
- 108 Pereda, R. Therapeutic effectiveness of interferon- α 2b against COVID-19: the cuban experience / R. Pereda, G. Daniel, B.R. Huber // *J Interferon Cytokine Res.* – 2020. – Vol. 40 (9). – P. 438 – 442.
- 109 Pestka, S. Definition and classification of the interferons / S. Pestka, S. Baron // *Methods Enzymol.* – 1981. – Vol. 78. – P. 3 – 14.
- 110 Pestka, S. Interferon from 1981 to 1986 / S. Pestka // *Methods Enzymol.* – 1986. – Vol. 119. – P. 3–14.
- 111 Pestka, S. Interferons and their actions / S. Pestka, J.A. Langer, K.C. Zoon, C.E. Samuel // *Annu. Rev. Biochem.* – 1987. – Vol. 56. – P. 727–777.
- 112 Ph. Eur. Reference Standards: Orders and Catalogue (2022) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-orders-catalogue> (дата обращения 16.02.2022).
- 113 Ph. Eur. Reference Standards: Purpose and use (2022) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-purpose-and-use> (дата обращения 16.02.2022).
- 114 Phillip, D.M. Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind,

placebo- controlled, phase 2 trial / D.M. Phillip, R.J. Marsden, V.J. Tear // *Lancet Respir Med.* – 2021. – Vol. 9 (2). – P. 196–206.

115 Presnell, S.R. Topological distribution of four- α -helix bundles / S.R. Presnell, F. E. Cohen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86 (17). – P. 6592–6596.

116 Qiang, Z. Inhibition of TPL2 by interferon- α suppresses bladder cancer through activation of PDE4D / Z. Qiang, Z.Y. Zhou, T. Peng // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2018. – Vol. 37. – P. 288.

117 Qing, X. Protein N-terminal processing: substrate specificity of *Escherichia coli* and human methionine aminopeptidases / X. Qing, F. Zhang, A.N. Benjamin // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49 (26). – P. 5588–5599.

118 Radhakrishnan, R. Zinc mediated dimer of human interferon alpha 2b revealed by X-Ray crystallography / R. Radhakrishnan, L.J. Walter, A. Hruza // *Structure.* – 1996. – Vol. 4 (12). – P. 1453–1463.

119 Rahmani, H. Interferon β -1b in treatment of severe COVID-19: a randomized clinical trial / H. Rahmani, E. Davoudi-Monfared, A. Nourian // *Int Immunopharmacol.* – 2020. – Vol. 88. – P. 106903.

120 Razaghi, A. Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: impacts of production platforms and glycosylation / A. Razaghi, L. Owens, K. Heimann // *J Biotechnol.* – 2016. – Vol. 240. – P. 48–60.

121 Rodriguez-Cabrera, L. Conjunctival papillomatosis in children treated with co-adjuvant topical interferon alpha-2b / L. Rodriguez-Cabrera, P. Garcia-Regil, A. Velasco-Levy // *Arch Soc Esp Oftalmol.* – 2019. – Vol. 94 (7). – P. 352–354.

122 Runkel, L. Differences in activity between alpha and beta type I interferons explored by mutational analysis / L. Runkel, L. Pfeffer, M. Lewerenz // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273 (14). – P. 8003–8008.

123 Sareneva, T. Effect of carbohydrates on the pharmacokinetics of human interferon-gamma / T. Sareneva, K. Cantell, L. Pyhala // *J. Interferon Res.* – 1993. – Vol. 13 (4). – P. 267–269.

