

На правах рукописи

Устинникова Ольга Борисовна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИИ ОЦЕНКИ ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2025

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

Научный консультант:

Доктор биологических наук

Волкова Рауза Асхатовна

Официальные оппоненты:

Ярыгин Константин Никитич – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория клеточной биологии, заведующий

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

Бонарцев Антон Павлович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биоинженерии, группа «Медицинские биополимеры», руководитель

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «__» _____ 202 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

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

Автореферат разослан «__» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Высокая востребованность биологических лекарственных препаратов (БЛП), обусловленная широким спектром их применения для лечения и профилактики социально значимых заболеваний, вызывает необходимость разработки новых и совершенствования имеющихся препаратов. Технологические платформы биологических лекарственных препаратов, в том числе вакцин последнего поколения, а также использование достижений генной инженерии при разработке фармацевтических субстанций, включая направленные модификации биологически активных белков, являются приоритетными направлениями развития медицинской биотехнологии (Ю.В. Олефир и др., 2016; Sinha R., Shukla, 2019; CA Jr Stone et al., 2023; Chung-I Rai et al., 2024). При этом развитие биофармацевтической отрасли заключается, в том числе, в обеспечении качества лекарственных средств путем совершенствования системы регистрации и контроля качества (Распоряжение Правительства РФ «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года» № 1495-р, 2023).

Таким образом, совершенствование методологии оценки качества биологических лекарственных препаратов - непрерывный процесс, обусловленный развитием медицинских биотехнологий и их нормативно-регуляторного обеспечения, гарантирующего поступление на фармацевтический рынок биомедицинских лекарственных средств, отвечающих отечественным и международным стандартам качества. Процесс обновления затрагивает элементы методологии, связанные с разработкой и внедрением в биотехнологическое производство новых высокотехнологичных методов, а также непрерывную актуализацию существующих требований и регулирующих документов к оценке качества лекарственных средств.

Элементы, формирующие методологию оценки качества биологических лекарственных препаратов можно разделить на две основные взаимосвязанные группы: «Фармакопейные требования и регулирующие документы» и «Методическое обеспечение», под которым обычно понимают комбинацию биологических и физико-химических методов с их метрологическим обеспечением в виде стандартных образцов. Разнообразие биологических лекарственных препаратов предусматривает дифференцированный подход к оценке качества, что находит отражение в международных и отечественных фармакопейных и регуляторных требованиях. Однако, установленные требования, как правило, имеют общий характер и не могут учитывать особенности отдельной технологии. Кроме того, создание новых препаратов, их регистрация и ввод в гражданский оборот всегда предшествует разработке фармакопейных требований.

В настоящее время регулирование производства и обращения биологических лекарственных препаратов переживает переходный период от национальной регуляторной системы к наднациональной, формирующейся на платформе Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Фармакопея ЕАЭС вступила в действие 1 марта 2021 года и в настоящее время находится в процессе дальнейшего формирования (Коллегия ЕАЭС, Решение № 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза», 2020). В основу Фармакопеи заложена концепция гармонизации фармакопей государств-членов ЕАЭС, в которой отражена особенность Государственной фармакопеи РФ (ГФ РФ),

имеющей богатую историю и ориентированной на отечественных производителей лекарственных средств (в том числе биологических лекарственных препаратов), что отличает данный нормативный документ от фармакопей других стран Союза, практически полностью гармонизированных с Европейской фармакопеей (ЕФ). При этом базовой признана Европейская Фармакопея.

Вместе с тем продолжается работа по актуализации и дополнению Государственной фармакопеи РФ, которая остается сводом нормативных требований, отражающих особенности биологических лекарственных препаратов отечественных производителей.

Таким образом, экспертная оценка качества биологических лекарственных препаратов (в частности - физико-химических показателей качества) в условиях формирования гармонизированных регуляторных и фармакопейных требований, является многофакторной задачей, которая диктует необходимость решения конкретных вопросов в рамках уже существующей регуляторной документации ЕАЭС, а также в соответствии с основными международными специализированными документами ЕМА (Европейского агентства по оценке лекарственных средств), EDQM (Европейского директората по качеству медицинских препаратов) и документы ICH серии Q (Международного совета по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения) (AIPM. Биологические и биоподобные лекарственные средства, 2013; AIPM. Руководства ICH для фармацевтической области, 2017).

Существенным фактором, влияющим на методологию оценки качества биологических лекарственных препаратов, является обязательное соответствие методических решений требованиям к работе лабораторий, аккредитованным в системе менеджмента качества (ГОСТ ISO/IEC 17025-2019, 2021). Внедрение в лабораторную практику высокотехнологичного оборудования позволяет разрабатывать новые методики, обладающие большей чувствительностью и прецизионностью. Разнообразие методических решений создает технические проблемы при оценке качества образцов биологических лекарственных препаратов, заключающиеся в необходимости наличия разнообразного оборудования, редко используемых реактивов и материалов, отсутствии технических навыков персонала контрольно-аналитических лабораторий при воспроизведении оригинальных методик производителей (S. A. Cohen et al., 1993; J. Perucho et al., 2015; S. Deng et al., 2016; J. Pan et al., 2016; E. Shardlowa et al., 2021). Кроме того, использование различных подходов и методов оценки для одних и тех же показателей качества биологических лекарственных препаратов одной группы/одного международного непатентованного наименования (МНН) не исключает возможности появления отличий основных характеристик, что может быть нежелательным для обеспечения безопасности и эффективности биологических лекарственных препаратов.

Таким образом, разработка и актуализация нормативно-правовых документов, основанных на принципах гармонизации международных и отечественных регуляторных требований к биотехнологическим медицинским препаратам; разработка унифицированных методик оценки качества, учитывающих особенности действующего вещества, полученного биотехнологическим путем; разработка стандартных образцов, предназначенных для оценки подлинности структуры терапевтических белков, полученных с применением технологии рекомбинантной ДНК, являются актуальным направлением развития медицинской биотехнологии - совершенствования методологии оценки качества биологических лекарственных препаратов.

Степень разработанности темы исследования

Общие требования к оценке качества биологических лекарственных препаратов изложены в Государственной фармакопее РФ в виде общих фармакопейных статей: ОФС.1.7.1.0010.18 «Биологические лекарственные препараты», ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные препараты, получаемые методами рекомбинантных ДНК», ОФС.1.7.1.0018.18 «Иммунобиологические лекарственные препараты» (ГФ XIV издания, 2018).

В Европейской фармакопее данная информация изложена в виде общих монографий (general monographs): «Vaccines for human use» 04/2022:0153; «Recombinant DNA technology products» 04/2019:0784; «Immunosera for human use, animal» 04/2021:0084; «Allergen product» 01/2022:1063; «Monoclonal antibodies for human use» 07/2023:2031 (ЕФ 11.7, 2024).

Фармакопея ЕАЭС в части требований к биологическим лекарственным препаратам находится в стадии формирования.

Применительно к объектам исследования, Европейская фармакопея содержит монографии: «Interferon alfa-2 concentrated solution» 07/2015:1110; «Interferon beta-1a concentrated solution» 01/2009:1639; «Human coagulation factor VIIa (rDNA) concentrated solution» 01/2015:2534; «Aluminum in absorbed vaccines» 01/2008:20513 (ЕФ 11.7, 2024).

Согласно монографии Европейской фармакопеи 07/2015:1110 для подтверждения структуры молекулы rIFN-alfa2b используют комплекс методов и стандартный образец CRS, кат. № I0320301, представляющего собой очищенный rIFN-alfa2b не содержащий N-концевой метионин (rIFN-alfa2b(no-Met)), что может быть неприемлемо для пептидного картирования rIFN-alfa2b, содержащего N-концевой метионин (rIFN-alfa2b(Met)).

Согласно монографии Европейской фармакопеи 01/2009:1639 для подтверждения структуры молекулы rINF-beta1a используют комплекс методов и стандартный образец CRS, кат. № Y0001101. Требования к оценке качества rINF-beta1b и стандартный образец отсутствуют. Приведенные требования неприемлемы для подтверждения структуры молекулы rINF-beta1b, так как данный белок не гликозилирован и нестабилен в щелочной среде, предусмотренной для ферментативного гидролиза, согласно протоколу вышеуказанной монографии.

Согласно монографии Европейской фармакопеи 01/2015:2534 для подтверждения структуры молекулы рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa используют комплекс методов, включая оценку гликанов, и стандартный образец CRS, кат. № Y0001663. Нормативная документация на лекарственные препараты, прошедшие процедуру регистрации ранее выхода данной монографии (2015 г.), не предусматривала оценку профиля гликоформ.

Международные и отечественные фармакопейные требования к PEG-модифицированным белкам на момент выполнения данного исследования отсутствовали, за исключением краткого документа European Medicines Agency (EMA) «Руководство по описанию состава пегилированных белков в краткой характеристике препарата» (EMA. Guidance on the description of pegylated (conjugated) proteins in the SPC, 2003). Также отсутствовали требования к качеству лекарственных средств на основе рекомбинантных факторов свертывания крови и рекомбинантных интерферонов в Государственной фармакопее РФ.

Согласно монографии Европейской фармакопеи 01/2008:20513 определение ионов алюминия в сорбированных вакцинах может быть проведено методом

комплексонометрического титрования (ЕФ 11.7, 2024). В Государственной фармакопее РФ методика количественной оценки алюминия изложена в ОФС.1.7.2.0016.15 «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах» (ГФ XIV издания, 2018).

Международные и отечественные фармакопейные методики оценки полисорбата 80 отсутствовали. Колориметрическое определение полисорбата 80 основано на образовании окрашенных полисорбат-тиоционатных комплексов разных металлов (кобальта, железа, молибдена) с последующей экстракцией в органическую фазу (J. Kim et al., 2014; N. Savjani et al., 2014). Методики высокоэффективной жидкостной хроматографии, основанные на УФ-детектировании (M. Adamo et al., 2010), предполагают детекцию производных полисорбата 80 по олеиновой кислоте. Известны методики прямого определения полисорбата 80 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением детекторов заряженного аэрозоля, углового светорассеяния, а также масс-спектрометрического детектирования (L.M. Nair et al., 2003; S. Fekete et al., 2010; A. Christiansen et al., 2011; V. S. Nayak et al., 2012; D. Ilko et al., 2015).

Методики количественной оценки аминокислот, описанные в монографии Европейской фармакопее 2.2.56 Amino Acid analysis (ЕФ 11.7, 2024), предполагают пост-или предколлоночную дериватизацию и ориентированы на аминокислотный анализ белка, т.е. предполагают предварительный гидролиз белковой молекулы, что неприемлемо для биологических лекарственных препаратов, где молекула целевого белка должна быть предварительно элиминирована. Также известны методики прямого определения аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим или интегрированным импульсным амперометрическим детектированием (H. Yu et al., 2002; Z. Liu et al., 2019).

Цель исследования - совершенствование методологии оценки физико-химических показателей качества медицинских биологических лекарственных препаратов в условиях развития аналитических технологий и гармонизации фармакопейных требований.

Задачи исследования:

1. Провести анализ современного состояния оценки физико-химических показателей качества ряда востребованных биологических лекарственных препаратов (препаратов рекомбинантных интерферонов, рекомбинантных факторов свертывания крови, PEG-модифицированных белков, вакцин, анатоксинов, иммуноглобулинов).

2. Разработать нормативные документы, содержащие гармонизированные с международными нормативными документами требования к оценке подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных интерферонов, рекомбинантных факторов свертывания крови, PEG-модифицированных рекомбинантных белков.

3. Разработать требования к процедуре разработки и аттестации стандартных образцов, предназначенных для оценки подлинности структуры молекулы рекомбинантных терапевтических белков.

4. Разработать индивидуальные программы аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры рекомбинантных негликозилированных белков (интерфероны альфа и бета).

5. Разработать индивидуальную программу аттестации стандартного образца подтверждения подлинности рекомбинантного гликозилированного белка (седьмой активированный фактор свертывания крови).

6. Разработать унифицированную методику селективной оценки различных аминокислот, используемых при производстве биологических лекарственных препаратов.

7. Разработать унифицированные методики оценки вспомогательных веществ полисорбата 80 и алюминия, используемых при производстве биологических лекарственных препаратов.

Научная новизна исследования

Совершенствование методологии контроля физико-химических показателей качества медицинских биопрепаратов, в том числе подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций биотехнологических медицинских продуктов, проведено путем разработки новых и актуализации существующих методических решений и нормативных документов, учитывающих современные тенденции разработки, регистрации и обращения биологических лекарственных препаратов.

Впервые разработана классификация и фармакопейные требования к оценке подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных факторов свертывания крови, фармакопейные требования к номенклатуре контролируемых показателей качества рекомбинантных терапевтических белков модифицированных PEG и фармакопейные требования к оценке подлинности первичной структуры рекомбинантных интерферонов альфа-2b и бета-1b, нашедшие отражение в общих фармакопейных статьях, предназначенных для Государственной фармакопеи Российской Федерации и имеющих статус «вводится впервые».

Впервые разработаны и представлены в виде универсального алгоритма требования к разработке и аттестации стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков, позволяющие разрабатывать индивидуальные программы аттестации независимо от наличия международных стандартных образцов.

Впервые разработаны фармакопейные стандартные образцы, предназначенные для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности рекомбинантных интерферонов альфа-2b и бета-1b (ФСО.3.2.00433, ФСО.3.2.00456 и ФСО.3.2.00477), в ходе аттестации которых методом масс-спектрометрии высокого разрешения изучены структуры основных, полученных в результате ферментативного гидролиза, пептидов, формирующих характеристические пики на соответствующих пептидных картах, и показана специфичность пептидов верифицированной аминокислотной последовательности исходного белка.

Методом масс-спектрометрии высокого разрешения изучена структура N-гликанов молекулы рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa, установлено отличие профиля N-гликозилирования отечественного препарата от оригинального препарата, заключающееся в количественном преимуществе дисаилированной олигоформы, состоящей из 4-х остатков N-ацетилглюкозамина, 3-х маннозных и 2-х галактозных остатков.

Впервые разработаны условия ферментативного гидролиза рекомбинантного интерферона бета-1b, позволяющие в комплексе с последующим высокоэффективным хроматографическим разделением контролировать подлинность структуры вновь

получаемых серий вышеуказанного белка путем получения специфичной пептидной карты (Патент на изобретение РФ № 2780675).

Впервые разработана унифицированная методика высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия для контроля качества медицинских биопрепаратов по количественному содержанию глицина (Патент на изобретение РФ № 2700831) и аминокислот в составе их смеси, основанная на использовании доступного для всех производителей УФ-детектирования продуктов хроматографического разделения без получения химических производных аналита, селективно в рамках одного анализа.

Впервые разработана унифицированная методика эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии для контроля качества медицинских биопрепаратов по количественному содержанию полисорбата-80, основанная на использовании доступного для всех производителей УФ-детектирования продуктов хроматографического разделения без получения химических производных аналита (Патент на изобретение РФ № 2812788).

Впервые разработана унифицированная методика атомно-абсорбционного спектрометрии с электротермической атомизацией для контроля качества медицинских биопрепаратов по количественному содержанию ионов алюминия, основанная на использовании для электротермической ионизации щелочного гидролизата (Патент на изобретение РФ № 2799235).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Использование комплексного подхода к совершенствованию методологии оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов, заключающегося в разработке и актуализации нормативных и регуляторных документов, а также разработке стандартных образцов и методик контроля качества, позволяет оптимизировать процесс теоретической и лабораторной фармацевтической экспертизы физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов, что обеспечивает эффективность и безопасность их применения.

Наличие фармакопейных требований, гармонизированных с международными нормативными документами и отражающих особенности российских медицинских биотехнологических препаратов, способствует формированию единой регуляторной платформы обращения лекарственных средств в рамках задач Евразийского экономического союза, а разработка стандартных образцов, предназначенных для контроля подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков, в том числе стандартных образцов, являющихся полноценной заменой международным стандартным образцам, способствует обеспечению технологической независимости Российского биофармацевтического рынка.

Разработанные нормативные документы, содержащие фармакопейные, гармонизированные с международными нормативными документами, требования к оценке подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных интерферонов, рекомбинантных факторов свертывания крови, PEG-модифицированных рекомбинантных белков, позволяют унифицировать требования к разработке препарата и материалам, представляемым в регистрационном досье на препарат и оптимизируют процесс регистрационной и пострегистрационной экспертизы.

Разработанные требования к аттестации стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков, представленные в виде универсального алгоритма, позволяют разрабатывать индивидуальные программы аттестации независимо от наличия международных стандартных образцов, унифицируют требования к материалам по стандартным образцам, представляемым в регистрационном досье на препарат и оптимизируют процесс регистрационной и пострегистрационной экспертизы.

Разработанные и аттестованные фармакопейные стандартные образцы рекомбинантных интерферонов альфа-2b содержащих (ФСО.3.2.00433) и не содержащих (ФСО.3.2.00456) N-концевой метионин, а также рекомбинантного интерферона бета-1b (ФСО.3.2.00477) позволяют оценивать подлинность первичной структуры каждой новой серии соответствующих белков независимо от наличия международных стандартных образцов, а также стандартизуют условия данной оценки на разных предприятиях и в контрольных лабораториях.

Разработанный и аттестованный стандартный образец предприятия для оценки подлинности аминокислотной последовательности и профиля гликозилирования рекомбинантного седьмого активированного фактора свертывания крови позволяет оценивать подлинность первичной структуры и профиля гликозилирования каждой новой серии данного белка, независимо от наличия международного стандартного образца.

Разработанная унифицированная методика высокоэффективной хроматографии гидрофильного взаимодействия для селективного определения аминокислот (глицин, гистидин, метионин, пролин, аргинин, лизин и их смеси) рассчитана на широкий спектр биологических лекарственных препаратов и позволяет проводить прямое количественное определение одной или нескольких аминокислот, входящих в состав препарата, в ходе одного анализа без предварительной дериватизации аналита.

