

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ
СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Устинникова Ольга Борисовна

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

1.5.6 Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
Доктор биологических наук
Волкова Рауза Асхатовна

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	11
Цель исследования	15
Задачи исследования	15
Научная новизна	16
Теоретическая и практическая значимость работы	19
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	23
Методология и методы исследования	24
Материалы исследования	25
Методы исследования	33
Статистические методы исследования	43
Личный вклад автора в получение результатов	44
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	46
Степень достоверности и апробация результатов	47
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	49
1.1. Биотехнологические лекарственные препараты. Структурные особенности рекомбинантных терапевтических белков и проблемные вопросы подтверждения подлинности структуры.....	49
1.1.1. Рекомбинантные интерфероны альфа и бета	55
1.1.2. Рекомбинантные факторы свертывания крови	63
1.1.3. Рекомбинантные PEG-модифицированные терапевтические белки.....	71
1.2. Актуальные вспомогательные вещества с составе биологических лекарственных препаратов и особенности их оценки.....	79
1.2.1. Стабилизаторы - полисорбат 80 и аминокислоты.....	80
1.2.2. Адьюванты.....	92
Резюме.....	99

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	102
ГЛАВА 2. Анализ особенностей оценки подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков с целью разработки общих гармонизированных требований.....	102
2.1. Особенности оценки подлинности структуры рекомбинантных интерферонов альфа и бета	103
2.2. Особенности оценки подлинности структуры рекомбинантных факторов свертывания крови.....	107
2.3. Особенности оценки подлинности структуры и чистоты PEG-модифицированных белков.....	113
2.4. Систематизация требований к разработке и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков.....	125
Резюме.....	130
ГЛАВА 3. Исследования по практическому применению требований к разработке и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности рекомбинантных терапевтических белков на уровне аминокислотной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций.....	133
3.1. Оптимизация оценки подлинности рекомбинантных интерферонов альфа и бета на уровне аминокислотной последовательности.....	134
3.1.1. Стандартизация оценки аминокислотной последовательности рекомбинантных интерферонов альфа-2b, содержащих и не содержащих N-концевой метионин	134
3.1.2. Стандартизация оценки аминокислотной последовательности интерферона бета-1b.....	159
3.2. Оптимизация оценки подлинности структуры рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa.....	170
3.2.1. Стандартизация оценки аминокислотной последовательности	

рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa.....	171
3.2.2. Стандартизация оценки гликанового профиля рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa.....	175
Резюме.....	184
ГЛАВА 4. Оптимизация оценки вспомогательных веществ. Разработка унифицированных методик	187
4.1. Оптимизация количественной оценки полисорбата 80 в составе БЛП.....	188
4.2. Оптимизация количественной оценки аминокислот в составе биологических лекарственных препаратов.....	207
4.3. Оптимизация количественной оценки алюминия в составе биологических лекарственных препаратов.....	221
Резюме.....	228
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	232
ВЫВОДЫ.....	240
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	243
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	245
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	246
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	249
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	309
Приложение 1.....	309
Приложение 2.....	310
Приложение 3.....	311
БЛАГОДАРНОСТИ.....	312

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Биологические лекарственные препараты представляют собой обширную, структурно и функционально разнообразную группу лекарственных средств, обращение которых регулируется на государственном уровне.

Определение биологических лекарственных препаратов, приведенное в Федеральном законе Российской Федерации №61 от 12.04.2010 «Об обращении лекарственных средств», как лекарственных препаратов, «действующее вещество которых произведено или выделено из биологического источника и для характеристики свойств и контроля качества которых необходимо сочетание биологических и физико-химических методов анализа с оценкой производственного процесса и методов его контроля», охватывает широкий спектр лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке [3].

В соответствии с классификацией, приведенной в нормативно-правовых актах Евразийского экономического союза (Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 №89 «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств»), к биологическим лекарственным препаратам относятся «иммунобиологические лекарственные препараты, биотехнологические лекарственные препараты, препараты, полученные из плазмы человека, препараты пробиотиков, а также лекарственные препараты, содержащие активные фармацевтические субстанции нерекombинантного происхождения, произведенные или выделенные из биологических источников...» [60].

Высокая востребованность данных групп лекарственных средств, обусловленная широким спектром их применения, вызывает необходимость разработки новых и совершенствования имеющихся биологических лекарственных препаратов. При этом безопасность и эффективность

биологических лекарственных препаратов обеспечивается, в том числе, существующей методологией оценки качества данных препаратов, ориентированной на их специфику.

Методология оценки качества биологических лекарственных препаратов основана на регулирующих и регламентирующих требованиях, изложенных в отечественных и международных нормативно-правовых актах (документах), таких как ФЗ № 61 от 12.04.2010 «Об обращении лекарственных средств», ФЗ от 27.12.2002 № 184 «О техническом регулировании»; Руководства ВОЗ; Стандарты ISO серии 9000; Требования к аккредитованным лабораториям – ГОСТ ISO 17025; Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016г. №78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения»; Гармонизированные международные требования в области обращения ЛС (ICH); Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11.08.2020 №100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 июля 2023 г. № 377 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей», Государственной фармакопеи Российской Федерации, Приказа ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России от 26 мая 2021 г. № 147 «О включении фармакопейных стандартных образцов в Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи» и иных нормативных документах и.т.д. [2-4, 9-11,19,22,23,28,31,32,37,57-59, 60,68,69,74,127,129,131,139,140,145-147, 149,150].

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. Одновременно с созданием и реализацией в практику новых биологических лекарственных препаратов расширяется нормативно-регуляторная база, лежащая в основе

методологии оценки качества. При этом развитие биофармацевтической отрасли, согласно положениям Стратегии развития фармацевтической промышленности (Фарма 2030), заключается также в обеспечении качества лекарственных средств путем совершенствования системы регистрации и контроля качества [6].

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. При этом 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.

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. При этом методическое обеспечение индивидуально для каждого препарата, поскольку формируется в процессе его разработки, производства и опыта применения. Что же касается стандартных образцов - обеспечение независимости фармацевтического рынка РФ заключается, в том числе, в разработке и аттестации фармакопейных и/или стандартных образцов предприятий, в полной мере замещающих существующие международные востребованные стандартные образцы [5,6,8].

Одна из тенденций развития регуляторных требований заключается в максимально полной характеристике действующего вещества и готового продукта

по критическим показателям качества, подтверждающим подлинность, активность и безопасность, а также количественный анализ вспомогательных веществ, использующихся в процессе производства лекарственных средств. Данный подход требует повышенного внимания к перечню показателей качества в спецификации (перечень показателей качества и установленных норм), оценки качества полупродуктов на промежуточных стадиях производства (контрольные точки) и исходной характеристике действующего вещества, осуществляемой при его разработке.

Важно отметить, что разнообразие биологических лекарственных препаратов предусматривает дифференцированный подход к оценке качества биологических и физико-химических показателей, что находит отражение в международных и отечественных фармакопейных и регуляторных требованиях. Однако, установленные требования, как правило, имеют общий характер и не могут учитывать особенности той или иной технологии. Создание новых препаратов, их регистрация и ввод в гражданский оборот всегда предшествует разработке фармакопейных требований. В связи с этим установленные требования к лекарственным препаратам, разработанным в последние годы с применением современных биотехнологий (модификации ранее производимых лекарственных препаратов или лекарственных препаратов нового поколения, получаемые на принципиально новой платформе) могут отсутствовать в отечественной и международных фармакопеях.

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. В Российской Федерации процесс регистрации лекарственных средств в соответствии с правилами Евразийского экономического союза, начавшийся в апреле 2019 года, должен быть завершён к 31 декабря 2025 года. Установленные требования обязывают производителей

лекарственных средств в указанные сроки привести регистрационные досье на все зарегистрированные лекарственные средства с целью их обращения на фармацевтическом рынке в соответствии с Правилами Евразийского экономического союза.

При этом фармацевтическая экспертиза качества образцов лекарственных средств в полном объеме спецификации является необходимым этапом для регистрационных процедур Российской Федерации и Евразийского экономического союза.

Объем показателей качества в спецификации, а также наполнение разделов регистрационного досье, в частности требования к характеристике полупродуктов и/или фармацевтических субстанций, применительно к конкретному продукту, а также требования к оценке качества готового продукта определяются «Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (Решение №89 2016 г Евразийской экономической комиссии), а также положениями Фармакопеи Евразийского экономического союза (Решение №100 Евразийской экономической комиссии) [57,60]. В обеспечение качества биологических лекарственных препаратов данные документы вносят общее понимание и принципиальные требования, поскольку формат общих регуляторных документов не предполагает детализацию фармакопейных требований к конкретному продукту, в зависимости от технологии его получения и/или природы действующего вещества.

Фармакопея Евразийского экономического союза вступила в действие 1 марта 2021 года и в настоящее время находится в процессе формирования. В основу Фармакопеи заложена концепция гармонизации фармакопей государств-членов Евразийского экономического союза, принятая Коллегией Евразийской экономической комиссии (Решение от 22 сентября 2015 г. № 119) [58]. В данном решении отражена особенность Государственной фармакопеи 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. При этом базовой признана Европейская Фармакопея.

Вместе с тем продолжается работа по актуализации и дополнению физико-химических методов в Государственной фармакопее Российской Федерации, которая остается сводом нормативных требований, отражающих особенности лекарственных средств 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 Евразийского экономического союза, а также в соответствии с основными международными специализированными документами: Европейского агентства по оценке лекарственных средств (EMA), Европейского директората по качеству медицинских препаратов (EDQM) и Международного совета по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения (ICH).