- 124 Satchell, S.C. Interferon- beta reduces proteinuria in experimental glomerulonephritis / S.C. Satchell, O. Buchatska, S. B. Khan // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – Vol. 18 (11). – P. 2875 – 2884.
- 125 Search and Buy USP Reference Standards (2022) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.usp.org/reference-standards/reference-standards-catalog> (дата обращения: 15.02.2022).
- 126 Sleijfer, S. Side effects of interferon-alpha therapy / S. Sleijfer, M. Bannink, A.R. Van Gool // *Pharm World Sci.* – 2005. – Vol. 27 (6). – P. 423 – 431.
- 127 Spaccarelli, N. The use of interferons in the treatment of cutaneous T-Cell lymphoma / N. Spaccarelli, A.H. Rook // *Dermatol Clin.* – 2015. – Vol. 33 (4). – P.731–745.
- 128 Spiegel, R.J. Anti-interferon antibodies to interferon-alpha 2b: results of comparative assays and clinical perspective / R.J. Spiegel, S.L. Jacobs, M.W. Treuhaft // *J Interferon Res.* – 1989. – Vol. 1. – P. 17 –24.
- 129 Talukdar, R. Pancreatic stellate cells: new target in the treatment of chronic pancreatitis / R. Talukdar, R. Tandon // *Gastroenterol. Hepatol.* – 2008. – Vol. 23 (1). – P. 34 – 41.
- 130 Tang, L.S. Chronic hepatitis B infection: a review / L.S. Tang, E. Covert, E. Wilson // *JAMA.* – 2018. – Vol. 319 (17). – P. 1802 – 1813.
- 131 The European Pharmacopoeia Reference Standards catalogue (2022) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://crs.edqm.eu/> (дата обращения: 14.02.2022).
- 132 Todt, D. Antiviral activities of different interferon types and subtypes against hepatitis E virus replication / D. Todt, C. Francois, P. Behrendt // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60 (4). – P. 2132 –2139.
- 133 Trottier, M.D. Peripheral, but not central nervous system, type I interferon expression in mice in response to intranasal vesicular stomatitis virus infection / M.D. Trottier, D.S. Lyles // *J. Neurovirol.* – 2007. – Vol. 13 (5). – P. 433 – 445.
- 134 United States Pharmacopeia, «Biotechnology-derived articles – peptide mapping».

- 135 United States Pharmacopeia, «Biotechnology-derived articles».
- 136 United States Pharmacopeia, «USP Reference Standards».
- 137 Valente, G. Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues / G. Valente, L. Ozmen, F. Novelli // *Eur J Immunol.* – 1992. – Vol. 22 (9). – P. 2403 – 2412.
- 138 Van Loon, AP. High-affinity receptor for interferon-gamma (IFN-gamma), a ubiquitous protein occurring in different molecular forms on human cells: blood monocytes and eleven different cell lines have the same interferon-gamma receptor protein / AP. van Loon, L. Ozmen, M. Fountoulakis // *J Leukoc Biol.* – 1991. – Vol. 49. – P. 462 – 473.
- 139 Wang, B. Subcutaneous injection of IFN alpha-2b for COVID-19: an observational study / B. Wang, L. Diandian, L. Tao // *BMC Infect Dis.* – 2020. – Vol. 20. – P. 723.
- 140 Waschutza, G. Engineered disulfide bonds in recombinant human interferon-gamma: the impact of the N-terminal helix A and the AB-loop on protein stability / G. Waschutza, V. Li, T. Schafer // *Protein Eng.* – 1996. – Vol. 9 (10). – P. 905 – 912.
- 141 Wetzel, R. Assignment of the disulphide bonds of leukocyte interferon / R. Wetzel // *Nature.* – 1981. – Vol. 289 (5798). – P. 606 – 607.
- 142 Wills, R.J. Clinical pharmacokinetics of interferons / R.J. Wills // *Clin. Pharmacokin.* – 1990. – Vol. 19 (5). – P. 390 – 399.
- 143 World Health Organization (2008): Atlas: Multiple Sclerosis Resources in the World (Geneva, Switzerland) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43968/9789241563758_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y (дата обращения: 07.02.2022).
- 144 Younes, H.M. Interferon-gamma therapy: evaluation of routes of administration and delivery systems / H.M. Younes, B.G. Amsden // *J. Pharm. Sci.* – 2002. – Vol. 91 (1). – P. 2 – 17.
- 145 Zaidi, R. The two faces of interferon-gamma in cancer / R. Zaidi // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17 (19). – P. 6118 – 6124.

146 Zajac, M. Hepatitis C – new drugs and treatment prospects / M. Zajac, I. Muszalska, A. Sobczak // *Eur J Med Chem.* – 2019. – Vol. 165. – P. 225 –249.

147 Zanjani, H. Comparative evaluation of tacrolimus versus interferon alpha-2b eye drops in the treatment of vernal keratoconjunctivitis: a randomized, double-masked study / H. Zanjani, M.N. Aminifard, A. Ghafourian // *Cornea.* – 2017. – Vol. 36 (6). – P. 675 – 678.

148 Zettl, U.K. Interferon β -1a and β -1b for patients with multiple sclerosis: updates to current knowledge / U.K. Zettl, M. Hecker // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2018. – Vol. 14 (2). – P. 137 –153.