Разработанная унифицированная методика эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения полисорбата 80 рассчитана на широкий спектр биологических лекарственных препаратов и позволяет проводить прямое количественное определение полисорбата 80 без предварительной дериватизации аналита.

Разработанная методика атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией для определения ионов алюминия в биологических лекарственных препаратах позволяет проводить контроль качества на высокотехнологичном уровне, рассчитана на биологические лекарственные препараты, содержащие в качестве адьюванта гель гидроксида или фосфата алюминия. Показана взаимозаменяемость разработанной методики и фармакопейной методики комплексометрического титрования, что расширяет возможности производителей в выборе метода контроля качества.

Полученные результаты внедрены в научную и практическую деятельность ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (акт внедрения ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России от 07.12.2023) и систематизированы в следующих научно-методических изданиях и проектах нормативных документов федерального уровня (фармакопейных статьях), предназначенных для включения в Государственную фармакопею РФ: «Руководство по экспертизе лекарственных средств». Том IV.-М.: Полиграф-Плюс, 2014 - 172 с. Глава 8 - «Разработка

биоаналогичных (биоподобных) препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции интерферон бета», Глава 9 - «Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции интерферон альфа»; «Руководство по экспертизе лекарственных препаратов крови», раздел «Рекомбинантные факторы свёртывания крови» и общая фармакопейная статья «Факторы свертывания крови человека (генно-инженерные, рекомбинантные)»; «Руководство по экспертизе иммунобиологических лекарственных препаратов» Глава 11 – «Количественное определение аминокислот в иммунобиологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия» и общая фармакопейная статья «Определение аминокислот в препаратах иммуноглобулинов методом гидрофильного взаимодействия»; «Руководство по экспертизе лекарственных средств для медицинского применения», раздел «Общие требования к экспертной оценке качества лекарственных препаратов на основе рекомбинантных интерферонов альфа, рекомбинантных интерферонов бета и PEG-модифицированных рекомбинантных интерферонов», общие фармакопейные статьи «Интерфероны» и «Пегилированные (конъюгированные) терапевтические белка, полученные с применением технологии рекомбинантной ДНК» и фармакопейная статья «Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b, субстанция раствор, раствор замороженный»; Руководство «Требования к стандартным образцам в досье на биологические лекарственные средства», раздел 2, подраздел 2.1. «Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности рекомбинантных терапевтических белков».

Разработанный алгоритм аттестации стандартных образцов, предназначенных для оценки подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков, используется АО «Генериум» при разработке индивидуальных программ аттестации стандартных образцов предприятия рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa (акт внедрения от 15.09.2021), ООО «НПП «Фармаклон» (акт внедрения от 08.06.2022) и ООО «Фармапарк» (акт внедрения от 20.09.2021) при разработке индивидуальных программ аттестации стандартных образцов предприятия интерферона альфа-2b.

Разработанный и аттестованный стандартный образец предприятия для оценки подлинности аминокислотной последовательности и профиля гликозилирования рекомбинантного седьмого активированного фактора свертывания крови используется ООО «МБЦ «Генериум» (акт внедрения от 25.04.2019).

Разработанный и аттестованный фармакопейный стандартный образец рекомбинантного интерферона альфа-2b, содержащего N-концевой метионин (ФСО 3.2.00433), применяется ООО «Фармапарк» (акт внедрения от 20.09.2021) и ООО «Фармаклон» (акт внедрения от 30.12.2021). Разработанный и аттестованный фармакопейный стандартный образец рекомбинантного интерферона альфа-2b, не содержащего N-концевой метионин (ФСО.3.2.00456), применяется ООО «Ферон» (акт внедрения от 22.01.2024). Разработанный и аттестованный фармакопейный стандартный образец рекомбинантного интерферона бета-1b (ФСО 3.2.00447) применяется АО «Генериум» (акт внедрения от 15.09.2021).

Разработанная и валидированная методика определения полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах методом эксклюзионной ВЭЖХ применяется при оценке качества препаратов моноклональных антител по показателю качества «Полисорбат 80» ОА «Генериум» (акт внедрения от 20.02.2024).

Разработанная и валидированная методика селективного определения аминокислот в биологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия» применяется ОА «Генериум» при оценке качества препаратов терапевтических рекомбинантных белков, в том числе моноклональных антител, по показателям «Количественное содержание аргинина», «Количественное содержание гистидина», «Количественное содержание метионина» (акт внедрения от 22.12.2023).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация по тематике, методам исследования, научным положениям и выводам соответствует паспорту специальности: 1.5.6 – Биотехнология (п.12 и п.29).

Методология и методы исследования

Методология работы соответствовала цели и задачам исследования. Исследование включало выполнение теоретического и экспериментального этапов работ. Теоретический этап работы состоял в разработке гармонизированных с международными документами, фармакопейных требований к оценке подлинности рекомбинантных факторов свертывания крови, интерферонов альфа и бета, PEG-модифицированных терапевтических белков, а также разработки требований к процедуре аттестации стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков и систематизации этих требований в виде универсального алгоритма аттестации. Экспериментальный этап работы состоял в практическом применении разработанного алгоритма аттестации путем разработки и реализации индивидуальных программ аттестации стандартных образцов негликозилированных белков (интерфероны альфа и бета) и гликозилированных белков (рекомбинантный фактор свертывания крови VIIa), предназначенных для подтверждения подлинности структуры молекулы соответствующего белка, а также оптимизации определения вспомогательных веществ, путем разработки унифицированных методик количественной оценки.

Материалы и методы исследования

Образцы лекарственных средств и стандартные образцы

1. Субстанции рекомбинантного интерферона альфа-2b (rINF-alfa2b) содержащие и не содержащие N-концевой метионин производства ООО «Фармапарк», Россия; ООО НПП «Фармаклон», Россия; ЗАО «Вектор-Медика», Россия; ООО «Фирн М», Россия.

2. Субстанции рекомбинантного интерферона бета-1b (rINF-beta1b), производства АО «Генериум», Россия; ЗАО «Биокад», Россия.

3. Препараты рекомбинантного фактора свертывания крови VII активированного (rFVIIa) - Эптаког альфа: производства АО «Генериум», Россия и «Ново Нордиск А/С», Дания.

4. Препарат рекомбинантного фактора свертывания крови VIII (rFVIII) - Мороктоког альфа, производства АО «Генериум».

5. Препарат рекомбинантного фактора свертывания крови VIII (rFVIII) - Туроктоког альфа, производства «Ново Нордиск А/С», Дания.

6. Препарат рекомбинантного фактора свертывания крови VIII (rFVIII) - Октоког альфа, производства), «Такеда Мануфекчуринг Австрия АГ», Австрия.

7. Препарат «ПолиовакСин» (вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина), ООО «ИНВАК», Россия.

8. Препарат «Превенар 13» (вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная, тринадцативалентная), ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия.

9. Препарат «Гам-КОВИД-Вак» (комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2), филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Россия.

10. Препарат «Лайфферон» (интерферон альфа-2b - 3 млн МЕ), АО «Вектор Медика», Россия.

11. Препарат «Хумира» (Адалимумаб), ООО "ЭббВи", Россия.

12. Препарат «Хайцентра» (иммуноглобулин человека нормальный), «СиЭсЭл Беринг АГ», Швейцария.

13. Препарат иммуноглобулина человека нормальный, раствор для внутримышечного введения, ОБУЗ «Ивановская станция переливания крови», Россия.

14. Препарат иммуноглобулина человека нормальный, раствор для инфузий, АО «НПО «Микроген», Россия.

15. Препарат иммуноглобулина человека противостолбнячный, раствор для внутримышечного введения, АО «НПО «Микроген», Россия.

16. Препарат «Иммуновенин», иммуноглобулин человека нормальный, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, АО «НПО «Микроген», Россия.

17. Препарат «Фанди» (фактор свертывания крови VIII + фактор Виллебранда), Институт Гриффолз, С.А., Испания.

18. Препарат «Элоктейт» (Эфмороктоког альфа), Веттер Фарма-Фертигунг ГмбХ и Ко, Германия и Патеон Италия С.п.А., Италия.

19. Вакцина против гепатита В, ООО «Комбиотех», Россия.

20. Вакцина против гепатита В, Серум Инститьют, Индия.

21. АДС-М-анатоксин, АО «НПО «Микроген», Россия.

22. Анатоксин стафилококковый, Филиал "Медгамал" НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, Россия.

23. Препарат «ЭпиВакКорона» (вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19), ФБУН ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия.

24. Препарат «Адасель» (вакцина для профилактики дифтерии (с уменьшенным содержанием антигена), коклюша (с уменьшенным содержанием антигена, бесклеточная) и столбняка адсорбированная, Санофи Пастер Лимитед, Канада.

25. Препарат «Инфанрикс Гекса» (вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), полиомиелита (инактивированная), гепатит В комбинированная адсорбированная и капсульный полисахарид *Haemophilus influenzae* тип b конъюгированный со столбнячным анатоксином, адсорбированный), «ЗАО ГлаксоСмитКляйн Трейдинг», Россия.

26. Препарат «Пентаксим», вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b конъюгированная, Санофи Пастер С.А., Франция.

27. Тетраанатоксин, анатоксин ботулинический, анатоксин столбнячный, АО «НПО «Микроген», Россия.

28. АКДС- вакцина (коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная), АО «НПО «Микроген», Россия.

29. АС-анатоксин (столбнячный очищенный адсорбированный жидкий), АО «НПО «Микроген»», Россия.

30. АДС-анатоксин (дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный жидкий), АО «НПО «Микроген»», Россия.

31. АД-М-анатоксин (дифтерийный очищенный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена – жидкий), АО «НПО «Микроген»», Россия.

32. АС-анатоксин (столбнячный очищенный адсорбированный жидкий для доноров), АО «НПО «Микроген»», Россия.

33. Европейский стандартный образец rINF-alfa2b (no-Met) - CRS (EDQM, кат. № I0320301).

32. Европейский стандартный образец rINF-beta1b - CRS (EDQM, кат. № Y0001101).

33. Европейский стандартный образец rFVIIa - CRS (EDQM, кат. № Y0001663).

34. Международный стандартный образец иммуноглобулина человека нормальный (для оценки молекулярных параметров), BRP (EDQM, кат. № Y0000488/2.00).

35. Фармакопейный стандартный образец - ФСО 3.1.00423 содержания алюминия в сорбированных препарат (1660 мг/л ионов алюминия), Россия.

36. Фармакопейный стандартный образец - ФСО 3.1.00333 содержания алюминия в сорбированных препаратах (810 мг/л ионов алюминия), Россия.

37. Государственный стандартный образец - ГСО 7758-2000 ионов алюминия (1000 мг/л ионов алюминия), ЭАА Эко-аналитика, Россия.

38. ICP Al Standard (1000 мг/л ионов алюминия), Merck, Германия.

Метод масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС) с ионизацией электрораспылением (ESI) и вторичной ионизацией, инициируемой соударениями (CID)

Регистрируемые массы пептидов идентифицировали с учетом возможных модификаций, характерных для соответствующих молекул:

- для rINF-alfa2b и rINF-beta1b: окисление аминокислотных остатков метионина, триптофана; деамидирование аминокислотных остатков глутамина, аспарагина; карбамидометилирование аминокислотных остатков цистеина; присоединение ионов натрия по остаткам глутаминовой, аспарагиновой аминокислот и С-концевым аминокислотным остаткам; формилирование, дегидратация;

- для rFVIIa: окисление аминокислотных остатков метионина; алкилирование аминокислотных остатков цистеина; дезаминирование аминокислотных остатков глутамина и аспарагина (Asn145 лёгкой и Asn170 тяжёлой цепей) при дегликозилировании; наличие О-гликозилирования (Ser52 и Ser60 лёгкой цепи); модификация глутамина с образованием пироглутаминовой кислоты; гамма-карбоксилирования глутаминовой кислоты (6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 35 положения лёгкой цепи); гидроксильирования аминокислотных остатков аспарагина.

Верификацию аминокислотной последовательности кандидата ФСО rINF-alfa2b (Met) проводили с использованием хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) и колонки на основе C18. Мобильная фаза А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде. Мобильная фаза В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Масс-спектрометрический анализ проводили на тандемном масс-спектрометре LTQ FT Ultra (Thermo Finnigan, США), поиск и идентификация белков осуществляли в программе Mascot, version 2.0.04 (MatrixScience, Великобритания). Поиск и идентификация несвязанных пептидов осуществляли в программе PeaksStudio 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада), для возможных белков-контаминантов - база данных белков человека SWISS-PROT_HUMAN (EMBL&SIB, Швейцария). Поиск и

идентификация пептидов, связанных дисульфидными мостиками, осуществляли в программе MeroX2.0.1.4 (StavroX.com, ©MichaelGötze, University of Halle-Wittenberg, Германия). Для идентификации использовали аминокислотную последовательность, указанную в ЕФ 07/2015:1110 с учетом наличия N-концевого метионина (ЕФ 11.7, 2024).

Верификацию аминокислотной последовательности кандидата ФСО rINF-alfa-2b (no-Met) проводили с использованием системы ультра-ВЭЖХ UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США). Для определения точной моноизотопной массы использовали колонку MAbPac RP, (кат. № 088647, Thermo Scientific, США). Мобильная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в деионизованной воде. Мобильная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в смеси ацетонитрил:изопропанол (30:70). Для верификация аминокислотной последовательности использовали колонку Waters Acquity UPLC CSH C18 (кат.№ 186005298, Waters, США). Мобильная фаза А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде. Мобильная фаза В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Масс-спектрометр Brukerma Xis II 4G ETD (Bruker, США), программа CompassHyStar из программного пакета BrukerCompass (Biopharma Compass, США). Для идентификации использовали аминокислотную последовательность, указанную в ЕФ 07/2015:1110 (ЕФ 11.7, 2024).

Верификацию аминокислотной последовательности кандидата ФСО rINF-beta1b проводили с использованием системы ВЭЖХ Infinity 1260 Capillary LC System (Agilent Technologies, США) с колонкой ProtID-Chip-43 (кат. №G4240-62005, Agilent Technologies, США). Мобильная фаза А: смесь 0,18% раствора формиата аммония и 0,11% раствора муравьиной кислоты в деионизированной воде. Мобильная фаза В: смесь 9,91% мобильной фазы А и 0,09% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле. Разделение пептидов проходило в нанопотоковом режиме на устройстве ProtID-Chip-43 (AgilentTechnologies, США). Для анализа результатов использовали программное обеспечение Peaks ABv.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада). Для идентификации использовали аминокислотную последовательность, указанную в патентах (Д.И. Баирамашвили и др., патент 2261913, 2005; А.И. Бобрускин и др., патент 2473696, 2013).

Для верификации аминокислотной последовательности кандидата СОпр rFVIIa применяли схему простого трипсинолиза согласно протоколу ЕФ 01/2015:2534 (ЕФ 11.7, 2024) и схему усиленного гидролиза с предварительным восстановлением и дегликозилированием путем ферментативного расщепления N-гликанов пептид-N-гликозидазой F с последующим трипсинолизом, используя набор для дегликозилирования GLYКОprep (Prozime, США, кат. № GP96NG-AB). Для разделения продуктов гидролиза использовали систему ВЭЖХ Nexera X2 с детектором SPD M-30A (Shimadzu, Япония) с колонкой Acquity UPLC peptide BEH C18 (кат. № 02513608316819, Waters, США). Мобильная фаза А: смесь 0,01% раствора ТФУ и 0,08% раствора муравьиной кислоты в деионизированной воде. Мобильная фаза В: смесь 0,01% раствора ТФУ и 0,08% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле. Детектор 6500 iFunnel QTOF LC/MS (Agilent Technologies, США). Программа - Mass Hunter Qualitative Analysis v. B.07.00 SP2 с модулем BioConfirm B.08.00 (AgilentTechnologies, США). Для идентификации использовали аминокислотную последовательность, указанную в ЕФ, 01/2015:2534 (ЕФ 11.7, 2024).

Подготовку образцов для оценки профиля гликозилирования проводили путем дегликозилирования белка ферментом пептид-N-гликозидазой, разделением полученной смеси белка/олигосахаридов ультрацентрифугированием и флуоресцентным мечением

олигосахаридов, используя набор для дегликозилирования GLYKOPrep (Prozime, США, кат. № GP96NG-AB). При интерпретации результатов учитывали, что молекула фактора свёртываемости VII содержит два потенциальных сайта N-гликозилирования (Asn145 и Asn322), а также что преобладающие гликоформы - комплексные биантенные гликаны - различаются по количеству концевых остатков сиаловой кислоты и могут содержать замену галактозы на N-ацетилгалактозамина (А.В. Петров и др., патент 2448160, 2012).

Для MS-детектирования гликанов, полученных при ВЭЖХ-анализе гидрофильного взаимодействия использовали детектор 6550 iFunnel QTOF LC/MS (Agilent Technologies, США). Поиск олигосахаридных структурных элементов проводили с помощью программного обеспечения MassHunter Qualitative Analysis v.B.07.00 SP2 с модулем BioConfirm v.B.08.00 (Agilent Technologies, США). Фильтрация списков зарегистрированных масс проводилась в программе Glyco Workbench, ver. 2.1 (EUROCarbDB, Великобритания) с использованием международной базы данных GlycomeDB (Великобритания).

Для MS-анализа пептидов, соответствующих характеристическим пикам, полученных в результате пептидного картирования кандидата ФСО rINF-alfa2b (Met) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, использовали масс-спектрометр LTQ FT Ultra (ThermoFinnigan, США). Списки точных масс пептидов и масс их фрагментов использовали для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Mascot, version 2.0.04 (MatrixScience, Великобритания). Для поиска возможных белков-контаминантов и возможных модификаций и мутаций использовали базу SWISS-PROT_HUMAN (EMBL&SIB, Швейцария) и PeaksStudio 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада).