Существенным фактором, влияющим на методологию оценки качества биологических лекарственных препаратов, является обязательное соответствие методических решений требованиям к работе лабораторий, аккредитованным в системе менеджмента качества [28]. Внедрение в лабораторную практику высокотехнологичного оборудования позволяет разрабатывать новые методики контроля качества биотехнологических продуктов, обладающие большей чувствительностью и прецизионностью. Следствием данного подхода является наличие в нормативной базе принципиально отличающихся способов оценки одного вещества. Данная ситуация, с одной стороны, расширяет возможности

производителей при выборе методов оценки тех или иных показателей качества. С другой стороны - усложняет лабораторную фармацевтическую экспертизу при регистрации/внесении изменений в досье на препарат или в рамках подтверждения соответствия качества биологических лекарственных препаратов при вводе в гражданский оборот. Разнообразие препаратов и методических решений создает технические проблемы при оценке качества образцов: необходимость наличия разнообразного оборудования, редко используемых реактивов и материалов, отсутствие технических навыков персонала контрольно-аналитических лабораторий при воспроизведении оригинальных методик производителей. Кроме того, использование различных подходов и методов оценки для одних и тех же показателей качества препаратов одной группы и/или одного международного непатентованного наименования не исключает возможности появления отличий основных характеристик, что может быть актуальным для обеспечения безопасности и эффективности.

Таким образом, разработка и актуализация нормативно-правовых документов, основанных на принципах гармонизации международных и отечественных регуляторных требований к биотехнологическим медицинским препаратам; разработка высокотехнологичных 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, является 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"[32].

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

Фармакопея Евразийского экономического союза в части требований к биологическим лекарственным препаратам находится в стадии формирования.

Общие требования к качеству биологических лекарственных препаратов изложены в ФЗ № 61. "Об обращении лекарственных средств" РФ от 12 апреля 2010 г. и в Решении № 89 от 3 ноября 2016г № 89 Евразийского экономического союза "Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза" [3,60].

Регламентирующие требования к биологическим и биотехнологическим лекарственным средствам, в том числе биоподобным лекарственным средствам, также содержатся в документах Международного совета по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения(Q1A;Q2;Q4;Q5A,B,C,D,E;Q6B;Q11) и Руководствах Европейского агентства по оценке лекарственных средств, а также руководствах ВОЗ [122-146].

Более детальная информация по оценке качества биологических лекарственных препаратов изложена в общих фармакопейных статьях и монографиях, ориентированных на конкретный продукт.

Применительно к объектам исследования, Европейская фармакопея содержит монографии - Interferon alfa-2 concentrated solution (rIFN-alfa2b) 07/2015:1110; Interferon beta-1a concentrated solution (rINF-beta1a) 01/2009:1639; Human

coagulation factor VIIa (rDNA) concentrated solution (rFVIIa) 01/2015:2534; Aluminum in absorbed vaccines 01/2008:20513 [112,114,115].

Согласно монографии 07/2015:1110 оценка подлинности структуры rIFN- α 2b предполагает использование стандартного образца CRS (кат. № I0320301) в комплексе с методиками пептидного картирования, изоэлектрического фокусирования, электрофореза в ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Этот образец CRS представляет собой очищенный rIFN- α 2b не содержащий N-концевой метионин (rIFN- α 2b(no-Met)), что может быть неприемлемо для пептидного картирования rIFN- α 2b, содержащего N-концевой метионин (rIFN- α 2b(Met)).

Согласно монографии 01/2009:1639 оценка подлинности структуры rINF- β 1a предполагает использование стандартного образца CRS (кат. № Y0001101) в комплексе с методиками пептидного картирования и масс-спектрометрического анализа для анализа профиля гликанов. Этот образец CRS представляет собой rINF- β 1a и его структурные различия, прежде всего наличие гликозилирования, не позволяют использовать данный образец для оценки подлинности структуры rINF- β 1b - негликозилированного и менее стабильного белка. Требования к оценке качества rINF- β 1b в Европейской фармакопее отсутствуют.

Согласно монографии 01/2015:2534 для подтверждения структуры молекулы rFVIIa используют комплекс следующих методов и СО: метод пептидного картирования и метод ионообменной ВЭЖХ (гликаны - распределение изоформ) в сравнении с образцом CRS, кат. № Y0001663. Нормативная документация на лекарственные препараты, прошедшие процедуру регистрации ранее выхода данной монографии (2015 г), не предусматривала оценку профиля гликоформ. Кроме того, профиль гликозилирования биоподобного препарата, формирующийся в процессе биосинтеза технологического процесса другого производителя, может иметь отличия от оригинального препарата или международного стандартного образца, которым является образец CRS.

Международные и отечественные фармакопейные требования к PEG-модифицированным белкам на момент выполнения данного исследования отсутствовали, за исключением документа Европейского агентства по оценке лекарственных средств «Руководство по описанию состава пегилированных белков в краткой характеристике препарата» [141]. Также отсутствовали требования к качеству лекарственных средств на основе рекомбинантных факторов свертывания крови и рекомбинантных интерферонов в Государственной фармакопее РФ.

Одним из важных разделов фармацевтической экспертизы качества биологических лекарственных препаратов является оценка содержания вспомогательных веществ.

В соответствии с монографией 01/2008:20513 определение ионов алюминия в сорбированных вакцинах может быть проведено методом комплексонометрического титрования. Однако, данный метод практически не применяется зарубежными производителями, ориентированными на разработку собственных методик, основанных на использовании высокотехнологичного оборудования.

В Государственной фармакопее РФ методика количественной оценки алюминия изложена в ОФС.1.7.2.0016.15 «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах» [38].

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) споследующей экстракцией в органическую фазу [289,390]. Данные методики, по сравнению с методиками ВЭЖХ, отличает невысокая точность. Методики ВЭЖХ, основанные на УФ-детектировании [55,177], предполагают детекцию производных полисорбата 80 по олеиновой кислоте, что не учитывает возможное различное содержание

олеиновой кислоты в образцах полисорбата 80 разных производителей. В научной литературе описаны методики прямого определения полисорбата 80 методом ВЭЖХ с применением детекторов заряженного аэрозоля, углового светорассеяния, а также масс-спектрометрического детектирования [217,237,265,338,339,350]. Однако не все эти методы обладают линейностью отклика и, кроме того, использование данных методов (прежде всего детекторов) в настоящее время пока сложно назвать рутинной лабораторной практикой.

Методики количественной оценки аминокислот описаны в монографии Европейской фармакопеи 2.2.56 Amino Acid analysis [106], однако все они предполагают пост- или предколоночную 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 в научной литературе описаны методики прямого определения аминокислот методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим или интегрированным импульсным амперометрическим детектированием [314,431], которые в настоящее время не имеют широкого применения в качестве методов рутинного контроля качества при посерийном анализе биологических лекарственных препаратов.

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

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 дисиазированной 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 работы

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 стандартизируют 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 комплексонометрического 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 белки, полученные с применением технологии рекомбинантной ДНК» и фармакопейная статья «Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b, субстанция раствор, раствор замороженный»; Руководство «Требования к стандартным образцам в дозе 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 на (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. Объектами исследования являются: препараты или их субстанции на основе рекомбинантных интерферонов альфа и бета, рекомбинантного седьмого активированного фактора свертывания крови, PEG-модифицированных рекомбинантных терапевтических белков; вакцины; анатоксины; препараты иммуноглобулинов.

Исследование включало выполнение теоретического и экспериментального этапов работ.

Теоретический этап работы состоял в:

- анализе особенностей оценки подлинности структуры рекомбинантных факторов свертывания крови, интерферонов альфа и бета, PEG-модифицированных терапевтических белков;

- обосновании необходимости разработки и актуализации требований к подтверждению подлинности структуры рекомбинантных белков и их гармонизации с международными требованиями;

- обосновании необходимости 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;

- обосновании необходимости оптимизации оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов.

Экспериментальный этап работы состоял в практическом применении разработанных в ходе теоретического этапа требований:

- на основании теоретически разработанного алгоритма аттестации, разработке 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;

- разработке высокотехнологичных методик оценки вспомогательных веществ (адьюванта - геля гидроксида алюминия и стабилизаторов - полисорбата 80 и аминокислот), актуальность которых была выявлена при анализе состояния оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов.

Материалы исследования

К ГЛАВЕ 3

Образцы

1. rINF-alfa2b (Met), субстанция, ООО «Фармапарк», Россия. Кандидат в ФСО rINF-alfa2b (Met).
2. rINF-alfa2b (Met), субстанция, ООО НПП «Фармаклон», Россия.
3. rINF-alfa2b (no-Met), субстанция, ООО «Фармапарк», Россия.
4. rINF-alfa2b (no-Met), субстанция, ЗАО «Вектор-Медика», Россия.
5. rINF-alfa2b (no-Met), субстанция, ООО «Фирн М», Россия. Кандидат в ФСО rINF-alfa2b (no-Met).
6. rINF-beta1b, субстанция без ЧСА, ЗАО «Биокад», Россия.
7. rINF-beta1b, раствор (субстанция до добавления ЧСА), АО «Генериум», Россия.
8. rINF-beta1b, лиофилизат (субстанция до добавления ЧСА), АО «Генериум», Россия. Кандидат в ФСО rINF-beta1b.
9. «Коагил-VII», 1,2 мг/флакон, АО «Генериум», Россия. Кандидат в СОпр rFVIIa.
10. «Коагил-VII», (Эптаког альфа активированный - 4,8 мг/флакон), АО «Генериум», Россия.