149 Zeuzem, S. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C / S. Zeuzem, S.V. Feinman, J. Rasenack // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343 (23). – P. 1666–1672.

150 Zhou, Q. Interferon- α 2b treatment for COVID-19 / Q. Zhou, V. Chen // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1061.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)
Юридический адрес: 127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42
Фактический адрес: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, стр. 1.3, тел. 8 (499) 190-18-18, доб. 65-17; 64-16

**ПАСПОРТ
ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ
ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(отраслевой)**

**СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ МЕТИОНИНОВОЙ ФОРМЫ
ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2b**

**ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)
СЕРИЯ: 001-100118**

1. **НАЗНАЧЕНИЕ:** фармакопейный стандартный образец (ФСО) предназначен для оценки подлинности первичной структуры субстанций метиониновой формы интерферона альфа-2b методом пептидного картирования.
2. **АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:** абсолютное время удерживания четвертого пика (пика с максимальной интенсивностью) 33,8-37,0 мин, относительное время удерживания второго пика 0,74-0,78 мин, относительное время удерживания восьмого пика 1,51-1,59 мин.
3. **ОПИСАНИЕ, ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:** материал ФСО представляет собой субстанцию метиониновой формы интерферона альфа-2b (1 мг/мл).
4. **ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ:** в соответствии с инструкцией по применению.
5. **КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ:** экземпляр ФСО (криопробирка), паспорт, инструкция по применению.
6. **УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ:** ФСО должен храниться при температуре не выше минус 40 °С. Транспортирование всеми видами крытого транспорта при температуре не выше минус 18 °С.
Стабильность значений аттестованной характеристики в течение срока годности ФСО гарантируется при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.
7. **ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ:** материал ФСО предназначен для лабораторных испытаний и не предназначен для введения людям. Особые условия не требуются.
8. **ДАТА ВЫПУСКА:** 10.01.2018 г.
9. **СРОК ГОДНОСТИ:** 10.01.2020 г.

Директор Центра экспертизы и контроля
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П.Бондарев



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)
Юридический адрес: 127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42
Фактический адрес: 119002, г. Москва, пер. Сявкин Вражек, д. 41, стр. 1.3, тел. 8 (499) 190-18-18, доб. 65-17; 64-16

**ПАСПОРТ
ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ
ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(отраслевой)**

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ ИНТЕРФЕРОНА БЕТА-1b

ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)

СЕРИЯ: 001-150920

1. НАЗНАЧЕНИЕ: фармакопейный стандартный образец (ФСО) предназначен для оценки подлинности первичной структуры субстанций интерферона бета-1b методом пептидного картирования.

2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА: абсолютное время удерживания третьего (референсного) пика 42,0-43,2 мин, относительное время 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.

3. ОПИСАНИЕ, ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ: материал ФСО представляет собой лиофилизат интерферона бета-1b без стабилизаторов белковой природы (0,25 мг/флакон).

4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ: в соответствии с инструкцией по применению.

5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ: экземпляр ФСО (флакон), паспорт, инструкция по применению.

6. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ: ФСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Транспортирование всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С.
Стабильность значений аттестованной характеристики в течение срока годности ФСО гарантируется при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

7. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ: материал ФСО предназначен для лабораторных испытаний и не предназначен для введения людям. Особые условия не требуются.

8. ДАТА ВЫПУСКА: 15.09.2020 г.

9. СРОК ГОДНОСТИ: 15.09.2022 г.

Директор Центра экспертизы и контроля
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

В.П. Бондарев

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю признательность всему коллективу лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России за помощь, оказанную при выполнении данной работы.

Выражаю благодарность директору центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, профессору, д.м.н. Владимиру Петровичу Бондареву за поддержку на всех этапах выполнения работы. Особую признательность выражаю уважаемым рецензентам - начальнику лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, д.б.н. Раузе Асхатовне Волковой и главному эксперту лаборатории иммунологии, д.б.н. Наталье Александровне Алпатовой, а также начальнику испытательного центра экспертизы качества, д.м.н., профессору Арташесу Аваковичу Мовсесянцу за оказанное содействие при проведении данного исследования.

Выражаю благодарность руководителям и сотрудникам фармацевтических компаний ООО «Фармапарк» и ЗАО «Генериум», а также сотрудникам ФГБУН «Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН за помощь и взаимное сотрудничество.