Для MS-анализа пептидов, соответствующих характеристическим пикам, полученных в результате пептидного картирования кандидата ФСО rINF-alfa2b (no-Met) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, использовали масс-спектрометр Bruker maXis II 4G ETD (Bruker, США). Проведение анализа и сбор данных производили в интегрированных программных пакетах Chromeleon 7.2 (ThermoFisher Scientific, США) и Bruker Compass (CompassHyStar) (Bruker Compass 2021, США). Для идентификации использовали аминокислотную последовательность, указанную в ЕФ 07/2015:1110 (ЕФ 11.7, 2024).

Для MS-анализа пептидов, соответствующих характеристическим пикам, полученных в результате пептидного картирования кандидата ФСО rINF-beta1b методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, использовали систему Infinity 1260 CapillaryLCSystem (Agilent Technologies, США) с колонкой ProtID-Chip-43 (кат. №G4240-62005, Agilent Technologies, США). Мобильная фаза А: смесь 0,18% раствора формиата аммония и 0,11% раствора муравьиной кислоты в воде деионизированной. Мобильная фаза В: смесь 9,91% раствор мобильной фазы А и 0,09% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле. Масс-спектрометрический детектор QTOF 6550 (Agilent Technologies, США) в комплексе ProtID-Chip-43 (Agilent Technologies, США) и PeaksABv.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада).

Метод ВЭЖХ с УФ-детектированием (обращенно-фазовая хроматография)

Использовали для пептидного картирования кандидатов ФСО INF альфа-2b (метиониновая и безметиониновая формы). Образцы анализировали по протоколу ЕФ 07/2015:1110 (ЕФ 11.7, 2024) с использованием системы ВЭЖХ Infinity 1260 (Agilent Technologies, США); Alliance e2695 (Waters, США); Acquity (Waters, США); NexeraX2 (Shimadzu, Япония) и УВЭЖХ Ultimate 3000 (ThermoFischer Scientific, США) разных

лабораторий. Разделение продуктов трипсинолиза проводили на колонке YMC C18 (кат. № AA30S051046, США) -метиониновая и безметиониновая формы и Protein&PeptideC18 (кат.№218TP5410, GraceVydac) - безметиониновая форма.

Использовали для пептидного картирования кандидата ФСО INF бета-1b. Образцы анализировали по оригинальной методике, разработанной в рамках настоящей работы (Патент РФ на изобретение № 2780675), используя системы ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США); NexeraX2 (Shimadzu, Япония) и Acquity (Waters, США) и колонку YMC-PackODS (кат.№ 0410006924, США). Мобильная фаза А: 0,1% раствор ТФУ в воде деионизированной. Мобильная фаза В: 0,1% раствор ТФУ в ацетонитриле.

Использовали для пептидного картирования кандидата СОпр рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa. Образцы анализировали по протоколу ЕФ 01/2014:2534 (ЕФ 11.7, 2024) с использованием системы ВЭЖХ Nexera X2 с детектором SPD M-30A (Shimadzu, Япония) и колонки WatersAcquity UPLC peptide VEN C18 (кат. № 02513608316819, США).

Метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием (анионообменная хроматография)

Использовали при оценке гликанового профиля кандидата СОпр рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa. Образцы анализировали с использованием систем ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США) и Nexera X2 (Shimadzu, Япония). Колонка Dionex CarboPac PA-100 (кат.№ 005821, ThermoScientific). Мобильная фаза А: 0,6 % раствор натрия гидроксида в воде деионизированной. Мобильная фаза В: смесь 0,6 % раствора натрия гидроксида и 4,1 % раствора натрия ацетата в воде деионизированной. Флуоресцентный детектор - возбуждение 330 нм, эмиссия 420 нм.

Метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием (гидрофильная хроматография)
Использовали при оценке гликанового профиля кандидата СОпр рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa. Образцы анализировали с использованием системы ВЭЖХ Waters e2695 Alliance (Waters, США) и колонки Tosoh Biosciences TSKgel Amide-80 (кат.№89A00013C, Япония). Мобильная фаза А: смесь 0,38 % раствора формиата аммония (рН 4.5) и 75% раствора ацетонитрила в воде деионизированной. Мобильная фаза В: смесь 0,72 % раствора формиата аммония (рН 4.5) и 54% раствора ацетонитрила в воде деионизированной. Флуоресцентный детектор - возбуждение 330 нм, эмиссия 420 нм.

Метод ВЭЖХ с УФ-детектированием (эксклюзионная хроматография)

Использовали для количественной оценки полисорбата 80. Образцы анализировали на жидкостном хроматографе Waters Alliance 2695 (США), с диодно-матричным УФ-детектором по оригинальной методике, разработанной в рамках настоящей работы (Патент РФ на изобретение № 2812788) с использованием колонки TSKgel G2000SWXL (TosohBiosciences, кат.№ 0008540, Япония). Для твердофазной экстракции использовали установку Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Германия) и картриджи Oasis HLB (кат.№ WAT094225, WatersOasis, США). Упаривали ацетонитрил на вакуумном концентраторе Speed-Vac (ThermoFisher Scientific, США) при температуре 65 °С.

Метод ВЭЖХ с УФ-детектированием (HILIC- хроматография)

Использовали для количественной оценки аминокислот. Образцы анализировали на жидкостном хроматографе Waters Alliance e2695 (США) с диодно-матричным УФ-детектором по оригинальной методике, разработанной в рамках настоящей работы (Патент РФ на изобретение № 2700831) с использованием колонки SeQuant ZIC-HILIC (Merck, кат.№ 1.50458.0001, Германия).

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ААС-ЭТ)

Использовали для количественной оценки ионов алюминия. Образцы анализировали на атомно-абсорбционном спектрометре Agilent Technologies GTA 120 Graphite Tube Atomizer (Agilent Technologies, США) с электротермической атомизацией по оригинальной методике, разработанной в рамках настоящей работы (Патент РФ на изобретение № 2799235).

Метод комплексонометрического титрования

Методику воспроизводили в соответствии с ГФ РФ ОФС 1.7.2.0016.15 «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах» (ГФ XIV издания, 2018). Спектрофотометр PD 303S (ApeI, Япония).

Статистические методы

Статистическая обработка состояла в вычислении среднего арифметического значения, дисперсии, стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения с применением пакета Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США). Однофакторный дисперсионный анализ с расчетом критерия Фишера использовали для определения оценки сопоставимости результатов, полученных различными методиками (С. Гланц, 1999).

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии в выполнении всех этапов и разделов диссертационной работы, включая анализ состояния научной литературы и нормативно-регуляторных документов, затрагивающих область оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов. Соискателем лично обоснована тема исследования, сформулированы цель и задачи исследования; лично разработаны и гармонизированы актуальные регуляторные документы и рекомендации по оценке качества биологических лекарственных препаратов. Соискателем самостоятельно разработаны требования к аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков, а также, на основе данных требований разработаны индивидуальные программы аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры негликозилированных (интерфероны альфа и бета) и гликозилированного (рекомбинантный фактор свертывания крови VIIa) белков; определен дизайн экспериментальной работы по аттестации стандартных образцов и разработке высокотехнологичных унифицированных методик определения вспомогательных веществ; проведен анализ результатов экспериментальных исследований, в том числе исследований, проводимых совместно с представителями других организаций. Разработка способов количественной оценки полисорбата 80, аминокислот и алюминия, а также методики пептидного картирования интерферона бета-1b, включая оформление заявок на патенты, выполнены совместно с сотрудниками ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России главным экспертом, к.х.н. О.Б. Руновой; главным экспертом, к.б.н. М.Г. Коротковым; ведущим экспертом, к.б.н. В.Е. Трегубовой; ведущим экспертом О.Н. Колесниковой; ведущим экспертом Е.О. Голощановой; ведущим экспертом А.С. Минеро, экспертом 1-й категории Д.Д. Макарищевой. Масс-спектрометрическое исследование кандидатов в ФСО 3.2.00433 и ФСО.3.2.00456, проведено 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) и с руководителем

лабораторного комплекса А.А. Чувашовым (АНО ВО «Университет «Сириус»). Масс-спектрометрическое исследование кандидата в ФСО.3.2.00447 и кандидата в СОпр гFVIIa проведено совместно со с.н.с. М.Б. Дегтеревым и с.н.с, к.х.н. М.А Смолковым (АО «Генериум»). Результаты пептидного картирования для аттестации ФСО 3.2.00433 получены совместно с начальником отдела контроля качества К.Э. Хечиевой (ООО «Фармапарк»); для ФСО.3.2.00456 - совместно с начальником отдела контроля качества Г.В. Бойковой (ООО «Фирн-М»), начальником отдела контроля качества Е.А. Ивановой (ООО «Фармапарк») и руководителем лабораторного комплекса А.А. Чувашовым (АНО ВО «Университет «Сириус»); для ФСО.3.2.00447 и СОпр рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa - совместно со с.н.с. М.Б. Дегтеревым (АО «Генериум»).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанные требования к оценке физико-химических показателей качества препаратов рекомбинантных интерферонов, рекомбинантных факторов свертывания крови и РЕГ-модифицированных рекомбинантных белков гармонизированы с международными требованиями, отражают специфику отечественных производителей и позволяют унифицировать оценку качества данных препаратов.

2. Разработанный алгоритм аттестации стандартных образцов, предназначенных для оценки подлинности первичной структуры и значимых пространсионных модификаций рекомбинантных терапевтических белков, позволяет разрабатывать индивидуальные программы аттестации стандартных образцов с сохранением общих унифицированных требований к характеристике белка и присвоению аттестованного значения, а также предполагает возможность аттестации первичного стандартного образца, вне зависимости от международных стандартных образцов.

3. Применение стандартных образцов, разработанных в результате реализации индивидуальных программ аттестации фармакопейных стандартных образцов rINF- α 2b (Met, no-Met), rINF-beta1b и стандартного образца предприятия гFVIIa, позволяет оценивать подлинность структуры молекул новых серий соответствующих субстанций.

4. Применение разработанных методик количественной оценки вспомогательных веществ (полисорбата 80, аминокислот, алюминия) унифицирует контроль качества биологических лекарственных препаратов и обеспечивает его проведение на высоком технологическом уровне.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, полученных в ходе работы, обеспечивается значительным объемом проведенных исследований, применением комплекса высокотехнологичных физико-химических методов исследования, использованием широкой номенклатуры медицинских биопрепаратов для подтверждения области применения результатов исследования, получением экспериментальных данных в лаборатории, входящей в состав Испытательного центра, имеющего аккредитацию системы менеджмента качества согласно ГОСТ ISO 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий», необходимую для разработки и аттестации стандартных образцов, имеющих статус фармакопейных. Результаты диссертационной работы получены при выполнении государственных заданий ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на осуществление прикладных научных исследований и разработок в период с 2015 года по настоящее время при выполнении следующих научно-исследовательских работ:

1. 2015-2017 гг. - Научное обоснование и разработка методологии экспертизы качества, эффективности и безопасности препаратов крови, № госрегистрации 115111740010.

2. 2015-2017 гг. - Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, № госрегистрации 115111740007.

3. 2018-2020 гг. - Научное обоснование перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов, предназначенных для иммунопрофилактики инфекционных болезней, № госрегистрации АААА-А18-118021590046-9.

4. 2018-2020 гг. - Научное обоснование перспективных направлений совершенствования методологии экспертизы лекарственных средств, № госрегистрации АААА-А18-118021590049-0.

5. 2021-2023 гг. - 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 № 8 от 05.12.2023).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: II Всероссийской научной конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, 2013); XV Всероссийском форуме с международным участием «Медицинская иммунология» (Санкт-Петербург, 2015); XVI Всероссийском форуме с международным участием «Медицинская иммунология» (Санкт-Петербург, 2017); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность» (Москва, 2020).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликована 31 печатная работа: 18 статей в рецензируемых изданиях, 5 статей в других изданиях, 4 - в материалах конференций, 4 патента на изобретение РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 312 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка используемой литературы, приложения. Диссертация содержит 32 таблицы, иллюстрирована 65 рисунками. Список литературы содержит 443 источника: 105 отечественных и 338 иностранных.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ особенностей оценки подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков с целью разработки общих гармонизированных требований

На момент выполнения исследования, несмотря на длительную практику применения и высокую востребованность, отечественные фармакопейные требования к качеству препаратов интерферонов, рекомбинантных факторов свертывания крови и РЕГ-модифицированных белков не были представлены. Совершенствование методологии заключалось в разработке гармонизированных требований к оценке

подлинности структуры субстанций рекомбинантных факторов свертывания крови, субстанций рекомбинантных интерферонов альфа-2b и бета-1b, структуры и чистоты PEG-модифицированных рекомбинантных белков, производимых в Российской Федерации, а также систематизации требований к разработке и аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры.

Особенности оценки подлинности структуры и чистоты рекомбинантных интерферонов альфа и бета

Анализ международных фармакопейных требований, научной литературы и субстанций интерферонов альфа-2b отечественных производителей выявил следующие особенности:

- субстанции интерферонов альфа-2b получают с использованием *Pichia pastoris*, *Pseudomonas putida* и *Escherichia coli*, где, в условиях суперэкспрессии, может наблюдаться экспрессия молекул с неотщепленным M_1 , что приводит к получению двух форм интерферона альфа-2b: содержащей и не содержащей N-концевой метионин (П.А. Черепанов и др., патент 2242516, 2004; Д. А. Широков и др., патент 2432401, 2005; A. Ben-Bassat, 1987; M. Kamionka, 2011) - в РФ зарегистрированы и производятся 7 субстанций интерферона альфа-2b: пять субстанций безметиониновой и две субстанции метиониновой формы;

- фармакопейные требования, изложенные в ЕФ (07/2015:1110 «Interferon alpha-2 Concentrated Solution», ЕФ 11.7), ориентированы на субстанцию, не содержащую N-концевой метионин и предполагают использование стандартного образца rIFN-alfa2b CRS (I0320301), применение которого для оценки подлинности структуры субстанций, содержащих N-концевой метионин некорректно.

Анализ международных фармакопейных требований, научной литературы и субстанций интерферонов бета отечественных производителей выявил следующие особенности:

- в клинической практике в качестве первой линии терапии при рассеянном склерозе применяют рекомбинантные формы интерферона бета: подтипы бета-1a и бета-1b, имеющие существенные структурные отличия, обусловленные разными технологиями их получения, которые оказывают влияние на их физические свойства и биодоступность лекарственного препарата (A. Adams et al., 1999; P. Barbero et al., 2006; K. Baum et al., 2007; Е.В. Попова и др., 2016; M. Maurelli et al., 2018);

- интерферон бета-1a - гликозилированный белок, идентичный эндогенному интерферону бета человека, технологическая основа его производства - использование в качестве исходной клеточной линии клеток эукариот (СНО - *Chinese hamster ovary*), обеспечивающих пострансляционную модификацию рекомбинантного белка максимально приближенную к эндогенному белку (S. Orru et al., 2000);

- интерферон бета-1b является негликозилированным белком, молекула которого, в отличие от молекулы интерферона бета-1a, не содержит M_1 и имеет замену C_{16} на S_{16} . Для производства используют трансфицированные клетки прокариот (*Escherichia coli*) (Д.И. Баирамашвили и др., патент 2261913, 2005; А.И. Бобрускин и др., патент 2473696, 2013);

- международные требования, изложенные в ЕФ (01/2009:1639 «Interferon beta-1a Concentrated Solution», ЕФ 11.7), включают подтверждение подлинности аминокислотной последовательности (метод пептидного картирования) и распределения гликоформ (метод ВЭЖХ-МС). В качестве образцов сравнения указан образец Interferon

beta-1a CRS (Y0001101), применение которого для оценки подлинности структуры интерферона бета-1b некорректно;

- отечественное производство интерферона бета, ориентированное на использование продуцентов-прокариот, ограничено выпуском негликозилированного белка (интерферона бета-1b), стабильность которого может обеспечиваться добавлением человеческого сывороточного альбумина. Международные и отечественные требования, к оценке качества интерферона бета-1b отсутствуют.

В результате были сформулированные гармонизированные фармакопейные требования к оценке подлинности первичной структуры рекомбинантных интерферонов альфа и бета: приведено указание на необходимость подтверждения заявленной формы интерферона альфа-2b (метиониновая/безметиониновая) в сравнении со стандартным образцом аналогичной структуры, характеристика и аттестация которого должна быть отражена в регистрационном досье; приведено указание на необходимость подтверждения подлинности rIFN-beta1b методом пептидного картирования, предусматривающим пригодные условия ферментативного гидролиза; приведено указание на необходимость подтверждения подлинности методом пептидного картирования на стадии очищенного белка rIFN-beta1b в ходе технологического процесса до добавления стабилизатора (для соответствующей технологии); приведено описание структуры молекулы rIFN-beta1b и указание на необходимость использования стандартного образца аналогичной rIFN-beta1b структуры, характеристика и аттестация которого должна быть отражена в регистрационном досье. Разработанные требования были использованы при формировании ОФС «Интерфероны», вошедшей в XIV издание Государственной фармакопеи РФ, а также вошли Научно-методические рекомендации «Руководстве по экспертизе лекарственных средств» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Особенности оценки подлинности структуры и чистоты рекомбинантных факторов свертывания крови (РФСК)

Отличительной особенностью препаратов РФСК является структурное разнообразие молекул активного белка, что обусловлено постоянным поиском технологий, позволяющих снизить индукцию ингибиторных антител и обеспечить пролонгацию терапевтического эффекта в результате повышения порога инактивации. Данный эффект достигается путем направленной трансформации молекулы при условии сохранения целевой активности (Katherine F. Croom et al., 2008; А.А. Солдатов и др., 2016).