11. «НовоСэвен», (Эптаког альфа активированный - 1,2 мг/флакон), «Ново Нордиск А/С», Дания.

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

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

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

Реактивы

1. Трипсин (№ 1 - активность 8868 ЕД/мг, № 2 - активность 9146 ЕД/мг), Sigma-Aldrich, США, кат. № T8658.

2. Трипсин (№ 3 - активность 3203 ЕД/мг), ПанЭко, Россия, кат. № П052.

3. Трипсин (№ 4 - активность 13165 ЕД/мг), Sigma-Aldrich, США, кат. № 1426

4. Эндопротеаза Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8, Sigma-Aldrich, США, кат. № P2922.

5. Ферменты для мультиферментного протеолиза кандидатов ФСО rINF-alfa2b (Met) и rINF-beta1b: иммобилизованный трипсин (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № 60109-101-B), протеаза Glu-C (Promega, США, кат. № V1651), пепсин (Promega, США, кат. № V1959), протеаза Asp-N (Promega, США, кат. № VA1160), протеаза Lys-C (Promega, США, кат. № VA1170).

6. Ферменты для мультиферментного протеолиза кандидата в ФСО rINF-alfa2b (no-Met): Эндопротеаза Trypsin/Lys-C Mix (MassSpecGrade, Promega, США, кат. № V5073); Эндопротеаза Lys-C (MassSpecGrade, NewEngland Biolabs, Великобритания, кат. № P8109S); Эндопротеаза Glu-C (MassSpecGrade, Promega, США, кат. № V1651).

7. Трипсин, Sigma-Aldrich, США, кат. № T1426.

8. Трипсин высокочистый, Promega, США, кат. № V511A.

9. Набор для дегликозилирования GLYКОprep, Prozyme, США, кат. № GP96NG-AB.

10. Гуанидина гидрохлорид, Sigma-Aldrich, США, кат. № 3272.
11. Дитиотреитол-DL для молекулярной биологии 99%+, Panreac, США.
12. Кислота уксусная, Sigma-Aldrich, США, кат. № A6283.
13. Натрия ацетат, PanReac AppliChem, Испания, кат. № 131633.1211.
14. Кислота трифторуксусная, Sigma-Aldrich, США, кат. № T6508.
15. Ацетонитрил LC/MS grade, Fisher Chemical, США, кат. № A/0627/17.
16. Калия дигидрофосфат, Fluka, США, кат. № 60221.
17. Натрия гидроксид, Sigma-Aldrich, США, кат. № 30620
18. Изопропанол LC/MS grade, VWR, США.
19. Кислота муравьиная 99%+ LC/MS grade, VWR, США, кат.№ 84865.180.
20. Кислота соляная 37%, Panreac, США.
21. Трис основной, Trizma Base 99.9%+, Sigma-Aldrich, США.
22. Вials хроматографические 2 мл, ThermoScientific, США, Chromacol 2-SWGKST-CPK.
23. Вials центрифужные пластиковые 1,5мл, BIOplastics, LowAdhesion Tube, США, кат. № B74030.
24. Мочевина для молекулярной биологии, Sigma-Aldrich, США.
25. Йодацетамид 99%+, Sigma-Aldrich, США.

К ГЛАВЕ 4

Образцы

Раздел 4.1. «Оптимизация количественной оценки полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах»:

1. Образец 1 - «Октофактор» (Мороктоког альфа - 250 МЕ, 500 МЕ, 1500 МЕ, 2000 МЕ), АО «Генериум», Россия.
2. Образец 2 - «НовоСэвен» (Эптаког альфа активированный - 1,2 мг/флакон), «Ново Нордиск А/С», Дания.
3. Образец 3 - «НовоЭйт» (Туроктоког альфа - 250 МЕ), «Ново Нордиск А/С», Дания.

4. Образец 4 - «Адвейт» (Октоког альфа - 500 МЕ), «Такеда Мануфекчуриг Австрия АГ», Австрия.

5. Образец 5 - «ПолиовакСин» (вакцина полиомиелитная культуральная очищенная концентрированная инактивированная жидкая из аттенуированных штаммов Сэбина), ООО «ИНВАК», Россия.

6. Образец 6 - «Превенар 13» (вакцина пневмококковая полисахаридная конъюгированная адсорбированная, тринадцативалентная), ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия.

7. Образец 7 - «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.

8. Образец 8 - «Лайфферон» (интерферон альфа-2b - 3 млн МЕ), АО «Вектор Медика», Россия.

9. Образец 9 - «Хумира» (Адалимумаб), ООО "ЭббВи", Россия.

10. Образец 10 - «Хайцентра» (иммуноглобулин человека нормальный), «СиЭсЭл Беринг АГ», Швейцария.

11. Образец 11 - Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор (замороженный), ООО «Фармапарк», Россия.

12. Образец 12 - Стандартный раствор полисорбата 80 с концентрацией 2 мг/мл, приготовленный по точной навеске из реактива Panreac AppliChem, Испания, кат. № 142050. Растворитель - вода очищенная.

13. Образец 13 - Рабочий раствор полисорбата 80, приготовленный из образца 12 с концентрацией 0,1 мг/мл, а также с концентрациями 0,02 мг/мл; 0,04 мг/мл; 0,08 мг/мл; 0,16 мг/мл и 0,2 мг/мл.

14. Образец 14 - Стандартный раствор полисорбата 80 с концентрацией 1 мг/мл, приготовленный по точной навеске из реактива Merck, Германия, кат. №. 8.170061. Растворитель - вода очищенная.

15. Образец 15 - Рабочие растворы полисорбата80, приготовленные из образца 14 с концентрациями 0,02 мг/мл; 0,04 мг/мл; 0,08 мг/мл; 0,16 мг/мл и 0,2 мг/мл.

Раздел «4.2. Оптимизация количественной оценки аминокислот в составе биологических лекарственных препаратов»:

1. Образец 1 - Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для внутримышечного введения, ОБУЗ «Ивановская станция переливания крови», Россия.

2. Образец 2 - Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий, АО «НПО «Микроген», Россия.

3. Образец 3 - Иммуноглобулин человека противостолбнячный, раствор для внутримышечного введения, АО «НПО «Микроген», Россия.

4. Образец 4 - «Иммуновенин», иммуноглобулин человека нормальный, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, АО «НПО «Микроген», Россия.

5. Образец 5 - «НовоЭйт» (Туроктоког альфа - 250 МЕ), «Ново Нордиск А/С», Дания.

6. Образец 6 – «Фанди» (фактор свертывания крови VIII + фактор Виллебранда), Институт Грифолз, С.А., Испания.

7. Образец 7 - «Октофактор» (Мороктоког альфа), АО «Генериум», Россия.

8. Образец 8 - «Элоктейт» (Эфмороктоког альфа), Веттер Фарма-Фертигунг ГмбХ и Ко, Германия и Патеон Италия С.п.А., Италия.

9. Образец 9 - Международный стандартный образец иммуноглобулина человека нормальный (для оценки молекулярных параметров), BRP (EDQM, кат. № Y0000488/2.00 .

10. Образец 10 - Стандартный водный раствор глицина с концентрацией 36 мг/мл приготовленный по точной навеске из реактива Merck, Германия, кат. № 50046.

11. Образец 11 - Рабочий раствор глицина, приготовленный из образца 11 с концентрациями 1,2 мг/мл; 1,8 мг/мл; 2,4 мг/мл; 3,0 мг/мл; 3,6 мг/мл.

12. Образец 12 - Модельная смесь из стандартных растворов аминокислот фармакопейного качества приготовленные по точной навеске: метионин, гистидин, аргинин с конечной концентрацией 0,2 мг/мл; пролин, глицин, лизин с конечной концентрацией 2,0 мг/мл.

13. Образец 13 - Рабочие растворы аминокислот из стандартных растворов метионина, гистидина, аргинина в диапазоне концентраций от 0,02 мг/мл до 0,2 мг/мл; пролина, глицина, лизина в диапазоне концентраций от 0,5 мг/мл до 1,5 мг/мл.

Раздел «4.3. Оптимизация количественной оценки алюминия в составе биологических лекарственных препаратов»:

1. Образец 1 - ФСО 3.1.00423 содержания алюминия в сорбированных препарат (1660 мг/л ионов алюминия), Россия.

2. Образец 2 - ФСО 3.1.00333 содержания алюминия в сорбированных препаратах (810 мг/л ионов алюминия), Россия.

3. Образец 3 - ГСО 7758-2000 ионов алюминия (1000 мг/л ионов алюминия) ЭАА Эко-аналитика, Россия.

4. Образец 4 - ICP Al Standard (1000 мг/л ионов алюминия), Merck, Германия.

5. Образец 5 - Вакцина против гепатита В, ООО «Комбиотех», Россия.

6. Образец 6 - Вакцина против гепатита В, Серум Инститьют, Индия.

7. Образец 7 - АДС-М-анатоксин, АО «НПО «Микроген», Россия.

8. Образец 8 - Анатоксин стафилококковый, Филиал "Медгамал" НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, Россия.

9. Образец 9 - «ЭпиВакКорона» (вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19), ФБУН ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия.

10. Образец 10 - «Адасель» (вакцина для профилактики дифтерии (с уменьшенным содержанием антигена), коклюша (с уменьшенным содержанием

антигена, бесклеточная) и столбняка адсорбированная, Санофи Пастер Лимитед, Канада.

11. Образец 11 - «Инфанрикс Гекса» (вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная), полиомиелита (инактивированная), гепатит В комбинированная адсорбированная и капсульный полисахарид *Haemophilus influenza* тип b конъюгированный со столбнячным анатоксином, адсорбированный), «ЗАО ГлаксоСмитКляйн Трейдинг», Россия.

12. Образец 12 - «Пентаксим», вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenza* тип b конъюгированная, Санофи Пастер С.А., Франция.

13. Образец 13 - Тетраанатоксин, анатоксин ботулинический, анатоксин столбнячный, АО «НПО «Микроген»», Россия.

14. Образец 14 - АКДС, вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная, АО «НПО «Микроген»», Россия.

15. Образец 15 - АС анатоксин столбнячный очищенный адсорбированный жидкий, АО «НПО «Микроген»», Россия.

16. Образец 16 - АДС анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный жидкий, АО «НПО «Микроген»», Россия.

17. Образец 17 - АД-М-анатоксин анатоксин дифтерийный очищенный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена – жидкий, АО «НПО «Микроген»», Россия.

18. Образец 18 - АС анатоксин столбнячный очищенный адсорбированный жидкий для доноров, АО «НПО «Микроген»», Россия.

19. Образец 19 - Суспензия, приготовленная путем диспергирования точной навески алюминия гидроксида Алюминия гидроксид, Sigma-Aldrich в воде очищенной. Содержание алюминия около 0,958 мг/мл с учетом влажности реактива.

Реактивы

1. Натрия дигидрофосфат моногидрат, Sigma-Aldrich, США, кат. № S9638 или Merck, Германия, кат № AM1616846.
2. Натрия гидрофосфат дигидрат, Merck, Германия, кат. № 1.28237.
3. Натрия сульфат, CarlRoth, Германия, кат. № 8631.2.
4. Натрия додецилсульфат, Sigma-Aldrich, США, кат. № 436143.
5. Натрия азид, Sigma-Aldrich, США, кат. № S2002.
6. Дихлорэтан, Merck, Германия, кат. № 1.94607.
7. Нитрат кобальта гексагидрат, Sigma-Aldrich, США, кат. № 239267.
8. Тиоцианат аммония, Merck, Германия, кат. №. 1.01213.
9. Полисорбат 80, Panreac AppliChem, Испания, кат. № 142050.
10. Полисорбат 80, Merck, Германия, кат. №. 8.170061.
11. Формиат аммония, Sigma-Aldrich, США, кат. № 70221 или Honeywell Fluka, США, кат. № 17843.
12. Ацетат аммония, Honeywell Fluka, США, кат. № 17836.
13. Муравьиная кислота, Merck, Германия, кат. № 33015 или Scharlabhemie, Испания, кат. № AC10861000.
14. Ацетонитрил, Fisher Chemical, США, кат. № A/0627/171.
15. Метионин, Fluka, Германия, кат. № 64320.
16. Пролин, Sigma-Aldrich, США, кат. № P5607.
17. Глицин, Merck, Германия, кат. № 50046.
18. Гистидин, Sigma-Aldrich, США, кат. № H8000.
19. Аргинин, Merck, Германия, кат. № 1.01542.
20. Лизин, Sigma-Aldrich, США, кат. № L5501.
21. Натрия гидроксид, Sigma-Aldrich, США, кат. № S5881.
22. Азотная кислота, Merck, Германия, кат. № 1.00456.
23. Соляная кислота, Merck, Германия, кат. № 1.15186.
24. Алюминия гидроксид, Sigma-Aldrich, кат. № 239186.

Методы исследования

ГЛАВА 3

Масс-спектрометрия высокого разрешения

Метод ВЭЖХ/МС/МС с ионизацией электрораспылением (ESI) и вторичной ионизацией, инициируемой соударениями (CID) использовали для:

- верификации аминокислотной последовательности молекул белка кандидатов ФСО rINF-alfa2b (Met и no-Met) с подтверждением дисульфидных связей в положениях C₂₋₉₉; C₃₀₋₁₃₉ и C₁₋₉₈;C₂₉₋₁₃₈ соответственно;

- верификации аминокислотной последовательности молекулы белка кандидата ФСО rINF-beta1b с подтверждением дисульфидной связи в положении C₃₀₋₁₄₀;

- верификации аминокислотной последовательности молекулы белка кандидата СОпр rFVIIa;

- исследования профиля гликозилирования молекулы белка кандидата СОпр rFVIIa;

- идентификации пептидов соответствующих характеристическим пикам, полученным в результате мультиферментного протеолиза кандидатов ФСО rINF-alfa2b (Met и no-Met), кандидата ФСО rINF-beta1b, кандидата СОпр rFVIIa.

Подготовку образцов для верификации аминокислотной последовательности проводили путем гидролиза белка различными ферментами или их комбинацией в следующих вариантах: 1) после восстановления и алкилирования, 2) после алкилирования без предварительного восстановления, 3) нативного белка без восстановления и алкилирования. Для идентификации использовались параметры поиска, соответствующие использованному ферменту. 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 глутамин и аспарагина (Asn145 лёгкой и Asn170 тяжёлой цепей) при дегликозилировании; наличие О-гликозилирования (Ser52 и Ser60 лёгкой цепи); модификация глутамин 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.

Для верификации аминокислотной последовательности кандидата ФСО rINF- α 2b (Met) методом ВЭЖХ МС-анализа использовали хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) и хроматографическую колонку на основе C18. Колонку изготавливали непосредственно перед измерением, для чего капилляр промывали чистым метанолом в течение 5 минут, затем заполняли взвесью частиц C18 в метаноле под давлением 36 атмосфер. Мобильная фаза А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде. Мобильная фаза В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Скорость потока: 0,3 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на тандемном масс-спектрометре LTQ FT Ultra (Thermo Finnigan, США) с источником ионизации электрораспылением (ESI) и ионизацией, инициируемой соударениями (CID). 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). Поиск и идентификация несвязанных пептидов осуществлялись при помощи программы 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, осуществлялись при помощи программы MeroX2.0.1.4 (StavroX.com, ©MichaelGötze, University of Halle-Wittenberg, Германия). Для идентификации пептидов использовалась аминокислотная последовательность rINF-alfa2b, указанная в ЕФ 07/2015:1110 с учетом наличия N-концевого метионина[114].

Для верификации аминокислотной последовательности кандидата ФСО rINF-alfa-2b (no-Met) методом ВЭЖХ МС-анализа использовали систему УВЭЖХ UltiMate 3000 (Thermo Scientific, США). Для определения точной моноизотопной массы использовали хроматографическую 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). Скорость потока 0,3 мл/мин. Для верификация аминокислотной последовательности использовали хроматографическую 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. Скорость потока: 0,2 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре высокого разрешения Brukerma Xis II 4G ETD (Bruker, США) с источником ионизации электрораспылением (ESI) и ионизацией, инициируемой соударениями (CID). Проведение анализа и сбор данных производится в программе CompassHyStar из программного пакета BrukerCompass (Biopharma Compass, США). Для идентификации пептидов использовалась аминокислотная последовательность интерферона альфа-2b, указанная в ЕФ 07/2015:1110 [114].

Для верификации аминокислотной последовательности кандидата ФСО rINF-beta1b ВЭЖХ МС-анализа INF бета-1b использовали систему ВЭЖХ Infinity 1260 Capillary LC System (Agilent Technologies, США) с хроматографической 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. Скорость потока: 0,4 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью масс-спектрометрического детектора QTOF 6550 (Agilent Technologies, США). Разделение пептидов проходило в нанопотоковом режиме на устройстве ProtID-Chip-43 (Agilent Technologies, США). Для анализа результатов использовали программное обеспечение Peaks ABv.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада). Для идентификации пептидов использовалась аминокислотная последовательность rINF-beta1b, указанная в патентах [50,53].

Для верификации аминокислотной последовательности кандидата СОпр rFVIIa методом ВЭЖХ МС-анализа применяли схему простого трипсинолиза согласно протоколу ЕФ 01/2015:2534[112] и схему усиленного гидролиза, подразумевающую предварительное восстановление и дегликозилирование белка rFVIIa путем ферментативного расщепления N-гликанов пептид-N-гликозидазой F с последующим трипсинолизом, используя набор для дегликозилирования GLYKOprep (Prozime, США, кат. № GP96NG-AB). Для разделения продуктов гидролиза, полученных по вышеуказанным схемам, использовали систему ВЭЖХ Nexera X2 с детектором SPD M-30A (Shimadzu, Япония) с хроматографической 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. Скорость потока 0,5 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью масс-спектрометрического детектора 6500 iFunnel QTOF LC/MS (Agilent Technologies, США). Для анализа полученных результатов использовали программу Mass Hunter Qualitative Analysis v. B.07.00 SP2 с модулем BioConfirm B.08.00

(Agilent Technologies, США). В качестве референсной была взята аминокислотная последовательность rFVII, приведенная в ЕФ, монография 01/2015:2534 [112].

Подготовку образцов для оценки подлинности профиля гликозилирования молекулы белка кандидата СОпр rFVIIa проводили путем дегликозилирования исходной молекулы 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 [52,112].

Для ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия с флуоресцентным и МС-анализом использовали хроматографическую систему с детектором флуоресценции NexeraX2, детектор F-20Axs (Shimadzu, Япония), для разделения использовали хроматографическую колонку 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. Скорость потока 0,2 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью масс-детектора 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). В качестве референсного требования к составу олигосахаридов, а именно к соотношению числа заряженных и незаряженных гликанов, рассматривали требования, изложенные в ЕФ 01/2014:2534 [112].