Анализ номенклатуры зарегистрированных в Российской Федерации и в мире препаратов РФСК позволил обозначить пять основных групп данных препаратов: РФСК VII, VIII и IX представленные полноразмерными белками, структура которых идентична эндогенным соответствующим белкам плазмы крови человека; РФСК, представляющие собой делеционные молекулы с полностью или частично элиминированным В-доменом; РФСК, полноразмерная или делеционная молекула которых PEG-модифицирована (РФСК пролонгированного действия); РФСК, молекула которых представляет собой гибридный белок состоящий из, как правило, делеционной молекулы фактора свертывания заданной активности и иного гомологичного белка или его фрагмента, например, Fc-фрагмента иммуноглобулина человека); РФСК представляющие собой полноразмерные или делеционные варианты гетерологичного фактора свертывания крови, например, свиного фактора свертывания крови. Внутри каждой из групп возможно наличие как одной, так и нескольких модификаций структуры целевого белка, каждой из которых будет соответствовать отдельное МНН. Например, РФСК VIIa -

Эптаког альфа; РФСК VIII - Октоког альфа, Мороктоког альфа, Симоктоког альфа, Бероктоког альфа и Туроктоког альфа; РФСК IXa - Нонаког альфа, а также PEG-модифицированные формы.

Анализ международных фармакопейных требований показал, что требования к РФСК VIIa, изложенные в ЕФ (01/2015:2534 «Human coagulation factor VIIa (rDNA) Concentrated solution», ЕФ 11.7), основаны на структурных особенностях Эптакога альфа, где в качестве стандартного образца для подтверждения подлинности структуры указан образец Human coagulation factor VIIa (rDNA) CRS - Эптаког альфа.; требования к РФСК VIII, изложенные в ЕФ (01/2008:1643 «Human coagulation factor VIII (rDNA) Concentrated solution», ЕФ 11.7), не ориентированы на конкретный белок, содержат общий перечень показателей качества, конкретные методики, нормы и международные стандартные образцы (CRS EDQM) не представлены; требования к РФСК IXa, изложенные в ЕФ (01/2015:2522 «Human coagulation factor IX (rDNA) concentrated solution», ЕФ 11.7), основаны на структурных особенностях Нонакога альфа, где в качестве стандартного образца для подтверждения подлинности структуры указан образец Human coagulation factor IXa (rDNA) CRS - Нонаког альфа. Таким образом, многообразие структур РФСК не отражено. При этом применение стандартных образцов Эптакога альфа и Нонакога альфа для оценки профиля гликанов, в связи с невозможностью регуляции процесса гликозилирования на технологическом уровне, требует отдельного подтверждения при контроле биоподобных ЛС.

В результате были сформулированы гармонизированные фармакопейные требования. Предложено определение и классификация РФСК: «Препараты РФСК – представляют собой биотехнологические лекарственные препараты, полученные с применением технологии рекомбинантной ДНК и обладающие биологической активностью плазменного фактора свертывания крови соответствующего типа. По характеру специфической активности РФСК возможно разделить на следующие группы:

- РФСК VII активированного (rFVIIa), где действующим веществом является рекомбинантный очищенный белок установленной структуры и обладающий активностью плазменного ФСК VII;

- РФСК VIII (rFVIII), где действующим веществом является рекомбинантный очищенный белок установленной структуры и обладающий активностью плазменного ФСК VIII;

- РФСК IX активированного (rFIXa), где действующим веществом является рекомбинантный очищенный белок установленной структуры и обладающий активностью плазменного ФСК IX.

- РФСК комбинированные, где в качестве действующих веществ может быть представлен комплекс РФСК с установленной структурой и активностью соответствующих плазменных ФСК или/и, помимо основного действующего вещества, содержащие дополнительный компонент белковой или иной природы, конъюгированный/связанный с основным компонентом».

Приведены указания на возможность наличия внутри одной группы РФСК с заданной активностью, белков различной структуры, имеющих различные МНН; на необходимость оценки подлинности аминокислотной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций в сравнении со стандартным образцом с установленной структурой, соответствующей заявленному МНН; на необходимость оценки возможности применения международного стандартного образца (при наличии) для оценки подлинности значимых посттрансляционных модификаций биоподобного

препарата; на необходимость разработки и аттестации стандартного образца предприятия и представления сведений о разработке в регистрационном досье в случае отсутствия международного и/или фармакопейного образца, предназначенного для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций; на необходимость разработки требований к оценке подлинности и чистоты РФСК на основании структурных особенностей и физико-химических свойств конкретного белка, в случае отсутствия международных и/или отечественных требований для вновь разрабатываемых белков.

Разработанные требования были использованы при формировании ОФС «Факторы свертывания крови человека (генно-инженерные, рекомбинантные)», вошедшей в XIV издание ГФ РФ, а также вошли научно-методические рекомендации «Руководство по экспертизе лекарственных препаратов крови» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Особенности оценки подлинности структуры и чистоты PEG-модифицированных белков

Широкое применение препаратов на основе PEG-модифицированных белков объясняется преимуществом применения препаратов пролонгированного действия. Данные препараты имеют ряд отличительных характеристик, способных оказывать влияние на безопасность и эффективность готового продукта, что связано с особенностями строения PEG и химией процесса пегилирования (M. Nucci et al., 1991; N. Porfiruyeva et al., 2020). Несмотря на это, фармакопейные требования к оценке качества PEG-модифицированных белков не представлены. В качестве регуляторных требований может быть рассмотрен краткий документ Руководства Европейского агентства по оценке лекарственных средств (EMA/CPMP/BWP/3068/03).

Анализ научной литературы позволил выявить, что специфическая биологическая активность и стабильность PEG-модифицированного белка, его фармакодинамические и фармакокинетические свойства, а также безопасность применения зависят от следующих факторов: структура исходного очищенного рекомбинантного белка; структура исходного PEG; выбор пегилирующих агентов и сведения об их достаточной элиминации; общие особенности процесса PEG-модификации; структура целевого конъюгата (T. Yamaoka et al., 1994; S. Foser et al., 2003; J. E. Seely et al., 2005; M. Kusterle et al., 2008; A. Mero et al., 2011). Молекулярная масса и ее полидисперсность, а также тип строения цепи (линейная, разветвленная) исходного PEG оказывают влияние на фармакодинамику и фармакокинетику ЛС, и могут быть причиной нежелательной иммунной реакции или проявления токсического эффекта (D. Fischer et al., 2004). Выбор пегилирующего агента (определяющего сайт конъюгации - региоселективность молекулы белка) обусловлен структурой исходного белка, поскольку молекула PEG не должна затрагивать или перекрывать участки белковой молекулы, отвечающие за взаимодействие с рецептором, и в целом нарушать активно-значимую пространственную конфигурацию молекулы (F. Moncalvo et al., 2020). К особенностям процесса PEG-модификации белка следует отнести получение смеси целевого конъюгата (моно-пегилированного белка) и сопутствующих продуктов конъюгации (свободного/остаточного белка, свободного/остаточного PEG, поли-пегелированного белка). Кроме того, моно-пегелированные молекулы могут быть представлены позиционными изомерами, где молекулы PEG связаны с целевыми аминокислотными остатками в разных позициях аминокислотной последовательности (S. Foser et al., 2003). Существенное значение имеет стабильность и стандартность конформационной структуры, включая общий размер PEG-модифицированной молекулы, оценку

полидисперсности (в случае наличия целевых поли-пегилированных форм) и молярное отношение полимера к белку.

Сравнительный анализ нормативных документаций по показателям, характеризующим подлинность структуры и чистоту действующего вещества подтвердил необходимость унификации требований, поскольку единый подход к оценке подлинности и чистоты конъюгатов по номенклатуре показателей и методам их оценки отсутствует, не все регистрационные досье содержат достаточные сведения о функциональных характеристиках агента: количестве реакционных групп связывания, их реакционной способности (тиольная группа, N-гидроксисукцинимидный эфир, карбоксильная группа и т.д.) и типе конъюгации - ожидаемой региоселективности, а также сведений об их допустимой остаточной концентрации или полного отсутствия нежелательных/недопустимых примесей.

В результате проведенных исследований были сформулированы гармонизированные фармакопейные требования к PEG-модифицированным белкам:

- характеристика используемого полимерного реагента должна содержать сведения о его функциональности (количество реакционных групп, по которым происходит связывание молекулы ПЭГ с белком), реакционной способности (тип реакционных групп: N-гидроксисукцинимидный эфир, тиольная группа, карбоксильная группа и т.д.), структуры (линейный, разветвленный, Y-образной формы и т.д.), длины, молекулярной массы и полидисперсности (распределение по молекулярной массе);

- должны быть указаны и охарактеризованы все побочные продукты производства и остаточные количества веществ, применяемых в процессе производства (примеси), а также способы очистки конъюгата;

- характеристика ПЭГ-модифицированного белка (конъюгата) должна содержать сведения о степени модификации (среднее число молекул полимера, связанных с белком) и региоселективности - потенциальных реакционных центрах молекулы терапевтического белка (сайтах пегилирования);

- должны быть охарактеризованы физико-химические, иммунохимические и биологические свойства конъюгата (пространственная структура, размер молекулы, молекулярная масса и полидисперсность (распределение по молекулярным массам или размерам, если на молекулу белка в конъюгате приходится более одной молекулы ПЭГ), биологическая активность и др.);

- в качестве стандартного образца может быть использована типичная серия продукта, охарактеризованная по всем показателям качества, предусмотренным для субстанции пегилированного белка, а также по дополнительным показателям, необходимым для максимально полной характеристики структуры конъюгата;

- каждая серия фармацевтической субстанции должна быть охарактеризована, в том числе, по показателям «Подлинность» (в том числе на уровне структуры конъюгата в сравнении со стандартным образцом, аттестованным в установленном порядке), «Степень модификации», «Позиционные изомеры», «Конъюгат (количественное определение)» и показателю «Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси», представляющего собой количественные характеристики свободного PEG, свободного белка, агрегированных молекул конъюгата, возможных продуктов деградации»;

- каждая серия лекарственного препарата должна быть охарактеризована по показателям «Подлинность» (в том числе на уровне структуры конъюгата в сравнении со стандартным образцом, аттестованным в установленном порядке), «Конъюгат

(количественное определение)» и «Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси», представляющего собой количественные характеристики свободного РЕГ, свободного белка, агрегированных молекул конъюгата, возможных продуктов деградации.

Полученные результаты были включены в проект ОФС «Пегелированные (конъюгированные) терапевтические белки, полученные с применением технологии рекомбинантной ДНК», предназначенной для ГФ РФ издание XV, а также в научно-методические рекомендации «Руководство по экспертизе лекарственных средств для медицинского применения» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Систематизация требований к разработке и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков

С целью систематизации разработки и аттестации, а также структурирования сведений о стандартных образцах, предназначенных для подтверждения подлинности структуры молекулы рекомбинантных терапевтических белков, был разработан алгоритм аттестации, состоящий из четырех этапов. В зависимости от предполагаемой области применения стандартного образца в соответствии с данным алгоритмом возможна разработка и аттестация стандартного образца, имеющего статус фармакопейного (отраслевого), предназначенного для оценки качества соответствующего рекомбинантного белка любого отечественного производителя, или статус стандартного образца предприятия, востребованного одним производителем.

Первый этап предполагает выбор кандидата в стандартный образец, обоснование его статуса и области применения, а также разработку спецификации, включающую верификацию аминокислотной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций, предпочтительно методом МС-анализа.

Второй этап предполагает непосредственно аттестацию стандартного образца. Аттестованная характеристика стандартного образца и методика, предназначенная для использования данного образца представляют собой единый методический комплекс. Таким образом аттестацию необходимо проводить с применением валидированной или фармакопейной методики, предполагающей ее дальнейшее включение в НД качестве рутинного анализа. При валидации особое внимание необходимо уделить оценке специфичности выбранной методики, которая для метода пептидного картирования и оценки гликанового профиля заключается в установлении основных (характеристических) пиков и их максимально полной структурной характеристики. Аттестованная характеристика должна быть установлена с учетом предполагаемого статуса аттестуемого стандартного образца (фармакопейный стандартный образец или стандартный образец предприятия).

Третий и четвертый этапы заключаются в изучении стабильности аттестованной характеристики стандартного образца для определения его срока годности и разработке сопроводительной документации (паспорта, инструкции по применению, макета упаковки). Здесь может быть рекомендован мониторинг стабильности пептидных/гликановых карт в режиме реального времени с обоснованной периодичностью.

Данный алгоритм был включен в научно-методические рекомендации «Требования к стандартным образцам в досье на биологические лекарственные средства» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Исследования по практическому применению требований к разработке и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности рекомбинантных терапевтических белков на уровне аминокислотной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций

На основе алгоритма аттестации стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков, разработанного в ходе настоящего исследования, были разработаны и реализованы индивидуальные программы аттестации ФСО для rINF-alfa2b (Met; no-Met), rINF-beta1b и СОпр rFVIIa. Программы разрабатывались индивидуально с учетом структурных особенностей исходного белка и методик установления значений его аттестованной характеристики.

Интерферон альфа-2b

Разработана и реализована программа по аттестации ФСО, предназначенного для оценки подлинности аминокислотной последовательности rIFN-alfa2b (Met). В качестве кандидата в ФСО выбрана субстанция отечественного производителя. Для удобства применения предполагаемого ФСО в соответствии с методикой пептидного картирования, изложенной в ЕФ (монография 07/2015:1110), была изменена форма выпуска: снижена концентрация белка (до 1 мг/мл) и уменьшен объем розлива (до 0,5 мл). Для оценки качества кандидата в ФСО, на основе спецификации производителя на субстанцию, была разработана спецификация включающая изменённые требования по содержанию белка и упаковке/маркировке флаконов, а также дополненная методом масс-спектрометрического анализа в разделе «Подлинность». Установлено и выполнено требование к данному показателю: «верификация аминокислотной последовательности с покрытием не менее 95% и подтверждением положения дисульфидных связей C₂₋₉₉ и C₃₀₋₁₃₉» (Рисунок 1).



Рисунок 1 - Верификация аминокислотной последовательности кандидата ФСО rIFN-alfa2b (Met) (мультиферментный протеолиз) методом ВЭЖХ-МС/МС

В качестве методики аттестации использовали методику пептидного картирования, изложенную в монографии ЕФ 07/2015:1110, включающую предварительный трипсинолиз. Известно, что трипсин отличает специфический гидролиз связей, образованных карбоксильными группами лизина и аргинина. При этом полнота и специфичность гидролиза могут зависеть от активности и чистоты фермента, наличия химотрипсина (менее специфичный гидролиз пептидных связей, образованных карбоксильными группами тирозина, фенилаланина, триптофана, лейцина, метионина, гистидина), положения гидролизуемой связи в цепи, химической природы боковых

групп соседних аминокислотных остатков, пространственной структуры субстрата в целом.

Изучили влияние активности трипсина на характер профиля и стабильность пептидной карты, используя трипсины с активностью около 3000 Ед/мг, 9000 Ед/мг и 13000 Ед/мг. На основании анализа объединенной выборки (n=17) пептидных карт, полученных с трипсином активностью около 9000 ЕД/мг, были выбраны 8 характеристических пиков (Рисунок 2).

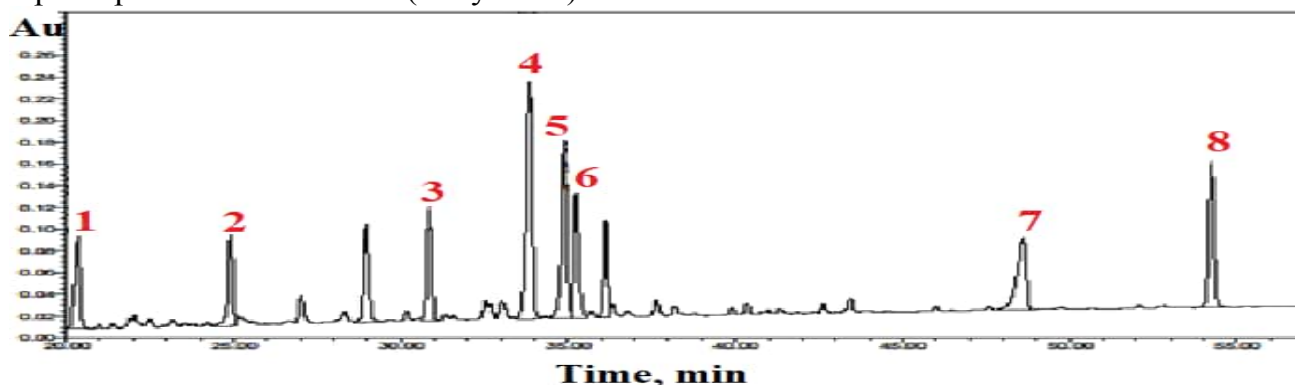


Рисунок 2 – Типичная пептидная карта кандидата ФСО rIFN-alfa2b (Met), полученная в результате ОФ-ВЭЖХ разделения и УФ-детектирования продуктов ферментативного гидролиза с применением трипсина с активностью около 9000 ЕД/мг

Характеристические пики были выбраны по сочетанию стабильности времени удерживания и интенсивности, а также верифицированы относительно известной последовательности методом ВЭЖХ-МС/МС (Таблица 1).

Таблица 1 - Верификации аминокислотной последовательности основных пептидов характеристических пиков кандидата ФСО rINF-alfa2b (Met)

№ Пика/Последовательность аминокислотных остатков пептида	Положение пептида
1/AEIMR	146 - 150
2/MCDLPQTH	1 - 8
3/YSPCAW	136 - 141
4/DSSAAWDETLDDK	72 - 84
5/DRHDFGFPQEEFGNQFQK	33 - 50
6/HDFGFPQEEFGNQFQK	35 - 50
7/AETIPVLHEMIQQIF	51 - 65
8/FYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMK	85 - 113

Было установлено, что характеристические пики презентуют более 50% участков известной молекулы rINF-alfa2b (Met), играющих ключевую роль в обеспечении специфической активности белка, а также N-концевую последовательность (R. Radhakrishnan et al., 1996; W. Klaus, et al., 1998).

Аттестованная характеристика была представлена в виде диапазона времени удерживания каждого характеристического пика (абсолютного времени удерживания для пика 4 и относительного для остальных пиков), рассчитанного как среднее значение $\pm 2S$ (n=17), на основании пептидных карт, полученных методикой ЕФ 07/2015:1110 с трипсином активностью около 9000 ЕД/мл (Таблица 2).