Для ВЭЖХ МС-анализа пептидов, соответствующих характеристическим пикам, полученных в результате триптического гидролиза кандидата ФСО rINF- α 2b (Met) по протоколу ЕФ 07/2015:1110 [114] использовали систему ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США), хроматографическую колонку C18 YMC (кат. № AA30S051046, США). Фракции, соответствующие 8-ми характеристическим пикам отбирали препаративно. Далее проводили масс-спектрометрический анализ с использованием хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) и хроматографической колонки на основе C18. Колонку изготавливали непосредственно перед измерением, для чего капилляр промывали чистым метанолом в течение 5 минут, затем заполняли взвесью частиц C18 в метаноле под давлением 36 атмосфер. Мобильная фаза А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде. Мобильная фаза В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Скорость потока: 0,3 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на тандемном масс-спектрометре 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 ВЭЖХ МС-анализа пептидов, соответствующих характеристическим пикам, полученных в результате триптического гидролиза кандидата ФСО rINF- α 2b (no-Met) по протоколу ЕФ 07/2015:1110 использовали хроматографическую систему Vanquish FlexBinary ID 087 (ThermoFisher Scientific, США) с диодно-матричным детектором и хроматографическую колонку C18 YMC, (кат. №

AA30S051046, США). Мобильная фаза А: 0,1% раствор ТФУ в воде деионизированной. Мобильная фаза В: 0,1% раствор ТФУ в ацетонитриле. Скорость потока: 1,0 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью масс-спектрометра высокого разрешения Bruker maXis II 4G ETD (с источником ионизации электрораспылением (ESI) и ионизацией, инициируемой соударениями (CID) (Bruker, США). Проведение анализа и сбор данных производили в интегрированных программных пакетах Chromeleon 7.2 (ThermoFisher Scientific, США) и BrukerCompass (CompassHyStar) (BrukerCompass 2021, США). Для идентификации пептидов использовали аминокислотную последовательность rINF-alfa2b, указанную в ЕФ 07/2015:1110 [114].

Для ВЭЖХ МС-анализа пептидов, соответствующих характеристическим пикам, полученных в результате ферментативного гидролиза кандидата ФСО rINF-beta1b по разработанной в ходе настоящего исследования методике (патент РФ № 2780675), использовали систему Acquity (Waters, США) и хроматографическую колонку YMC-PackODS (кат.№ 0410006924, США). Фракции, соответствующие 7-ми характеристическим пикам отбирали препаративно. Далее проводили масс-спектрометрический анализ с использованием хроматографической системы Infinity 1260 CapillaryLCSytem (Agilent Technologies, США) с хроматографической 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. Скорость потока: 0,4 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью масс-спектрометрического детектора QTOF 6550 (Agilent Technologies, США). Разделение пептидов проходило в нанопотоковом режиме на устройстве ProtID-Chip-43 (Agilent Technologies, США). Для анализа результатов использовали

программное обеспечение PeaksABv.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада). Для идентификации пептидов использовалась аминокислотная последовательность rINF-beta1b, указанная в патентах [50,53].

Пептидное картирование кандидатов ФСО INF альфа-2b (метиониновая и безметиониновая формы)

Методику воспроизводили в соответствии с протоколом, изложенным в монографии 07/2015:1110 Европейской Фармакопеи. Результаты получали в условиях воспроизводимости, используя 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 хроматографической колонке YMC C18 (кат. № AA30S051046, США) - метиониновая и безметиониновая формы и Protein&PeptideC18 (кат.№218TP5410, GraceVydac) - безметиониновая форма.

Пептидное картирование кандидата ФСО INF бета-1b

Образцы анализировали по оригинальной методике, разработанной в рамках настоящей работы (Патент РФ на изобретение № 2780675). Ферментативный гидролиз проводили в кислых условиях, пригодных для негликозилированного белка INF бета-1b, с применением водного раствора эндопротеазы Glu-C. 50 мкл испытуемого образца помещали в пробирку, прибавляли 3 мкл раствора Endoproteinase Glu-C (1 мкг/мкл) и 20 мкл ацетатного буферного раствора. Перемешивали и помещали в термостат при температуре 37 градусов. Через 18 ч прибавляли 0,2 мл 6М раствора гуанидина гидрохлорида, перемешивали и прибавляли 0,007 мл 2М раствора дитиотреитола. Перемешивали и помещали пробирку в термостат при температуре 100 градусов на 1 минуту. Хроматографическое разделение продуктов ферментализации проводили используя системы ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США); NexeraX2 (Shimadzu, Япония) и Acquity (Waters, США) и хроматографическую 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. Скорость потока 1 мл/мин.

Пептидное картирование кандидата СОпр рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa

Хроматографическое разделение продуктов простого трипсинолиза, проведенному по протоколу ЕФ 01/2014:2534, проводили с использованием системы ВЭЖХ Nexera X2 с детектором SPD M-30A (Shimadzu, Япония) и хроматографической колонки WatersAcquity UPLC peptide ВЕН C18 (кат. № 02513608316819, США). Хроматографические условия соответствовали вышеуказанному протоколу ЕФ.

Высокоэффективная жидкостная анионообменная хроматография с флуоресцентным детектированием (профиль гликанов)

Оценку гликанового профиля кандидата СОпр рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa методом анионообменной ВЭЖХ проводили с использованием систем ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США) и Nexera X2 (Shimadzu, Япония). Хроматографическая 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. Скорость потока: 0,5 мл/мин. Флуоресцентный детектор - возбуждение 330 нм, эмиссия 420 нм.

Высокоэффективная жидкостная гидрофильная хроматография с флуоресцентным детектированием (профиль гликанов)

Оценку гликанового профиля кандидата СОпр рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa методом гидрофильной ВЭЖХ проводили с использованием системы ВЭЖХ Waters e2695 Alliance (Waters, США) и хроматографической колонки Tosoh Biosciences TSKgel Amide-80

(кат.№89A00013С, 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. Скорость потока: 0,2 мл/мин. Флуоресцентный детектор - возбуждение 330 нм, эмиссия 420 нм.

ГЛАВА 4

К разделу 4.1. «Оптимизация количественной оценки полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах»

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 хроматографической 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.

К разделу «4.2. Оптимизация количественной оценки аминокислот в составе биологических лекарственных препаратов».

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 хроматографической колонки SeQuant ZIC-HILIC(Merck, кат.№ 1.50458.0001, Германия).

В ходе пробоподготовки 0,5 мл стандартных и испытуемых образцов наносили на картриджи AmiconUltra® 10 кДа (MerckMillipore, кат.№ UFC501024, Германия) и центрифугировали в течение 20 минут при скорости

центрифугирования 12000 об/мин при температуре 20°C. К 0,1 мл фильтрата добавляли 0,9 мл растворителя.

К разделу «4.3. Оптимизация количественной оценки алюминия в составе биологических лекарственных препаратов».

Образцы анализировали на атомно-абсорбционном спектрометре Agilent Technologies GTA 120 Graphite Tube Atomizer (Agilent Technologies, США) с электротермической атомизацией, автоматическим пробоотборником, компьютерной системой сбора и обработки данных по оригинальной методике, разработанной в рамках настоящей работы (Патент РФ на изобретение № 2799235).

Методику комплексонометрического титрования воспроизводили в соответствии с ГФ РФ ОФС 1.7.2.0016.15 «Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах» [38]. Спектрофотометр PD 303S (Arel, Япония).

Статистические методы исследования

Среднее арифметическое значение X_{cp} вычисляли по формуле (1) [20,78,165]:

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

Стандартное отклонение (S) результатов вычисляли по формуле (2) [20,78,165]:

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

Относительное стандартное отклонение RSD %, рассчитывали по формуле [20,78,165]:

$$RSD = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}} \quad (3)$$

Однофакторный дисперсионный анализ с расчетом критерия Фишера использовали для определения оценки сопоставимости результатов, полученных разными методами и оценки возможности применения одного стандартного образца при воспроизведении разных методик [78]:

$$F = \frac{S_{\text{межгр}}^2}{S_{\text{вну}}^2} \quad (4)$$

Для этого находили значение внутригрупповой и межгрупповой степеней свободы.

$$v_{\text{вну}} = n \times (m - 1) \quad (5)$$

$$v_{\text{межг}} = n - 1 \quad (6)$$

Диапазон аттестованного значения ФСО ΔX вычисляли как $\pm 2S$ от среднего значения:

$$\Delta X = X_{\text{ср}} \pm 2S \quad (7)$$

Для статистической обработки применяли: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США).

Расчет процентного соотношения заряженных и незаряженных гликанов кандидата СОпр rFVII рассчитывали по формуле [112]:

$$\frac{A}{A+B} \times 100\%, \text{ где} \quad (8)$$

A - сумма площадей пиков, соответствующих заряженным гликанам (пики с 6 по 12);

B - сумма площадей пиков, соответствующих незаряженным гликанам (пики с 1 по 5).

Личный вклад 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. Голощаповой; 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 rFVIIa проведено совместно со с.н.с. М.Б. Дегтеревым и с.н.с, к.х.н. М.А. Смоловым (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 PEG-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 пространсляционных 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-alfa2b (Met, no-Met), rINF-beta1b и стандартного образца предприятия rFVIIa, 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, № государственной регистрации 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биотехнологические лекарственные препараты. Структурные особенности рекомбинантных терапевтических белков и проблемные вопросы подтверждения подлинности структуры

Фармацевтическая отрасль с 90-х годов XXвека переживает технологический прорыв в области создания биофармацевтических препаратов, обусловленный достижениями генной инженерии в разработке активных фармацевтических субстанций[209,286]. На сегодня приоритетными направлениями развития биофармацевтики является создание новых технологических платформ производства биотехнологических лекарственных средств, в числе которых разработка препаратов на основе моноклональных антител, препаратов на основе рекомбинантных белков (в том числе направленно модифицированных), синтетических пептидов, вакцин нового поколения, генотерапевтических препаратов, биомедицинских клеточных продуктов и т.д. [307,420].

При этом такие биотехнологические лекарственные препараты как рекомбинантные факторы роста, цитокины, интерфероны, гормоны, ферменты и т.д. сегодняуже можно отнести к традиционным терапевтическим лекарственным препаратам, имеющим достаточно длительную практику применения [47].

На сегодняшний день особенности методологии оценки качества биотехнологических лекарственных препаратов, полученных с применением технологии рекомбинантной ДНК, нашли отражение в целом ряде международных и отечественных регуляторных требований, учитывающих специфику данной технологии [37,117,124,130,134,136,137,151].

Согласно данным документам, обеспечение качества биотехнологических препаратов базируется на валидированной системе посевного материала. Выполнение регламентированных требований к исходной клеточной линии, экспрессирующей конструкции, штамму-производителю, включая подтверждение его генетической стабильности (определении копийности гена, уровня и постоянства

экспрессии), является основой обеспечения подлинности структуры целевого белка [87].

Вышеизложенные требования, носят общий характер и не могут учитывать особенности той или иной технологии и продукта. Более детальным документом в данном случае является фармакопея. Оценка качества препаратов на основе рекомбинантных белков в Российской Федерации регламентируется Государственной фармакопеей РФ - ОФС.1.7.1.0010.18 «Биологические лекарственные препараты» и ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК», а также документами ЕАЭС где предусмотрено подтверждение подлинности на соответствие специфической активности, структуры и чистоты молекулы белка параметрам, заявленным на стадии доклинических исследований и при регистрации. Данное подтверждение необходимо для каждой вновь получаемой серии субстанции и/или готового продукта [37,66,69,68,74,145].

Подтверждение активности, структуры и чистоты для каждого типа рекомбинантного белка зависит от структуры и свойств его молекулы и требует сугубо индивидуального подхода при разработке/выборе норм, методик и стандартных образцов [99]. Кроме того, директивы ИСН признают, что стратегии по разработке препарата и требования к целевому продукту, отвечая основным положениям, могут меняться от компании к компании и от препарата к препарату в зависимости от особенности технологии и требований к ожидаемому терапевтическому эффекту[75,76]. Таким образом, технологии получения биоподобных терапевтических белков как правило имеют ряд отличий от технологий получения оригинальных белков. И прежде всего это - использование другого штамма-производителя, что прогнозируемо приводит к изменению профиля посттрансляционных модификаций белка, при соблюдении целевой аминокислотной последовательности и специфической активности [68,74,75, 139,145].

В полной мере оценить качество вновь получаемой серии рекомбинантного белка (включая подтверждение подлинности заявленной структуры) возможно, как правило, на уровне фармацевтической субстанции или очищенного продукта до добавления вспомогательных веществ.

Фармацевтическая субстанция должна соответствовать основным отечественными и зарубежными документам, содержащим требования к качеству и оформлению нормативной документации [3,71,87]. Необходимое качество лекарственной субстанции должно определяться с учетом ее применения в составе лекарственного препарата, а также с учетом знания и понимания ее физических, химических, биологических и микробиологических свойств и характеристик [69]. Очищенный белок, используемый для получения препарата, должен быть в полной мере охарактеризован по химическим, физико-химическим, иммунохимическим и биологическим параметрам, поскольку эффективность и безопасность препарата прежде всего обусловлена возможным присутствием в нем примесей или контаминантов, а также структурой рекомбинантного белка [71].

Перечень физико-химических характеристик молекулы рекомбинантного белка, оцениваемых на стадии разработки, доклинических исследований продукта, а также при формировании спецификации на субстанцию для посерийного контроля качества, представлен следующими показателями:

- молекулярная масса;
- N- и C-концевые последовательности, пептидное картирование;
- характеристика вторичной и третичной структур белка;
- количественное содержание и чистота целевого белка - содержание родственных соединений (модифицированных, полимеризованных и деградированных форм основного компонента);

- анализ посттрансляционных модификаций: содержание углеводов, степень и места гликозилирования, содержание отдельных моносахаридов, углеводов, липидов;

- содержание посторонних примесей (белки и ДНК клеток хозяина, другие технологические примеси) [71,128,132].

Одна из тенденций разработки и актуализации фармакопейных требований заключается в максимальной характеристике действующего вещества, а также конечного продукта по критическим показателям, подтверждающим подлинность, активность и безопасность, включая количественный анализ всех вспомогательных веществ [37]. То же касается характеристики полупродуктов на критических этапах производства, что актуально для биотехнологических лекарственных средств, представляющих собой поликомпонентный и/или модифицированный продукт, полноценная характеристика которого на стадии готового препарата невозможна из-за наличия нескольких действующих веществ сходной структуры и/или характера их модификации. Здесь следует отметить, что разработка новых препаратов, их регистрация и введение в гражданский оборот предшествует разработке фармакопейных требований. В связи с этим фармакопейные требования к ряду продуктов последних лет (модификации ранее производимых ЛП или ЛП нового поколения, получаемые на принципиально новой технологической платформе) могут отсутствовать.

Отличительной особенностью фармакопейных требований к качеству биотехнологических лекарственных средств является необходимость подтверждения подлинности структуры действующего вещества, которая складывается из верификации аминокислотной последовательности и подтверждения профиля посттрансляционной (например, гликозилирование) или направленной (например, пегилирование) модификации (для соответствующих белков). Данный контроль предусмотрен для каждой серии субстанции и/или готового препарата [37,117].

Наиболее информативным и независимым (не требующим наличия образца сравнения) методом верификации структуры белковой молекулы является метод масс-спектрометрического анализа [80]. Однако его широкое внедрение в практику рутинного посерийного контроля ограничено высокой стоимостью оборудования и необходимостью наличия высококвалифицированных специалистов для его эксплуатации и обслуживания.

В связи с этим, основными методами посерийного контроля как на предприятии, так и в сторонней лаборатории при регистрации (первичной или внесении изменений в нормативную документацию) и/или вводе в гражданский оборот, остаются метод пептидного картирования (для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности) и метод карбогидратного картирования (для подтверждения подлинности углеводного профиля) [37,70, 107,110,116]. При этом для идентификации результатов необходимо использование стандартных образцов сравнения и в качестве такого стандартного образца, как правило, используют серию соответствующего очищенного белка. Данный подход используется и при оценке чистоты белка, традиционно оцениваемой методами электрофореза в ПААГ, изофокусирования и ВЭЖХ. Таким образом, качество стандартного образца сравнения и полнота его характеристики в значительной мере определяют объективность оценки важнейшего показателя качества биотехнологического терапевтического белка – подлинности структуры.

Актуальность разработки стандартных образцов для подтверждения подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков обусловлена отсутствием международных или отечественных фармакопейных стандартных образцов. Кроме того, даже при наличии международного стандартного образца, часто необходимо наличие индивидуального стандартного образца сравнения, поскольку посттрансляционные модификации белковой молекулы, а также

профиль направленного модифицирования (конъюгирования) исходной молекулы, как правило, уникален для каждой технологии [67,74,139,145].

Немаловажной особенностью настоящего времени является отсутствие стабильного обеспечения Российской биофармацевтической индустрии международными стандартными образцами в условиях санкционной политики, что приводит к необходимости наличия отечественных фармакопейных стандартных образцов и/или стандартных образцов предприятий, являющихся полноценной заменой международным образцам и позволяющим оценивать качество вновь выпускаемых серий биотехнологических белков. В связи с этим, одной из «системных мер поддержки организации производства лекарственных средств на территории Российской Федерации» указанных в распоряжении Правительства РФ от 07.06.2023 N 1495-р «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года» является «стимулирование разработки, производства и стандартизации отечественных образцов сравнения для применения в лабораторном и аналитическом контроле разработки и производства лекарственных препаратов (стандартные образцы), фармацевтических субстанций и примесей к ним» [6].

Принципиальный формат сведений о стандартных образцах, процедуре аттестации, классификации стандартных образцов и требований к их оформлению изложен в виде гармонизированных требований в международных и отечественной фармакопеях, а также документах ЕАЭС, ЕМА и т.д. [16,39,108,118,119,121].

Еще более общие сведения изложены в документах ГСИ ГОСТ, регулирующих процедуру разработки и аттестации стандартных образцов, в том числе стандартных образцов лекарственных средств [14,15,16,30].

Данные международные и отечественные нормативно-регуляторные требования к аттестации стандартных образцов направлены на регулирование лекарственных средств в целом и не отражают специфические особенности

группы биотехнологических лекарственных препаратов, тем более конкретных белков, в то время как специфика вышеуказанных препаратов требует индивидуального подхода, зависящего от природы объекта.