Таблица 2 – Аттестованная характеристика кандидата ФСО rINF-alfa2b (Met)

№ Пика	1	2	3	4	5	6	7	8
Диапазон времени удерживания	0,61-0,66	0,74-0,78	0,90-0,95	33,80-36,95 мин	1,02 - 1,03	1,03-1,04	1,37-1,43	1,51-1,59

Срок годности ФСО (стабильность) – 2 года был установлен в режиме реального времени по результатам оценки окисленных примесей и смещения профиля пептидной карты, оцениваемых по установленным диапазонам характеристических пиков. В результате реализации данной программы аттестован фармакопейный стандартный образец rINF-alfa2b (Met) - ФСО 3.2.00433.

Разработана и реализована программы аттестации ФСО, предназначенного для оценки подлинности аминокислотной последовательности и чистоты rIFN-alfa2b (no-Met). Необходимость данного ФСО обусловлена сложностями коммерческой доступности международного образца CRS (EDQM, I0320301), таких как приостановка поставок и возросшая стоимость. Образец CRS, предназначенный для оценки подлинности методом пептидного картирования и изофокусирования, чистоты методом электрофореза в ПААГ и методом ОФ ВЭЖХ (окисленные формы), традиционно использовался всеми отечественными производителями данной формы rIFN-alfa2b и был включен в соответствующие НД.

В качестве кандидата в ФСО выбрана субстанция отечественного производителя. Для удобства аттестации и применения ФСО была изменена форма выпуска: снижена концентрация белка (до 2,0 мг/мл) и уменьшен объем розлива (до 2,0 мл). Для оценки качества кандидата в стандартный образец, на основе спецификации производителя на субстанцию, была разработана спецификация включающая изменённые требования по содержанию белка и упаковке/маркировке, а также дополненная методом масс-спектрометрического анализа в разделе «Подлинность». Установлено и выполнено требование к данному показателю: «верификация аминокислотной последовательности с покрытием не менее 95% и подтверждением положения дисульфидных связей C₁₋₉₈ и C₂₉₋₁₃₈» (Рисунок 3).

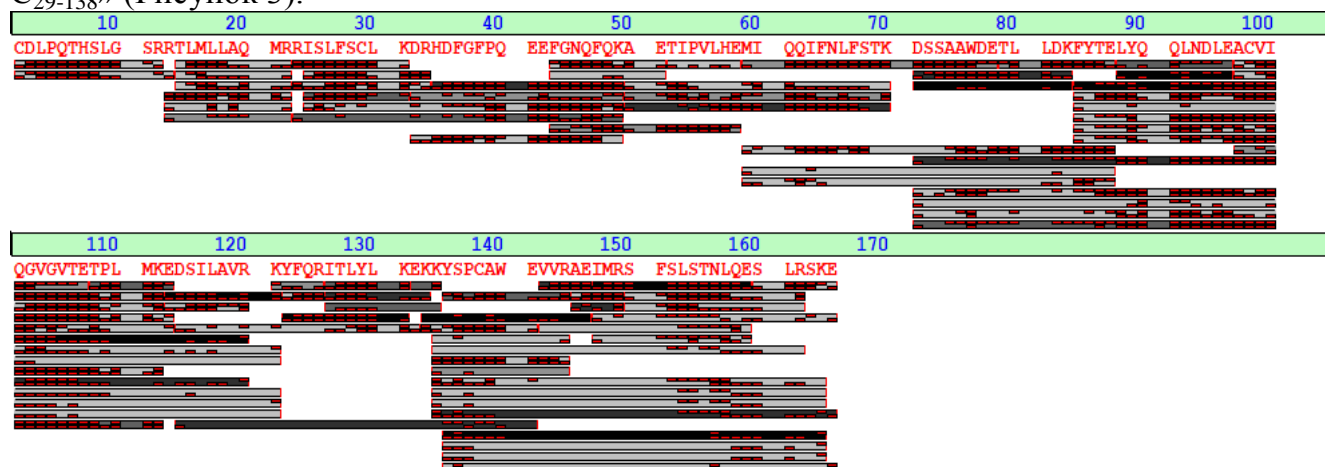


Рисунок 3 - Верификация аминокислотной последовательности кандидата ФСО rIFN-alfa2b (no-Met) (мультиферментный протеолиз) методом ВЭЖХ-МС/МС

Далее, методом ВЭЖХ-МС/МС была исследована пептидная карта, полученная в результате ферментативного гидролиза высокоочищенным трипсином. Исследование аминокислотной последовательности пептидов, формирующих основные пики на пептидных картах кандидата ФСО и образца CRS было проведено на основании данных ОФ-ВЭЖХ с УФ- и МС-детектированием, а также путем сопоставления с пептидами характеристических пиков rINF-alfa2b (Met) - ФСО 3.2.00433. Идентифицированным пикам были присвоены номера с 1 по 8 и проведена аттестация ФСО rINF-alfa2b (no-Met) в сравнении с образцом CRS в условиях воспроизводимости при n=12 по методике ЕФ 07/2015:1110.

Поскольку при аттестации стандартного образца rIFN-alfa2b (no-Met) в качестве образца сравнения использовали соответствующий образец CRS, аттестованная характеристика была установлена на основании анализа значений расхождения времен удерживания характеристических пиков стандартного образца CRS и кандидата в стандартный образец rIFN-alfa2b (no-Met), выраженное как RSD, которое для пика 1 составило 0,59%, для пика 2 - 0,53%; для пика 3 - 0,48%, для пика 4 - 0,41%, для пика 5 - 0,40%, для пика 6 - 0,40%; для пика 7 - 0,34%, для пика 8 - 0,45%. Таким образом максимально допустимый процент расхождения характеристических пиков испытуемого и стандартного образцов, выраженный как среднее значение максимальных RSD + 2СКО составляет 0,61% и аттестованная характеристика принята в следующей формулировке: "Принципиальное совпадение профилей пептидных карт испытуемого и стандартного образца с максимально допустимым расхождением времен удерживания характеристических пиков испытуемого и стандартного образцов не более 1,0%". При этом для основного пика 4, полученного в рекомендуемых условиях, привели рекомендуемый диапазон абсолютного времени удерживания 32,77 -34,23 минуты и рекомендуемые относительные времена удерживания для остальных пиков: пик 1 около 0,56; пик 2 около 0,62; пик 3 около 0,90; пик 5 около 1,04; пик 6 около 1,05; пик 7 около 1,46; пик 8 около 1,63.

Поскольку применение стандартного образца rIFN-alfa2b (no-Met) предполагает полную замену европейского образца CRS, исследовали возможность применения кандидата в стандартный образец для остальных физико-химических методов, предусмотренных в монографии ЕФ 07/2015:1110: изофокусирование, электрофорез в ПААГ и окисленные формы методом ВЭЖХ. Полученные результаты подтвердили пригодность ФСО для вышеуказанных методов.

В результате реализации данной программы аттестован фармакопейный стандартный образец rIFN-alfa2b (no-Met) - ФСО.3.2.00456, сроком на 2 года с мониторингом стабильности пептидной карты и аттестованной характеристики каждые 6 месяцев.

Интерферон бета-1b

Разработана и реализована программа по аттестации ФСО, предназначенного для оценки подлинности аминокислотной последовательности rIFN-beta1b.

Поскольку rINF-beta1b не стабилен при значениях pH около 7,0, (типичных для препаратов парентерального введения), при производстве субстанций данного белка используют или ацетатный буферный раствор, обеспечивающий pH около значений 4,0, или стабилизатор ЧСА. Данный стабилизатор не позволяет оценить подлинность молекулы rINF-beta1b методом пептидного картирования из-за наложения продуктов гидролиза обоих белков в ходе хроматографического разделения. В связи с этим был разработан кандидат в стандартный образец, не содержащий ЧСА: очищенный белок с концентрацией около 0,25 мг/мл до добавления ЧСА и стабилизированный в глициновом буферном растворе (pH 3,0) с добавлением трегалозы и полисорбата. Дополнительно стабильность стандартного образца обеспечивали лиофильным высушиванием.

Для оценки качества кандидата ФСО, на основе спецификации производителя на субстанцию, была разработана спецификация включающая изменённые требования по содержанию белка, форме выпуска, составу и упаковке/маркировке, а также дополненная методом масс-спектрометрического анализа в разделе «Подлинность». Установлено и выполнено требование к данному показателю: «верификация

аминокислотной последовательности с покрытием не менее 95% и подтверждением положения дисульфидной связи C₃₀₋₁₄₀» (Рисунок 4).



Рисунок 4 - Верификация аминокислотной последовательности кандидата ФСО rIFN-beta1b (мультиферментный протеолиз) методом ВЭЖХ-МС/МС

В связи с отсутствием фармакопейных требований к оценке качества rINF-beta1b, необходима разработка не только стандартного образца соответствующей структуры, но и условий ферментативного гидролиза, пригодных для данного белка. Известно, что rINF-beta1b проявляет стабильность при кислых значениях pH. В ЕФ содержатся рекомендации по использованию пепсина и эндопротеиназы Glu-C для гидролиза белков в кислых условиях (01/2010:20255 «Peptide mapping», ЕФ 11.7). При выборе колонки и условий хроматографирования использовали монографию 07/2015:1110 ЕФ. Для получения стабильной и специфичной пептидной карты был выбран фермент эндопротеиназа Glu-C, обеспечивающий расщепление пептидных связей по остаткам глутаминовой кислоты с рабочей областью pH 4,0-9,0. Разработку условий гидролиза проводили с использованием раствора кандидата ФСО rINF-beta1b. В результате была получена стабильная пептидная карта, на которой путем анализа интенсивности и стабильности времени удерживания, были выделены 7 характеристических пиков (Рисунок 5).

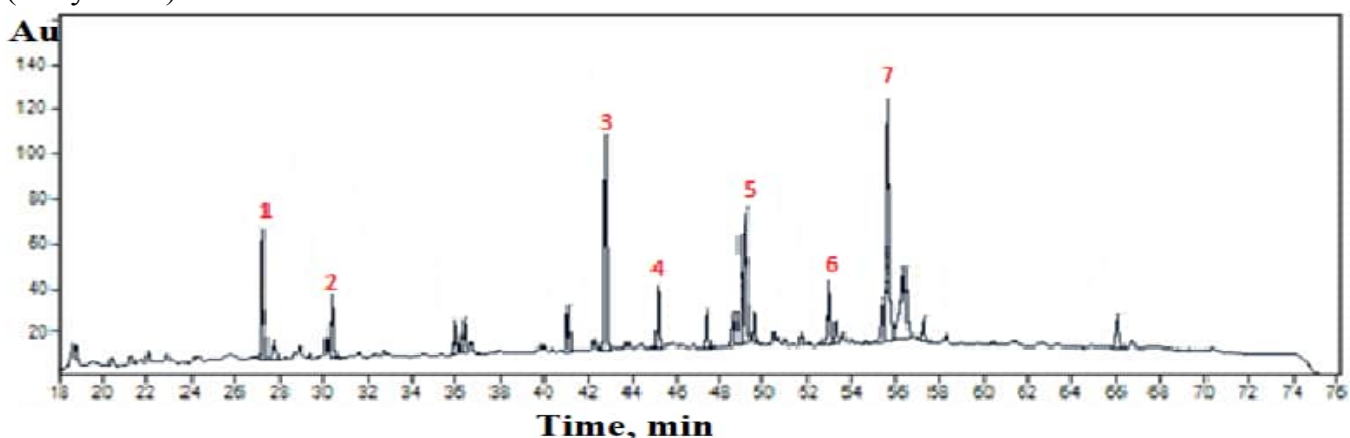


Рисунок 5 - Типичная пептидная карта кандидата ФСО rIFN-beta1b, полученная в результате ОФ-ВЭЖХ разделения и УФ-детектирования продуктов ферментативного гидролиза с применением эндопротеазы Glu-C при pH 4,5 - 4,57

Характеристические пики были выбраны по сочетанию стабильности времени удерживания и интенсивности, а также верифицированы относительно известной последовательности методом ВЭЖХ-МС/МС (Таблица 3).

Таблица 3 - Результаты верификации аминокислотной последовательности основных пептидов характеристических пиков кандидата ФСО rINF-beta1b

№ Пика/Последовательность аминокислотных остатков пептида	Положение пептида
1/IKQLQQFQKE	43-52
2/DAALTIYE	53-60
3/DFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKE	109-136
4/ILRNIFYFINRLTGILRN	149-165
5/NLLANVYHQINHLKTVLE	85-102
6/SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEE	1-42
7/TIVENLLANVYHQINHLKTVLE	81-102

Валидация данной методики заключалась в подтверждении специфичности, прецизионности, выраженной в коэффициенте вариации времен удерживания, полученном в условиях воспроизводимости, и робастности (устойчивости) методики, подтвержденной путем исследования различных условий гидролиза (при pH от 4,50 до 4,57) и использовании различных хроматографических колонок для разделения продуктов ферментативного гидролиза.

Аттестованная характеристика была представлена в виде диапазона времени удерживания каждого характеристического пика (абсолютного времени удерживания для пика 3 и относительного для остальных пиков), рассчитанного как среднее значение $\pm 2S$ (n=20), на основании пептидных карт, полученных методикой 07/2015:1110 ЕФ с использованием эндопротеиназы Glu-C для предварительного гидролиза (Таблица 4).

Таблица 4 - Аттестованная характеристика кандидата ФСО rINF-beta1b

№ Пика	1	2	3	4	5	6	7
Диапазон времени удерживания	0,60 - 0,66	0,67 - 0,73	42,0 - 43,2 мин	1,04 - 1,06	1,14 - 1,15	1,22 - 1,24	1,29-÷ 1,30

Срок годности СО (стабильность) устанавливали в режиме реального времени по результатам оценки пептидных карт, полученных по разработанной методике.

В результате реализации данной программы аттестован фармакопейный стандартный образец rINF-beta1b - ФСО.3.2.00447 (сроком на 2 года) и разработаны условия ферментативного гидролиза rINF-beta1b, являющиеся частью методики пептидного картирования, оформленной в виде патента РФ.

Рекомбинантный фактор свёртывания крови VIIa

Разработана и реализована программа по аттестации СОпр, предназначенного для оценки подлинности аминокислотной последовательности и гликанового профиля РФСК VIIa - Эптакога альфа.

Для подтверждения подлинности структуры молекулы Эптакога альфа по монографии ЕФ (01/2015:2534, ЕФ 11.7) необходимо использование образца CRS «Human coagulation factor VIIa (rDNA)». Отечественные фармакопейные требования к качеству Эптакога альфа и соответствующие стандартные образцы на момент выполнения работы отсутствовали.

В качестве кандидата был выбран образец лекарственного препарата Эптакога альфа с дозировкой 1,2 мг, подтверждение качества которого было проведено по всем показателям спецификации производителя. В связи с тем, что готовая форма выпуска не содержит мешающих веществ, использовали спецификацию на Эптаког альфа с дополнительной характеристикой - верификацией аминокислотной последовательности молекулы методом ВЭЖХ-МС/МС.

Молекула Эптакога альфа представляет собой двухцепочечный гликозилированный белок, поэтому для верификации была рассмотрена схема усиленного гидролиза: дегликозилирование N-гликанов пептид-N-гликозидазой F в соответствии с монографией ЕФ (01/2015:2534, ЕФ 11.7); восстановление и ферментативный гидролиз с применением трипсина высокой очистки (Рисунок 6).

A:LC Monoisotopic mass: 17911.7888 Average mass: 17923.6223

1 N-term ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEARE IFKDAERTKLFWISYSDGQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNC 81
 82 ETHKDDQLICVNEGGCEQYCSDHGTGRSCRCHEGYSLLDAGVSCPTPTVEYPCGKIP ILEKRNASKPQGR C-term 152

B:HC Monoisotopic mass: 28054.2294 Average mass: 28072.5251

1 N-term IVGGKVCCKGECPCWQVLLLVNGAQLCGGTLINT IWVYSAANCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRV AQVITIPST 81
 82 YVPGTNNHDIALLRHLQPVVLT DHVVP LCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALEIMVLNVPRLMTQDCLQSRKVGDSPNIT 172
 173 EYMFACAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP 254

Рисунок 6 - Верификация аминокислотной последовательности кандидата в СОпр Эптакога альфа - легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (HC) молекулы

Согласно методике, изложенной в монографии 01/2015:2534 ЕФ, был проведен анализ кандидата СОпр Эптакога альфа, образца CRS и оригинального препарата Эптакога альфа зарубежного производства (Рисунок 7).

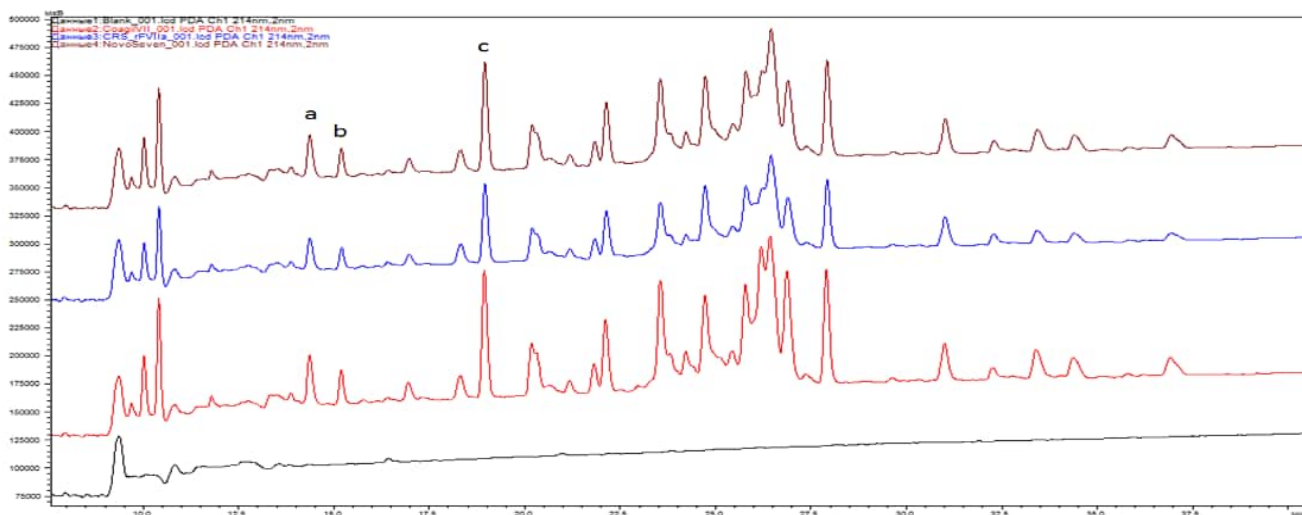


Рисунок 7 - Сводная хроматограмма типичных профилей пептидного картирования кандидата СОпр Эптакога альфа (красный цвет), образца CRS (синий цвет), оригинального препарата Эптакога альфа (коричневый цвет), плацебо (черный цвет)

Для исследуемых образцов характерен сходный хроматографический профиль: пики a, b и c имели близкие времена удерживания; минорные пики прослеживались одинаково. Далее, методом ВЭЖХ-МС/МС, установлена аминокислотная последовательность фрагментов молекулы кандидата в СОпр Эптакога альфа, соответствующая основному пептиду каждого пика. Для пика "a" (время удерживания около 15 мин) были верифицированы два пептида: IPLEK (цепь А, положение 138-143) и SEPRPGVLLR (цепь В, положение 241-250). Для пика "b" (время удерживания около 16 мин) - пептид TLAFVR (цепь В, положение 120-125). Для пика "c" (время удерживания около 20 мин) - пептид VSQYIEWLQK (цепь В, положение 228-237).