Необходимость представления сведений о стандартных образцах в регистрационном досье на препарат обозначена в ФЗ-61 "Об обращении лекарственных средств", Правилах ЕЭК и Приказе Минздрава России № 409н. Однако данные документы носят общий характер, который сводится к формулировке, что в регистрационном досье должен быть представлен «перечень стандартных образцов или веществ, используемых при осуществлении контроля качества, в том числе с указанием их производителей и назначения» [3,11,60]. При этом детализация требований к процедуре аттестации стандартных образцов и формату сведений, включаемых в регистрационное досье отсутствует.

Таким образом проблемными вопросами оценки подлинности структуры и чистоты рекомбинантных терапевтических белков является:

- полное отсутствие фармакопейных требований или отсутствие гармонизированных фармакопейных требований к конкретному рекомбинантному белку;

- отсутствие требований к формату заполнения регистрационного досье в части сведений о стандартных образцах, используемых при контроле качества подлинности структуры и чистоты рекомбинантного белка;

- отсутствие единого унифицированного порядка (алгоритма) аттестации стандартных образцов для оценки подлинности структуры и чистоты рекомбинантных терапевтических белков и, собственно, фармакопейных стандартных образцов и/или стандартных образцов предприятия, аттестованных соответствующим образом.

1.1.1 Рекомбинантные интерфероны альфа и бета

Вещество белковой природы, позднее названное «интерфероном», было обнаружено более 60 лет назад как средство, ингибирующее репликацию вируса

гриппа[268]. В настоящее время эти белки, обладающие иммуномодулирующей, противовирусной, антиангиогенной, антипролиферативной и противоопухолевой активностью, представляют собой хорошо изученную группу цитокинов. На раннем этапе их изучения, на основе профилей хроматографического разделения данных белков, исходно были идентифицированы три основных вида IFN: alfa, beta, gamma. Позднее были изучены основные клетки-продуценты вышеуказанных интерферонов: лейкоциты, фибробласты и клетки иммунной системы [167,355].

Сегодня известно, что интерфероны, помимо противовирусного эффекта, способны проявлять эффективность в модификации биологического ответа при онкологии и в подавлении проявлений рассеянного склероза [202].

Система интерферонов состоит из клеток продуцирующих IFN в ответ на действие индукторов, в качестве которых могут выступать микробы, опухолевые клетки, чужеродные нуклеиновые кислоты, чужеродные клетки и антигены; IFN-активированных эффекторных клеток (лимфоцитов, макрофагов); объектов-мишеней (собственно, исходных индукторов) на которые могут воздействовать и IFN и активированные ими эффекторные клетки иммунной системы.

Функциональные и структурные особенности большинства IFN подробно изучены, и классификация этих секреторных белков основана на их геномной организации, биологической функции и типе рецептора, связывание с которым обеспечивает передачу сигнала.

Данная классификация насчитывает 4 типа IFN, из которых наиболее хорошо изучены, а также внедрены в терапевтическую практику тип I и тип II.

Для интерферонов I типа характерно различной степени авидности связывание с рецепторным комплексом IFNAR, состоящим из 2-х поверхностных белковых субъединиц (IFNAR1; IFNAR2) [208,305,334].

Далее следует активация связанных с рецептором киназ (JAK1; TYK2), фосфорилирование трансдукторов (STAT1; STAT2) и активаторов транскрипции

IFN-I-индуцируемых генов с образованием комплекса фактора транскрипции, взаимодействующего с элементами ISRE (IFN-stimulated response element) (Рисунок 1) [212].

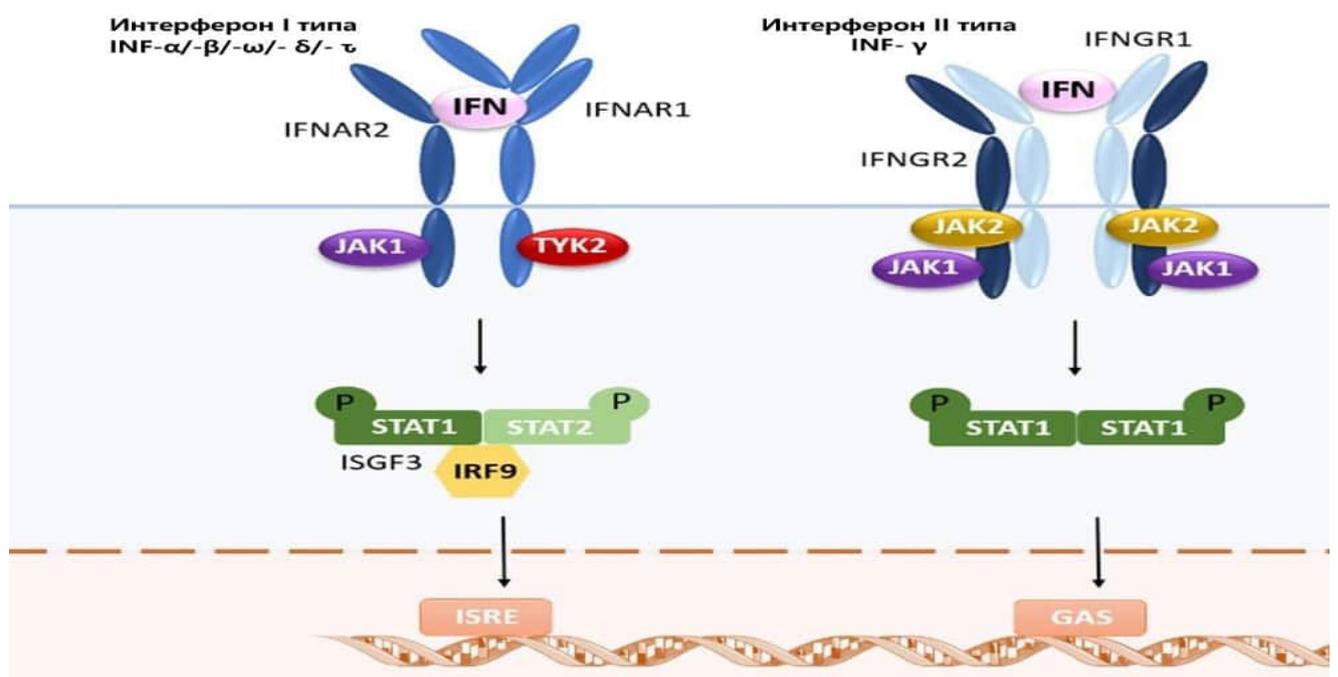


Рисунок 1 - Активация рецептора или лиганд-рецепторный комплекс, собранный по INF-тип I и INF-тип II. Адаптировано из источника [212]

К данному типу интерферонов относятся hINF-α, hINF-β, hINF-ε, hINF-κ, hINF-ω. Основные клетки-продуценты данных белков - эпителиальные клетки, фибробласты и лейкоциты (дендритные клетки, макрофаги). Длительную практику применения в медицине имеют rINE-alfa (противовирусный и противоопухолевый сегмент ЛС) и rINF-beta (препарат первой линии терапии рассеянного склероза).

Интерферон второго типа - hINF-γ - взаимодействует с рецепторным комплексом IFNGR, также состоящим из 2-х поверхностных белковых субъединиц (IFNGR1; IFNGR2) [187,212]. Далее также следует активация соответствующих киназ (JAK1; JAK2), фосфорилирование активаторов транскрипции STAT1, образование комплекса фактора транскрипции и взаимодействие с элементами GAS (Рисунок 1).

Клетки продуценты - сенсibiliзирoванные Т-лимфоциты и НК-лимфоциты [166]. Препараты на основе rINF-gamma не так широко распространены по сравнению с препаратами на основе rINF-alfa и rINF-beta. Показанием к их применению являются достаточно редкие заболевания - хронический грануломатоз и остеопетроз [212].

Известны 3 подкласса терапевтически значимых рекомбинантных rINF-alfa: rINF-alfa2a, rINF-alfa2b и rINF-alfa2c. Исходно терапевтическая активность INF-alfa была показана при лечении вирусных гепатитов [196]. При этом для измерения активности интерферонов были приняты международные единицы (МЕ), где одна единица соответствует количеству интерферона, которое ингибирует репродукцию вируса на 50 % [81].

В настоящее время показаниями к применению препаратов на основе rINF-alfa являются волосатоклеточный лейкоз, саркома Капоши (в том числе СПИД-ассоциированная), хроническая миелогенная лейкемия, кожная Т-клеточная лимфома, хронический гепатит В и С, фолликулярная лимфома, злокачественная меланома, множественная миелома, карциноидная опухоль, фолликулярная лимфома, острокoнечные кондиломы [189, 207, 212, 252, 302, 333, 375, 381, 391].

Известен один зарегистрированный в США препарат (1989 г.) на основе рекомбинантного rINF-alfa2c (показания к применению: хронические вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция) [212, 386, 362].

В Российской Федерации препараты rINF-alfa в виде различных лекарственных форм парентерального применения (лиофилизаты для приготовления растворов для инъекций, мази, капли, спреи) нашли широкое применение для профилактики и лечения различных заболеваний вирусной этиологии.

Подклассы rINF-beta1 (beta1a и beta1b) зарекомендовали себя как эффективное средство для лечения рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного склероза, социально значимого хронического заболевания. Препараты на основе rINF-beta

относятся к препаратам пожизненной терапии, замедляющим отрицательную динамику патологического процесса и улучшающим качество жизни больного [83,169,170].

Как и для всех интерферонов I типа, для rINF-beta также характерна противовирусная (везикулярный стоматит, гепатит C), противовоспалительная (панкреатит, стероидоустойчивый колит, гломерулонефрита) и противоопухолевая активность [182,351,388,407,410].