Для аттестации СОпр Эптакога альфа для пептидного картирования были проведены три независимых испытания методики в соответствии с монографией ЕФ (01/2015:2534) в условиях воспроизводимости. Полученные пептидные карты имели стабильный

профиль. Аттестованная характеристика была представлена в виде требования принципиального совпадения профилей пептидных карт образца лекарственного препарата и стандартного образца предприятия rFVIIa.

Коагулирующая активность Эптакога альфа, в том числе, зависит от N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты и фосфатных остатков в составе гликанов. На вариабельность гликозилирования могут влиять технология производства и конкретный штамм-производитель. Таким образом, возможны различия профилей гликозилирования биоподобного ЛС и оригинального ЛС или международного СО (I. Sutkeviciute et al., 2009; V. Jurlander et al., 2015).

В соответствии с ЕФ (01/2015:2534, ЕФ 11.7) анализ профиля гликанов следует проводить методом анионообменной ВЭЖХ, для которого обозначены основные методические решения. Для учета результатов в качестве образца сравнения рекомендовано применение образца Human coagulation factor VIIa (rDNA) CRS (EDQM, Y0001663). Поскольку данная монография опубликована после выхода на рынок оригинального и биоподобного препаратов, оценка профиля гликозилирования не была включена в спецификацию ни одного из препаратов.

В результате воспроизведения методики анионообменной ВЭЖХ были получены хроматограммы образцов оригинального препарата Эптакога альфа (НовоСэвен[®]) и биоподобного (Коагил-VII[®]), а также образца CRS, на которых зарегистрированы двенадцать пиков референтных гликанов, предусмотренные методикой ЕФ (Рисунок 8).

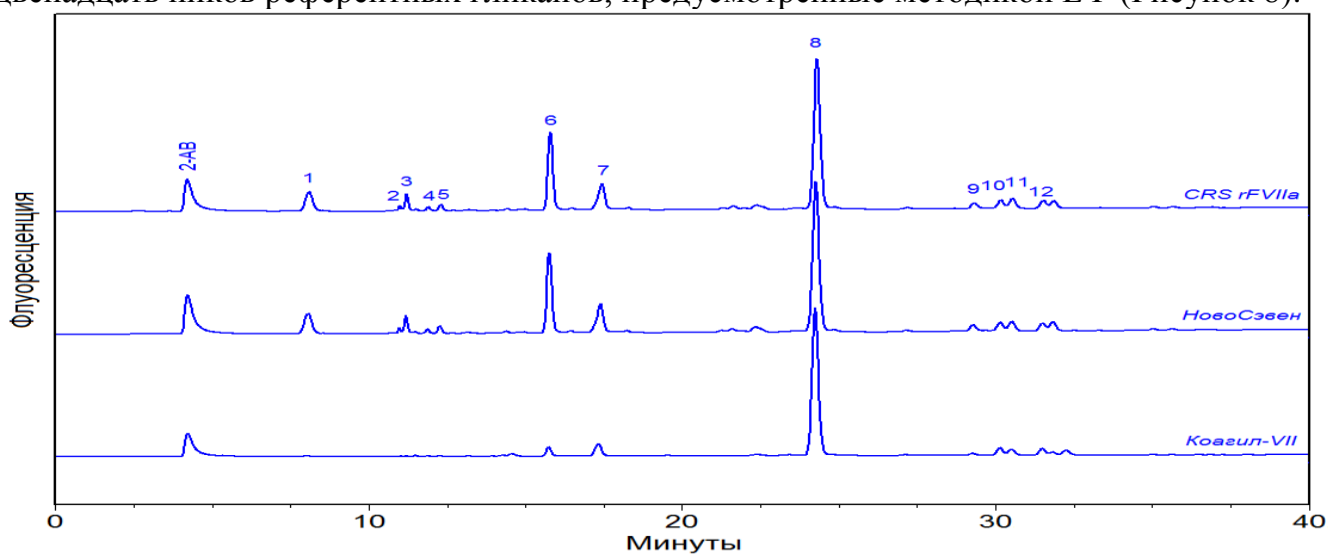


Рисунок 8 - Типичные хроматограммы гликановых профилей образцов биоподобного и оригинального препаратов и образца CRS Эптакога альфа, полученные методом анионообменной ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием

Согласно ЕФ пики 1-5 представляют собой незаряженные гликаны, а пики 6-12 - заряженные (сиалированные) гликаны, содержащие остатки N-ацетилнейраминовой кислоты, содержание которых должно быть не менее 80% от общей суммы площадей всех 12-ти пиков. Кроме того, времена удерживания 12 референтных пиков испытуемых и стандартного растворов совпали, что соответствует требованию "общий вид хроматограмм исследуемого и стандартного образцов должен совпадать", таким образом данная методика пригодна для использования в качестве рутинного анализа при оценки гликанового профиля вновь полученных серий Эптакога альфа.

Однако интенсивность пиков (площадь), являющаяся количественной характеристикой гликанов, совпала только у оригинального препарата и стандартного образца. Профиль гликозилирования биоподобного препарата по интенсивности пиков отличался от профилей стандартного и оригинального препаратов. Таким образом, в качестве образца сравнения предпочтительно использовать стандартный образец предприятия для которого необходимо установить структурные особенности, являющиеся причиной данных различий.

В качестве кандидата в СОпр Эптакога альфа для оценки профиля гликозилирования использовали аттестованный СОпр Эптакога альфа для пептидного картирования. Для идентификации структуры углеводных фрагментов был выбран метод ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия с флуоресцентным и МС-детектированием. Данная методика, как и ранее разработанная методика анионообменной хроматографии, предусматривала стадии отщепления, мечения гликанов, а далее их разделения на полярной стационарной фазе (силикагеле) с использованием мобильной фазы с высоким содержанием органических растворителей.

В результате были получены хроматограммы гликановых профилей в режиме флуоресцентного детектирования и результаты идентификации пиков с использованием программного обеспечения для интерпретации данных GlycoWorkbench после масс-детектирования ионных токов гликоформ, соотнесенные с профилем интенсивности излучения флуоресценции образцов оригинального препарата Эптакога альфа (НовоСэвен[®]) и биоподобного (Коагил-VII[®]), а также образца CRS (Рисунок 9).

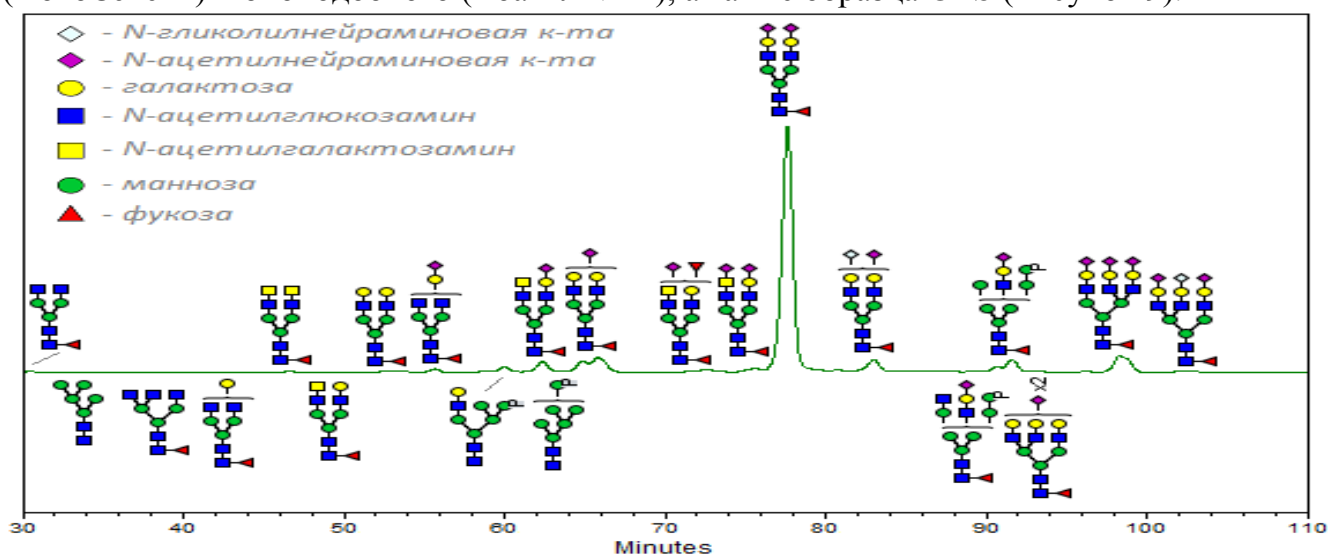


Рисунок 9 – Пример хроматограммы идентификации структур гликоформ кандидата СОпр Эптакога альфа с графическим обозначением структур олигосахаридов в соответствии с правилами номенклатуры CFG (консорциум функциональной гликомики)

Исследование показало, что основной набор модификаций гликанов представляет собой биантенные олигосахариды. Триантенные олигосахариды присутствуют в незначительном количестве. Данные результаты соответствуют данным научной литературы (N.K. Klausen et al., 1998; E.Vöhm et al., 2015). К особенностям СОпр Эптакога альфа можно отнести количественное преимущество дисиализованной олигоформы, состоящей из 4-х остатков N-ацетилглюкозамина, 3-х маннозных и 2-х галактозных остатков. Данное отличие является основной причиной различия профилей

кандидата СОпр Эптаког альфа и образца CRS полученных анионообменной и гидрофильной ВЭЖХ. Большая часть гликанов обладала зарядом в виде остатков α 2,3-связанной N-ацетилнейраминовой кислоты. Характерным структурным элементом является фукоза ((α 1,6)-фукозилирование) и β -галактоза.

Для оценки стабильности полученных результатов был проведен анализ хроматографических параметров (времени удерживания и площади пика), подтвердивший стабильность профилей, получаемых на разных сериях препарата Коагил-VII[®] в условиях воспроизводимости - RSD времени удерживания не превышало 1%; RSD площадей пиков не превышало 0,6%. В результате реализации данной программы был аттестован СОпр Эптакога альфа, предназначенный для оценки подлинности аминокислотной последовательности и профиля гликанов препарата Коагил-VII[®].

Оптимизация оценки вспомогательных веществ. Разработка унифицированных методик

Разнообразие вспомогательных веществ, а также методик их анализа, является регулярным источником проблемных вопросов лабораторной фармацевтической экспертизы, связанных с техническими аспектами воспроизведения индивидуальных методик фирм. Исключение могут составлять вспомогательные вещества, оценка которых обеспечена фармакопейными методиками (методиками, изложенными в виде ОФС в Государственной фармакопее РФ или в виде монографий Европейской фармакопее, фармакопее США и др). Однако, большинство фармакопейных методик, предназначенных для оценки вспомогательных веществ, являются методиками количественного спектрофотометрического, колориметрического или титриметрического химического анализа, не предполагающего использование высокотехнологичного оборудования. В то же время современная мировая и отечественная лабораторная практика ведущих биофармацевтических производителей ориентирована на предпочтение высокотехнологичного оборудования - газовой и жидкостной высокоэффективной хроматографии, атомно-абсорбционной спектроскопии, масс-спектрометрического анализа.

Оптимизация количественной оценки полисорбата 80 в составе БЛП

Оптимизация количественной оценки полисорбата 80 заключалась в разработке унифицированной методики, позволяющей проводить его определение в препаратах с различным типом белка и различным соотношением белка и полисорбата 80. В качестве объектов исследования были выбраны препараты разных групп БЛП: рекомбинантный фактор свертывания крови, тканевой активатор плазминогена, вакцины, препарат интерферона, препарат моноклонального антитела и иммуноглобулин человека нормальный.

Особенностями данных препаратов, оказывающими влияние на эффективность хроматографического разделения и детектирования, являются величины молекулярных масс действующих веществ (от около 19 кДа до 280 кДа) и молекулярной массы полисорбата 80 (около 26 кДа), а также различия в концентрациях белка (от 0,04 до 220 мг/мл) и концентрации полисорбата 80 (от 0,008 до 1,5 мг/мл). На основании того, что молекулярные массы действующих веществ некоторых препаратов и полисорбата 80 отличаются существенно, для количественного определения полисорбата 80 был выбран метод эксклюзионной ВЭЖХ, позволяющий разделять анализируемые компоненты по размеру молекул.

Был рассмотрен ряд колонок TSKgel, содержащих сорбент на основе силикагеля, связанный с различными гидроксильными группами, обеспечивающими минимальное взаимодействие с белками. На основании эффективности разделения подобраны предварительные хроматографические условия, при которых лучшие результаты (по фактору асимметрии и разрешению образцов) были получены на колонке TSKgel G2000SWXL: с учетом двух основных максимумов поглощения полисорбата 80 в УФ-диапазоне (195 нм и 324 нм), а также длины волны отсечки для 0,1 М фосфатного буферного раствора (205 нм), выбрана длина волны детектирования - 234 нм; подобраны объем пробы 20 мкл, скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, температура колонки 20 °С. Несимметричность пика полисорбата 80, предположительно вызванная низкой критической концентрацией мицеллообразования с образованием мицелл переменного состава, была устранена добавлением в состав подвижной фазы 0,1 % раствора натрия додецилсульфата (фактор асимметрии «более 2,0» сместился к значениям «не более 1,5»).

Аналитический диапазон от 0,02 до 0,2 мг/мл (стандартные растворы полисорбата 80, приготовленные по точной навеске: 0,02, 0,04, 0,08, 0,16 и 0,2 мг/мл) был выбран в процессе исследования линейной области зависимости аналитического сигнала от концентрации полисорбата 80 (коэффициент детерминации 1,00).

Эффективное разделение компонентов было показано для препаратов с молекулярной массой действующих веществ более 50 кДа и соотношением полисорбат 80: белок не более 1:10 (Рисунок 10).

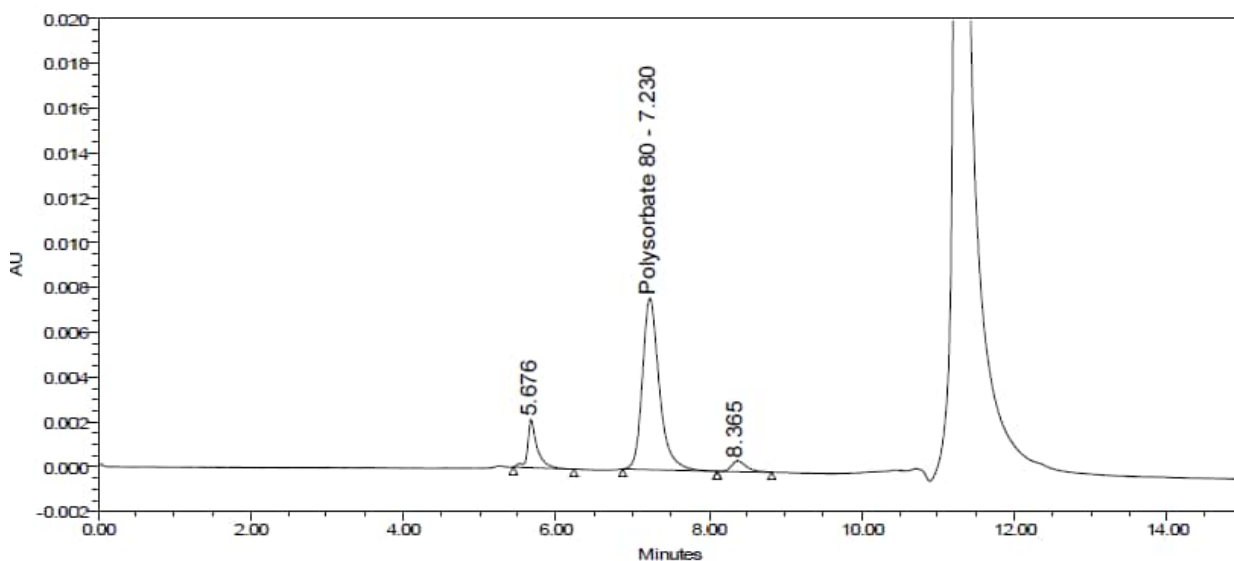


Рисунок 10 – Типичный хроматографический профиль разделения препарата РФСК VIII

Для препаратов с высоким содержанием белка (около 100 мг/мл при содержании полисорбата 80 около 0,02 мг/мл), например для препарата моноклонального антитела, результаты прямого разделения были неудовлетворительны несмотря на большое различие молекулярных масс (Mг действующего белка - около 148 кДа). Также затруднение вызвало определение полисорбата 80 в препарате интерферона, где соотношение белка и полисорбата 80 приемлемо (0,04 мг/мл:0,1 мг/мл), но молекулярные массы белка (около 19 кДа) и полисорбата 80 близки.

Для элиминации белка был выбран метод твердофазной экстракции с использованием картриджа Oasis HLB, Waters, для которого были подобраны

оптимальные условия кондиционирования, уравнивания, нанесения пробы, промывки для удаления примесей и элюирования целевого компонента (Рисунок 11).

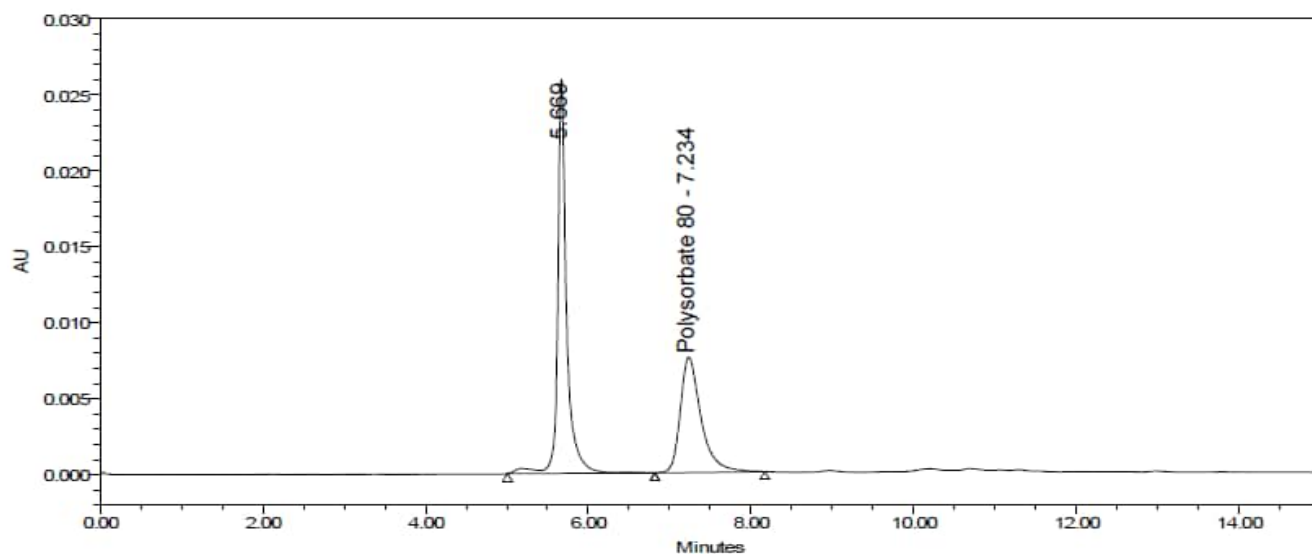


Рисунок 11 – Типичный хроматографический профиль разделения препарата моноклонального антитела после твердофазной экстракции

Результаты определения полисорбата 80 в образцах БЛП разработанной методикой, после удаления высокомолекулярного белкового компонента путем твердофазной экстракции, соответствовали требованиям НД производителей.

Разработанная методика была валидирована: подтверждена специфичность по отсутствию сигналов компонентов матрицы; подтверждена линейность с коэффициентом корреляции 0,999; повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость, оцениваемые ко отношению стандартному отклонению, составили 0,4 % и 3,7 % соответственно; правильность, выраженная через процент выявления, составила 98,0 %; предел количественного определения, вычисляемый по соотношению сигнал/шум, составил 0,004 мг/мл.

Оптимизация количественной оценки аминокислот в составе БЛП

Оптимизация количественной оценки аминокислот в составе БЛП заключалась в разработке унифицированной методики ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия (HILIC-хроматографии), основанной на использовании водно-органического элюента и полярной стационарной фазы. Метод HILIC-хроматографии сочетает особенности обращенно-фазового и нормально-фазового режимов, предназначен для разделения полярных соединений и позволяет проводить прямое определение без предварительной химической модификации аминокислоты (Н.С.М.Т. Prinsen et al., 2016; А. Socia et al., 2016; Т. Themelis et al., 2017). В качестве объектов исследования выбраны препараты разных групп БЛП: препараты иммуноглобулинов человека и факторы свертывания крови человека (рекомбинантные и выделенные из плазмы).

Разработку условий хроматографирования проводили на глицине. Было исследовано влияние буферных растворов на основе ацетата и формиата аммония с рН 4,5, рекомендованных к использованию в HILIC хроматографии. В качестве подвижной фазы был выбран 20 мМ раствор формиата аммония и ацетонитрила в соотношении 30:70. Для детекции пика глицина была выбрана длина волны, близкая к максимуму поглощения - 210 нм, поскольку максимум поглощения подвижной фазы (205 нм) близок к максимуму поглощения глицина (198 нм), что явилось причиной появления

мешающих факторов на базовой линии. Лучшие результаты получены в следующих условиях: Колонка SeQuant ZIC-HILIC (Merck); температура колонки 30 °С; длина волны детектора 210 нм; скорость подвижной фазы 0,8 мл/мин; объем пробы 10 мкл; подвижная фаза: формиат аммония (20 мМ):ацетонитрил (30:70, об/об) рН 4,5.

Целевые белки не конкурируют с глицином в ходе хроматографического разделения, однако их высокая концентрация создает фоновый шум, маскирует сигнал глицина, влияет на форму пика. Для удаления белковой фракции использовали способ фильтрационного центрифугирования. В результате сравнения нескольких типов каририджей был выбран Amicon Ultra® 10К.

Далее была исследована возможность применения разработанной методики для количественного определения аминокислот, входящих в состав БЛП на модельной смеси 6-ти аминокислот, обладающих различной полярностью R-групп. Исследование показало, что система пригодна для незаряженных неполярных аминокислот (метионина, пролина) и незаряженной полярной аминокислоты (глицина) и не позволяет провести разделение полярных положительно заряженных аминокислот (аргинина и лизина). Кроме того, форма пика гистидина оказалась неудовлетворительной (фактор асимметрии пика около 4,0), а время удерживания (около 60 мин) и форма пика лизина не позволяли признать пригодными условия разделения. Изменение электростатического взаимодействия с сорбентом обеспечивали путем подбора условий хроматографирования (длины волны детектирования, температуры колонки, скорости потока), а также состава и рН подвижной фазы. Анализ эффективности хроматографической системы показал, что лучшие результаты были получены при следующих изменениях состава и рН подвижной фазы: формиат аммония (20 мМ):ацетонитрил (35:65, об/об) и рН 3,3; а также изменения волны детектирования - 198 нм (Рисунок 12).

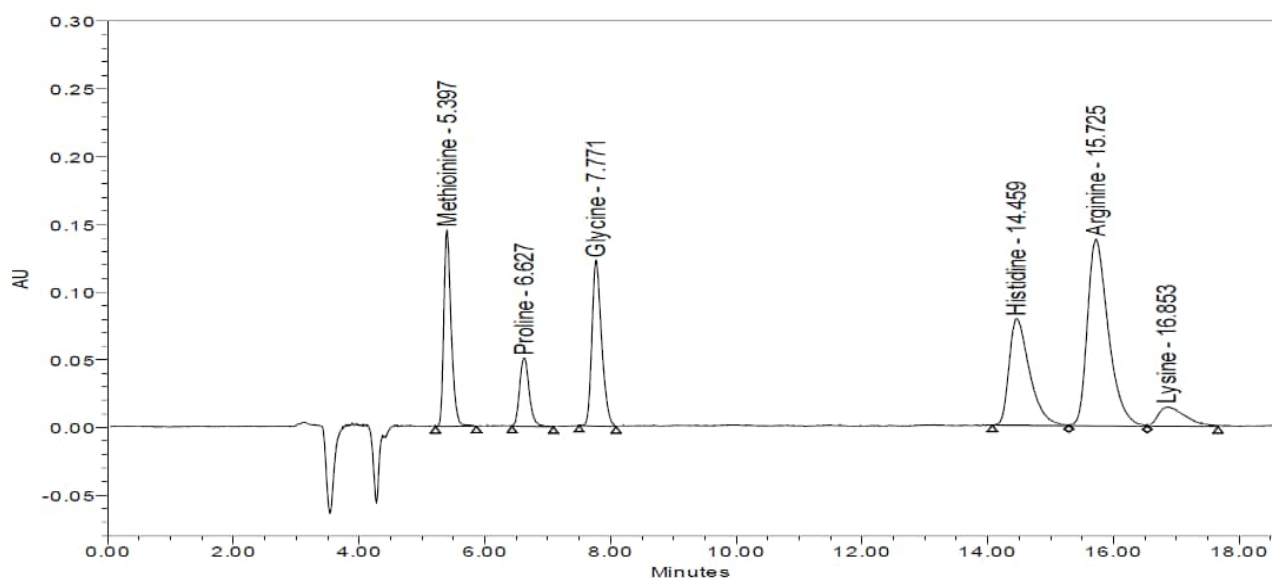


Рисунок 12 - Типичная хроматограмма разделения модельной смеси аминокислот

Оценка линейности методики была проведена для пяти концентраций каждой из аминокислот. Для метионина гистидина, аргинина был выбран диапазон от 0,05 мг/мл до 0,2 мг/мл; для пролина, глицина и лизина от 0,5 до 1,5 мг/мл, что обусловлено наиболее характерным содержанием данных аминокислот в БЛП.

Результаты определения аминокислот в составе БЛП разработанной методикой, после удаления высокомолекулярного белкового компонента путем фильтрационного центрифугирования, соответствовали требованиям НД производителей (Рисунок 13).

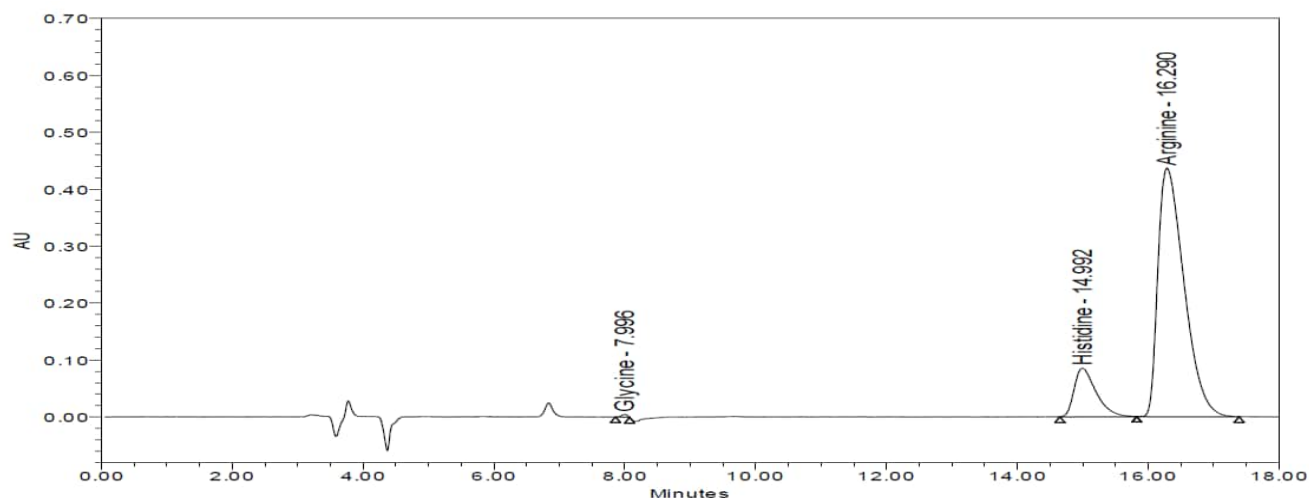


Рисунок 13 - Типичная хроматограмма определения аминокислот в препарате РФСК VIII после фильтрационного центрифугирования

Разработанная методика была валидирована: подтверждена специфичность по отсутствию сигналов компонентов матрицы; подтверждена линейность с коэффициентом корреляции 0,999; повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость, оцениваемые ко относительному стандартному отклонению, составили 0,8 % и 1,4 % соответственно; правильность, выраженная через процент выявления, составила 99,5 %; предел количественного определения, рассчитанный как сигнал/шум составил - метионин 0,01 мг/мл, пролин 0,2 мг/мл, глицин 0,1 мг/мл, гистидин 0,01 мг/мл, аргинин 0,01 мг/мл, лизин 0,4 мг/мл.

Оптимизация количественной оценки алюминия в составе БЛП

Количественное определение геля алюминия в составе БЛП, независимо от используемой методики, основано на детекции ионов алюминия – путем прямого измерения в случае метода ААС или визуальной детекции точки эквивалентности в случае комплексонометрического титрования (ОФС 1.7.2.0016.15, ГФ РФ XIV).

В качестве объектов исследования были выбраны препараты разных групп БЛП: вакцина против гепатита В, препараты анатоксинов, вакцина против короновиральной инфекции, АКДС-вакцина, вакцины поликомпонентные. Предварительное растворение геля до получения ионов алюминия с одновременной минерализацией высокомолекулярной матрицы, характерной для всех БЛП, является обязательной пробоподготовкой для любого метода. При этом амфотерные свойства геля гидроксида алюминия позволяют рассматривать в качестве растворителей кислоты и щелочи.

Поскольку при атомно-абсорбционной спектроскопии нежелательно использование серной кислоты, диссоциация которой с образованием сульфат-ионов создает ионизационные помехи, приемлемыми кислотами являются азотная, рекомендованная производителем оборудования и соляная, применяющаяся в методиках ААС с пламенной атомизацией. Также была рассмотрена возможность минерализации образца в щелочной среде с использованием натрия гидроксида. Максимальный гидролиз геля гидроксида алюминия (более 90%) наблюдали при молярном соотношении « Al^{3+} : NaOH 20%» - «1:25» и нагревании данной реакционной смеси на кипящей водяной бане в

течение 5 минут. Поскольку гель алюминия является вспомогательным веществом (адьювантом) его количественное содержание в БЛП, обеспечивающее целевой эффект достаточно высоко - от 0,2 до 1,7 мг/мл в зависимости от типа препарата. Такие концентрации аналита неприемлемы для высокочувствительного метода ААС, где оптическая плотность образца при длине волны 309,3 нм (поглощение ионов алюминия) должна быть менее 1,0. Таким образом поиск аналитической области методики заключался в поиске степени разведения исходной пробы.

В качестве материала для оценки линейности аналитического отклика использовали ГСО ионов алюминия в диапазоне от 0 до 100 мкг/л. Было установлено, что зависимость поглощения от концентрации ионов алюминия может быть описана уравнением линейной регрессии в диапазоне от 10 до 50 мкг/л. При этом предлагается использование пяти калибровочных растворов с шагом 10 мкг/л.

На основании проведенных исследований была разработана следующая методика: к 0,4 мл испытуемых образцов и калибровочных растворов, содержащих около 1 мг ионов Al^{3+} , прибавляли 0,35 мл 20% раствора натрия гидроксида, после чего смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение пяти минут, охлаждали, добавляли концентрированную азотную кислоту 0,5 мл для нейтрализации избытка щелочи, доводили до объема 25 мл водой очищенной. Из калибровочных растворов, исходя их начальной концентрации, готовили растворы с концентрациями 10-20-30-40-50 мкг/л. Испытуемый образец разводили до ориентировочной концентрации около 30 мкг/л. Полученные пробы помещали в автосамплер ААС-ЭТ и проводили определение ионов алюминия при длине волны 309,3 нм.

Разработанная методика была валидирована: подтверждена линейность с коэффициентом корреляции 0,996; повторяемость и внутрिलाбораторная воспроизводимость, оцениваемые ко относительному стандартному отклонению, составили 3,14 % и 4,74 % соответственно; правильность, выраженная через процент выявления, составила 109,8%.

Для оценки статистической сопоставимости результатов определения алюминия в препаратах БЛП фармакопейной методикой комплексометрического титрования и разработанной методикой ААС-ЭТ был проведен однофакторный дисперсионный анализ полученных результатов ($n=15$). Нулевая гипотеза сформулирована следующим образом: методики ААС-ЭТ и комплексометрического титрования обладают одинаковыми точностными характеристиками (правильностью и прецизионностью) и систематические ошибки данных методик статистически незначимы. Расчет критерия Фишера (F-критерия) для каждого образца (Вакцины против гепатита В разных производителей, АДС-М-анатоксина, АС-анатоксина, ФСО 3.1.00333 и ФСО 3.1.00423) и его сравнение с табличным значением критерия Фишера (F_t - критерий) подтвердило нулевую гипотезу: расчетные значения F-критерия для образцов находились в диапазоне «0,00 - 1,18», что ниже F_t - критерия с критическим значением = 4,20 при $\alpha=0,05$. Таким образом, на основе высокотехнологичного метода ААС-ЭТ разработана методика количественного определения ионов алюминия в БЛП, которая может рассматриваться как альтернативная существующей фармакопейной методике комплексометрического титрования.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствована и внедрена в практику методология оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов,

способствующая обеспечению надлежащего качества препаратов данной группы на всех этапах жизненного цикла.

2. Разработаны и внедрены в практику фармацевтической экспертизы нормативные фармакопейные требования к оценке подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных интерферонов альфа и бета, рекомбинантных факторов свёртывания крови и PEG-модифицированных рекомбинантных белков, гармонизированные с международными нормативными документами и учитывающие специфику отечественных производителей.

3. Разработан и внедрен в практику фармацевтической экспертизы универсальный алгоритм разработки и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций любых рекомбинантных терапевтических белков, не зависящий от наличия международных стандартных образцов и предусматривающий разработку индивидуальной поэтапной программы аттестации, включающей выбор кандидата в стандартный образец, характеристику его первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций, выбор методики аттестации, получение аттестованной характеристики и оценку ее стабильности.

4. Разработаны и внедрены в практику фармацевтической экспертизы индивидуальные программы аттестации фармакопейных стандартных образцов и фармакопейные стандартные образцы для оценки подлинности аминокислотной последовательности негликозилированных рекомбинантных интерферонов альфа-2b содержащих (ФСО.3.2.00433) и не содержащих (ФСО.3.2.00456) N-концевой метионин, а также рекомбинантного интерферона бета-1b (ФСО.3.2.00477). ФСО.3.2.00433 и ФСО.3.2.00477 охарактеризованы методом масс-спектрометрического анализа, аттестованные характеристики, представляющие собой типичные пептидные карты и диапазоны относительных времен удерживания характеристических пиков, получены при отсутствии международного стандартного образца. ФСО.3.2.00456 охарактеризован методом масс-спектрометрического анализа, аттестованная характеристика, представляющая собой требование к максимально допустимому расхождению времен удерживания характеристических пиков на пептидных картах испытуемого и стандартного образцов - не более 1,0 %, а также рекомендуемые относительные времена удерживания характеристических пиков, получена в прослеживаемости к международному стандартному образцу CRS (EDQM, I0320301).

5. Разработаны и внедрены в практику фармацевтической экспертизы индивидуальная программа аттестации стандартного образца предприятия и стандартный образец предприятия для оценки подлинности аминокислотной последовательности и профиля гликозилирования рекомбинантного седьмого активированного фактора свертывания крови. Стандартный образец предприятия охарактеризован методом масс-спектрометрического анализа, аттестованная характеристика, представляющая собой типичную пептидную карту, включающую три характеристических пика, а также типичный профиль N-гликозилирования, содержащий двенадцать обязательных олигосахаридов с преобладанием (около 70%) дисахарида олигоформы, состоящей из 4-х остатков N-ацетилглюкозамина, 3-х маннозных и 2-х галактозных остатков, получена в прослеживаемости к международному стандартному образцу CRS (EDQM, Y0001663).

6. Разработана и внедрена в практику фармацевтической экспертизы унифицированная методика высокоэффективной хроматографии гидрофильного

взаимодействия для селективного определения аминокислот (глицин, гистидин, метионин, пролин, аргинин, лизин и их смеси), предусматривающая возможность предварительной элиминации белкового компонента путем фильтрационного центрифугирования с отсечкой 10 кДа с последующим прямым селективным определением аминокислот в составе биологических лекарственных препаратов: метионина, аргинина, гистидина в аналитическом диапазоне концентраций от 0,05 мг/мл до 0,2 мг/мл; пролина, глицина, лизина в аналитическом диапазоне концентраций от 0,5 мг/мл до 1,5 мг/мл.

7. Разработана и внедрена в практику фармацевтической экспертизы унифицированная методика эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах, предусматривающая возможность элиминации белкового компонента путем твердофазной экстракции с последующим прямым определением полисорбата 80 в составе биологических лекарственных препаратов в аналитическом диапазоне концентраций полисорбата 80 от 0,02 мг/мл до 0,2 мг/мл.

8. Разработана и внедрена в практику фармацевтической экспертизы методика атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией для определения ионов алюминия в биологических лекарственных препаратах, содержащих гель гидроксида алюминия или фосфата алюминия, которая включает предварительный щелочной гидролиз с последующим количественным определением ионов алюминия в аналитическом диапазоне концентраций от 10 мкг/л до 50 мкг/л. Показана взаимозаменяемость разработанной методики и фармакопейной методики комплексометрического титрования: однофакторный дисперсионный анализ данных, полученных обеими методиками, свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий - максимальное расчетное значение критерия Фишера $F=1,18$ существенно ниже критического (табличного) значения критерия Фишера $F_{\alpha}=4,2$.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанные фармакопейные требования к оценке подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных интерферонов альфа и бета, а также рекомбинантных факторов свертывания крови необходимо использовать при разработке и производстве; при формировании соответствующих разделов регистрационных досье, предназначенных для проведения регистрационной и пострегистрационной экспертизы; при проведении государственной регистрационной и пострегистрационной экспертизы; при посерийном контроле качества данных препаратов.

2. Разработанные фармакопейные требования к оценке качества PEG-модифицированных белков необходимо использовать при разработке и производстве; при формировании соответствующих разделов регистрационных досье, предназначенных для проведения регистрационной и пострегистрационной экспертизы; при проведении государственной регистрационной и пострегистрационной экспертизы; при посерийном контроле качества данных препаратов.

3. Разработанный алгоритм аттестации стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности первичной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков, необходимо использовать при разработке и аттестации фармакопейных стандартных образцов и стандартных образцов предприятия; при формировании соответствующих разделов регистрационных досье, предназначенных для проведения регистрационной и

пострегистрационной экспертизы; при проведении государственной регистрационной и пострегистрационной экспертизы.

4. Разработанные и аттестованные фармакопейные стандартные образцы для оценки подлинности аминокислотной последовательности рекомбинантных интерферонов альфа-2b содержащих (ФСО.3.2.00433) и не содержащих (ФСО.3.2.00456) N-концевой метионин, а также рекомбинантного интерферона бета-1b (ФСО.3.2.00477) необходимо внедрить на фармацевтических предприятиях, выпускающих соответствующие препараты, при посерийном контроле качества.

5. Разработанную методику высокоэффективной хроматографии гидрофильного взаимодействия для селективного определения аминокислот (глицин, гистидин, метионин, пролин, аргинин, лизин и их смеси) целесообразно внедрить на фармацевтических предприятиях, выпускающих биологические лекарственные препараты, содержащие данные стабилизаторы.

7. Разработанную методику эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения полисорбата 80 целесообразно внедрить на фармацевтических предприятиях, выпускающих биологические лекарственные препараты, содержащие данный стабилизатор.

8. Разработанную методику атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией для определения ионов алюминия целесообразно внедрить на фармацевтических предприятиях, выпускающих биологические лекарственные препараты, содержащие в качестве адьюванта гель гидроксида или фосфата алюминия.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Перспективным направлением дальнейшего совершенствования методологии контроля физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов является разработка фармакопейных требований, гармонизированных с международными нормативными документами, к оценке качества инновационных препаратов на основе моноклональных антител, генотерапевтических препаратов, вакцин на основе синтетических пептидов, поливалентных вакцин на основе конъюгированных полисахаридов и т.д.

2. Необходимо продолжить работу по разработке и аттестации фармакопейных стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности первичной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков, производимых отечественными предприятиями, в русле задач обеспечения технологической независимости российского биофармацевтического производства.

3. Необходимо продолжить работу по исследованию профиля гликозилирования биоподобных рекомбинантных факторов свертывания крови VII и IX, а также работу по разработке и аттестации соответствующих стандартных образцов в русле задач обеспечения технологической независимости российского биофармацевтического производства.

4. Необходимо продолжить работу по разработке унифицированных методик для оценки качества биологических лекарственных препаратов по содержанию актуальных вспомогательных веществ, например, стабилизаторов углеводной природы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Борисевич, И.В. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) / И.В. Борисевич, В.Г. Петухов, Р.А. Волкова, **О.Б. Устинникова**, О.В. Фадейкина, В.И. Малкова // Научно-практический журнал БИОпрепараты.- 2010. - № 4. - С.8-10.
2. Рунова, О.Б. Разработка хроматографического метода количественного определения полисорбата 80 в цитокинах / О.Б. Рунова, В.И. Малкова, М.Г. Коротков, Е.В. Величко, **О.Б. Устинникова** // Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез - 2013: материалы II Всероссийской научной конференции. - Краснодар, 2013. - С.118.
3. **Устинникова, О.Б.** Рекомендации к составлению нормативной документации на иммунобиологические лекарственные препараты в части физико-химических показателей качества / О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, Е.В. Величко // Научно-практический журнал Ведомости НЦЭСМП.- 2015. - №3. - С.8-12.
4. **Устинникова, О.Б.** Особенности оценки качества, эффективности и безопасности рекомбинантных факторов свертывания крови / О.Б. Устинникова, Е.В. Новикова, О.Б. Рунова, В.П. Бондарев, И.В. Борисевич, А.Н. Миронов // Медицинская иммунология. - 2015: материалы XV Всероссийского форума с международным участием. - Санкт-Петербург, 2015. - С.430.
5. **Устинникова, О.Б.** Рекомбинантные факторы свертывания крови: особенности структуры и оценки качества / О.Б. Устинникова, В.П. Бондарев, **О.Б. Рунова**, Е.В. Новикова, Е.В. Горбунова // Молекулярная медицина. – 2015. - № 6. - С. 3–8.
6. **Устинникова, О.Б.** Актуальные направления разработки лекарственных средств на основе рекомбинантных факторов свертывания крови / О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, Е.В. Новикова, В.П. Бондарев, Е.В. Лебединская // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, №9, - С. 3-6.
7. Голощапова, Е.О. Теоретическое обоснование выбора субстанции интерферона альфа-2b для аттестации в качестве стандартного образца для оценки подлинности методом пептидного картирования / Е.О. Голощапова, **О.Б. Устинникова**, О.Б. Рунова, Л.В. Корсун // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2016. - Т.16, № 3.- С. 161-165.
8. **Устинникова, О.Б.** Технологии производства рекомбинантных факторов свертывания крови в аспекте современных требований к качеству и безопасности биотехнологических препаратов / О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, Е.В. Новикова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. - №11. - С. 491-495.
9. **Устинникова, О.Б.** Гармонизация требований оценки активности рекомбинантного фактора свертывания крови rFVIIa / О.Б. Устинникова, Е.В. Новикова, О.Б. Рунова, Д.В. Шведов, М.В. Жилиева, Д.А. Кудлай // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. -Т. 51, №6. - С. 54-57.
10. Голощапова, Е.О. Обзор методических подходов к оценке качества лекарственных средств на основе рекомбинантных интерферонов / Е.О. Голощапова, **О.Б. Устинникова**, Л.А. Гайдерова, М.Л. Байкова, Т.Н. Лобанова, И.М. Щербаченко, В.П. Бондарев // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2017. - Т.17, № 3.- С. 152-157.

11. **Устинникова, О.Б.** Вопросы гармонизации фармакопейных требований к качеству препаратов на основе рекомбинантных факторов свертывания крови / О.Б. Устинникова, Е.В. Новикова, О.Б. Рунова, В.П. Бондарев, М.В. Жилиева, А.Ю. Вишневский // Медицинская иммунология. -2017: материалы XVI Всероссийского форума с международным участием. - Санкт-Петербург, 2017. - С.280

12. **Голощапова, Е.О.** Разработка порядка аттестации стандартного образца метиониновой формы интерферона альфа-2b для подтверждения подлинности методом пептидного картирования / Е.О. Голощапова, О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, М.Г. Коротков, Р.А. Волкова // Медицинская иммунология. – 2018. – Т.20, № 4. – С.543-550.

13. **Rounova, O.** Development of a hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography method for the determination of glycine in formulations of therapeutic immunoglobulins / O. Rounova, P. Demin, M. Korotkov, V. Malkova, O. Ustinnikova // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2018. – Т.410, № 26. – С. 6935-6942.

14. **Голощапова, Е.О.** Рекомбинантные интерфероны бета-1a и бета-1b: особенности структуры белка и проблемные вопросы подтверждения ее подлинности / Е.О. Голощапова, О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т.52, № 8. – С.61-64.

15. **Рунова, О.Б.** Пегилированные интерфероны и особенности оценки их физико-химических показателей качества / О.Б. Рунова, И.М. Щербаченко, М.Г. Коротков, А.Н. Сибетова, О.Б. Устинникова // Иммунология. – 2018. – Т.39, №4. - С.243-248.

16. **Шведова, Е.В.** Разработка порядка аттестации стандартного образца рекомбинантного фактора свертывания крови rFVIIa / Е.В. Шведова, О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, Р.А. Волкова, В.П. Бондарев, М.А. Смоллов, Р.Р. Шукуров, А.Ю. Вишневский // Гематология и трансфузиология. – 2018. -Т. 63, №4. - С. 334-342.

17. **Волкова, Р.А.** Современные проблемы стандартных образцов лекарственных средств в Российской Федерации / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, О.Б. Устинникова, Е.И. Саканян, В.А. Меркулов, А.А. Мовсесянц, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир // Фармация. – 2020. – Т.69, №2. – С.5-11.

18. **Устинникова, О.Б.** Оценка профиля N-гликозилирования молекулы рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa / О.Б. Устинникова, О.Б. Рунова, А.А. Мовсесянц, Р.Р. Шукуров, М.А. Смоллов, Р.А. Хамитов // Молекулярная медицина. – 2020. – Т. 18, №. 4. – С.50-55.

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

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

21. **Рунова, О.Б.** Разработка условий прямого количественного определения аминокислот в биологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия /

О.Б. Рунова, М.Г. Коротков, О.Б. Устинникова // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55, № 6. - С. 53-58.

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

23. Макарищева, Д.Д. Разработка методики количественного определения ионов алюминия в сорбированных препаратах методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией / Д.Д. Макарищева, О.Н. Колесникова, В.Е. Трегубова, О.Б. Устинникова // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56, №4. – С. 53-58.

24. Устинникова, О.Б. Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков / О.Б. Устинникова, Р.А. Волкова, А.А. Мовсисянц, В.А. Меркулов, В.П. Бондарев // БИО препараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2022. - Т.22, №2. – С. 218-225.

25. Рунова, О.Б. Разработка методики количественного определения полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.Б. Рунова, М.Г. Коротков, О.Б. Устинникова // Химико-фармацевтический журнал. - 2024. - Т.57, №12. - С.59-64.

26. Волкова, Р.А. Требования к материалам раздела по стандартным образцам, представляемым в досье на биологические лекарственные препараты / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, О.Б. Устинникова, К.А. Саркисян, А.А. Мовсисянц, В.А. Меркулов, В.В. Косенко // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2024. - Т.24, №1. - С.7-20.

27. Устинникова, О.Б. Перспективные вопросы оценки физико-химических показателей качества иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях формирования регуляторной системы ЕАЭС / О.Б. Устинникова, И.М. Щербаченко, О.Н. Колесникова, Д.Д. Макарищева, Ю.Е. Исакина, О.Б. Рунова // Биомедицина. - 2024. - Т.20, №3Е. - С.117-128.

Патенты

1. Патент 2700831 Российской Федерации, МПК G01N 30/02 (2006.01). Способ количественного определения глицина в биологических лекарственных препаратах методом гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии / Рунова О.Б., Коротков М.Г., Устинникова О.Б. Заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (RU). - №2019101963; заявл. 24.01.2019; опубл. 23.09.2019, бюл. №27. – 18с.

2. Патент 2780675 Российской Федерации, МПК А61К 38/19 (2006.01), С07К 14/565 (2006.01). Способ подтверждения структуры рекомбинантного интерферона бета-1b / Устинникова О.Б., Голощапова Е.О., Минеро А.С., Рунова О.Б. Заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (RU). - №2021127813; заявл. 22.09.2021; опубл. 28.09.2022, бюл. №28. – 17с.

3. Патент 2799235 Российской Федерации, МПК G01N 21/74 (2006.01). Способ количественного определения ионов алюминия атомно-абсорбционной спектроскопией

с электротермической атомизацией / Макарищева Д.Д., Трегубова В.Е., Колесникова О.Н., **Устинникова О.Б.** Заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (RU). - №2022111440; заявл. 27.04.2022; опубл. 04.07.2023, бюл. №19. – 13с.

4. Патент 2812788 Российской Федерации, МПК G01N 30/06 (2006.01), G01N 30/74 (2006.01), G01N 30/34 (2006.01). Определение полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах / Рунова О.Б., Коротков М.Г., **Устинникова О.Б.** Заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (RU). - №2023117689; заявл. 05.07.2023; опубл. 02.02.2024, бюл. №4. – 13с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААС-ЭТ - Атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией
БЛП - Биологические лекарственные препараты
ВЭЖХ - Высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС/МС - Высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией
ГФ РФ - Государственная фармакопея Российской Федерации
ЕАЭС - Евразийский экономический союз
ЕФ - Европейская фармакопея
МНН - Международное непатентованное наименование
НД - Нормативная документация производителя
ОФ-ВЭЖХ - Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФС - Общая фармакопейная статья
РФСК - Рекомбинантный фактор свертывания крови
СО - Стандартный образец
СОпр- Стандартный образец предприятия
ФС - Фармакопейная статья
ФСО - Фармакопейный стандартный образец
ЧСА - Человеческий сывороточный альбумин
CID - Столкновительно-индуцированная фрагментация (Collision-induced dissociation)
CRS - Химический стандартный образец (Chemical reference standard)
EDQM - Европейский директорат по качеству медицинских препаратов (European Directorate for the Quality of Medicines)
EMA/ЕМЕА- Европейское агентство по оценке лекарственных средств (European Medicines Agency)
ESI - Ионизация электроспреем (Electrospray ionization)
HILIC - Хроматография гидрофильного взаимодействия (Hydrophilic interaction chromatography)
ICH - Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения (International Council for Harmonisation)
PEG- Полиэтиленгликоль
rINF-alfa2b (Met) - Рекомбинантный интерферон alfa2b, содержащий N-концевой метионин
rINF-alfa2b (no-Met) - Рекомбинантный интерферон alfa2b, не содержащий N-концевой метионин
rINF-beta1b - Рекомбинантный интерферон beta1b

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность научному консультанту, доктору биологических наук, старшему научному сотруднику Раузе Асхатовне Волковой за содействие, помощь и поддержку.

Выражаю благодарность руководству ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России за содействие при выполнении данной работы.

Выражаю благодарность и признательность всему коллективу лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов и лично главному эксперту лаборатории, кандидату химических наук Ольге Борисовне Руновой за поддержку и помощь, оказанные при выполнении работы.

Особую благодарность и признательность выражаю доктору медицинских наук, профессору Владимиру Петровичу Бондареву, доктору медицинских наук, профессору Арташесу Аваковичу Мовсисянцу и доктору биологических наук Наталье Александровне Алпатовой, за поддержку и содействие на всех этапах выполнения работы.

Выражаю благодарность руководителям и сотрудникам фармацевтических компаний ООО «Фармапарк», АО «Генериум», ООО «Ферон», ООО «НПП «Фармаклон», ООО «Фирн-М», а также сотрудникам ФГБУН «Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН и АНО ВО «Университет «Сириус» за помощь и взаимное сотрудничество.