Поиск эффективных средств против коронавирусной инфекции COVID-19, помимо разработки новых средств, затронул и известные противовирусные средства, в том числе препараты интерферонов. Была изучена активность препаратов rINF-alfa2b против вируса SARS-CoV-2. Показано эффективное подавление репродукции данного вируса в культуре клеток VeroC1008 [94]. Показано снижение летальности при тяжелой форме заболевания на фоне применения препаратов rINF-beta [223,357,373].

Исследования гомологичности вирусных белков ORF6 и ORF3B (основных антагонистов интерферона) вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2, выявило структурные различия, которые, предположительно лежат в основе различий чувствительности нового вируса к интерферону I типа [315]. Однако, на основании экспериментальных исследований и данных клинических исследований было высказано предположение, что SARS-CoV-2 "индуцирует чрезмерный IFN-I-опосредованный противовирусный ответ", в связи с чем применение препаратов интерферонов целесообразно на ранних стадиях заболевания [94,216,276,398,432,443].

При производстве rINF-alfa в качестве продуцента традиционно используют *Escherichia coli*, поскольку молекула данного белка имеет достаточно простую одноцепочечную негликозилированную структуру молекулярной массой около 19 кДа [49,51]. Согласно нуклеотидной последовательности первым аминокислотным остатком должен быть цистеин, однако, молекула rINF-alfa может начинаться с

инициатора синтеза - метионина, отщепление которого метиониновой аминопептидазой *Escherichia coli* в основном зависит от компартмента клетки бактерии, задействованного в экспрессии белка (цитоплазматическая экспрессия или экспрессия в периплазматическом пространстве) [371,402,422]. Таким образом, количество аминокислотных остатков 165 или 166 зависит наличия N-концевого метионина. В позиции 23 расположен лизин (подтип rINF-alfa2a) или аргинин (подтип rINF-alfa2b). В молекуле rINF-alfa все цистеины задействованы в дисульфидных связях: значимые для биологической активности дисульфидные связи Cys 1 (2) -98(99) и Cys 29 (30) -138 (139) [114,424,426].

Известно, что одним из продуктов экспрессии rINF-alfa в *Escherichia coli* (помимо Met и no-Met форм) может быть rINF-alfa (no-Met), ацетилированный по N-концевому цистеину (N(α)-ацетил-IFN-alfa2).

Для вышеуказанных форм была исследована биологическая активность, включая антипролиферативное действие интерферона. В результате было установлено, что rINF-alfa2(Met) обладает той же активностью, что и rINF-alfa2(no-Met), в то время как белок N(α)-ацетил-IFN-alfa2 обладает не более чем 10% активности. N-концевое ацетилирование приводит к потере положительного заряда на N-конце белка, в связи с этим авторы связывают значительную потерю активности с изменением заряда [180].

Для производства rINF-beta1a используют трансформированные клетки СНО (*Chinese hamster ovary*), способные к экспрессии гликозилированного белка (N-гликозилирование, Asn80) [115]. Разработка и внедрение в медицинскую практику rINF-beta1b - негликозилированного белка, содержащего аминокислотный остаток Ser1 и Ser17 вместо Met1 и Cys17 соответственно, предполагают получение терапевтически активного белка по упрощенной технологии с применением модифицированных клеток *Escherichia coli* [50,53].

Каждая из технологий получения rINF-beta1a и rINF-beta1b имеет свои достоинства и недостатки. Экспрессия в *Escherichia coli* достаточно проста и

эффективна, но предполагает разрушение бактериальной клетки для извлечения агрегированного в тельцах включения белка, его очистки от «клеточного мусора» с использованием детергентов и повторного сворачивания молекулы в активную форму.

Система экспрессии эукариотических клеток CHO, напротив, обеспечивает секрецию белка в нативном гликозилированном устойчивом состоянии. При этом стабильность, растворимость и активность молекулы rINF-beta1 в первую очередь зависит от гликановой части [380]. Авторы отмечают более высокую (около 1:10) активность rINF-beta1a, повышенную чувствительность rINF-beta1b к термической денатурации и склонность к агрегации молекул. По предположению авторов гликановая область данного белка более обычного задействована в формировании третичной структуры путем формирования водородных связей, что способствует фолдингу, экранирующему незаряженные участки от воздействия растворителя [282].

При этом оба подкласса востребованы в клинической практике, но имеют свои особенности применения. По мнению ряда исследователей выбор терапии для лиц, страдающих рассеянным склерозом, должен учитывать индивидуальную переносимость и восприимчивость к лекарственному препарату на основе rINF-beta1a или rINF-beta1b. При этом замена препарата одного подтипа INF-beta на другой возможна, но требует клинического обоснования и обеспечения мониторинга состояния пациента [93,101,181,255,264].

В результате изучения трехмерной структуры молекулы rINF-alfa2 методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения было установлено, что доминирующей особенностью структуры является кластер из пяти α -спиралей: спираль А (Ser11-Met21); спираль В и В₁ (Thr52-Ser68) и (Iys70-Ala75); спираль С (Glu78-Ile100); спираль D (Leu110-Glu132); спираль E (Pro137-Leu157). Кроме того, в молекуле обнаружены сегменты, обеспечивающие значительную степень

гибкости в петлях, соединяющих спирали. По мнению авторов, за взаимодействие с рецептором отвечают три консервативных участка:

- на петле АВ (Cys29-Phe36) - домен АВ;
- на спирали С (Glu78-Asp95) - домен С;
- на спирали D, включая петлю DE (Tyr122-Ala134) [295].

Рентгеноструктурный анализ кристаллизованного rINF-beta показал, что данный белок также состоит из пяти α -спиралей: спираль А (Ser2-Trp22); спираль В (Gln51-Arg71); спираль С (Asn80 -Glu107); спираль D (Ser118 - Lis136; спираль Е (Ser139 - Gly162). Значимыми для активности являются остатки Arg27, Arg35 и Lys123 и остатки Phe70, Phe154, Trp79 и Trp143, стабилизирующие ядро молекулы. [282,283]. Также авторы считают, что дисульфидная связь между Cys31 петли АВ и Cys141 петли DE координирует и стабилизирует данные петли, играющие важную роль во взаимодействии с рецепторами.

Изучение молекул rINF-alfa2 и rINF-beta методом рентгеновской кристаллографии выявило, что данные белки существуют в виде нековалентного димера, где взаимодействия на границе раздела димеров опосредованы ионом цинка. Для димеризации интерферона, связывания его с рецептором и корректного функционирования в целом важна АВ-петля, имеющая уникальный фолд в виде 3/10-спирали. Соответственно, любые нарушения в аминокислотной последовательности (и, возможно, в области АВ-петли), формирующей 3/10-спираль, могут приводить к нефункциональному интерферону [283,372].

Таким образом, имеющие достаточно высокую клиническую востребованность интерфероны альфа (rINF альфа-2b (Met и no-Met)) и бета (rINFbeta-1a и rINFbeta-1b) внутри каждого подкласса имеют структурные особенности, влияющие на специфическую активность молекулы и требующие, согласно регуляторным документам, подтверждения подлинности (верификации) структуры при оценке качества каждой вновь нарабатываемой серии белка.

1.1.2 Рекомбинантные факторы свертывания крови

Гемофилии А и В являются известными наследственными заболеваниями, вызванными рецессивными мутациями в X хромосоме, приводящими к недостаточности белковых факторов свертывания крови (факторов VIII и фактора IX). Фактор VIII и фактор IX играют ключевую роль в функционировании системы свертывания крови. Гемофилии оказались в числе первых наследственных заболеваний, средства коррекции и лечения которых были разработаны и постоянно совершенствуются. Причиной гемофилии являются мутации гена, кодирующего FVIII (Xq28), или гена, кодирующего FIX (Xq27). В 30-35% случаев выявляются спорадические мутации без наличия семейного анамнеза заболевания. Распространенность гемофилии составляет 1:10 000 и оценки ее распространенности, основанные на данных национального реестра пациентов и глобальных обследованиях Всемирной Федерации Гемофилии показывают, что ожидаемое число мужчин с гемофилией во всем мире составляет 1 125 000, большинство из которых не диагностированы. По данным Всероссийского общества гемофилии количество граждан Российской Федерации, страдающих данным орфанным заболеванием, составляет более 7 тысяч человек [105,175,267].

Перспективной стратегией, активно разрабатываемой сегодня, является использование синтетических антител, выполняющих функции миметиков факторов свертываемости или генотерапия заболевания, осуществляемая с помощью аденоассоциированных вирусных векторов [321].

Действующие в настоящее время подходы к лечению гемофилии развивались от использования белковых факторов свертываемости, выделенных из плазмы крови доноров, к широкому применению рекомбинантных факторов, в том числе модифицированных, получаемых биотехнологическим путем. Необходимость широкого внедрения рекомбинантных факторов свертывания стала очевидной после доказательства передачи вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ) и

гепатита С (ВГС) через контаминированных концентратов факторов свертывания крови, что привело к смерти тысяч пациентов в 1980-х и 1990-х годах [221].

Кроме того, пациенты с тяжелой формой гемофилии нуждаются в многократных повторных инфузиях факторов свертывания. Распространенным осложнением, сдерживающим проведение терапии, требующей специфического медикаментозного сопровождения и повышения терапевтических доз для достижения клинического эффекта, является выработка нейтрализующих антител.

Такого рода ингибирующие агенты вырабатываются более чем у 30% пациентов и приводят к значительному снижению терапевтической эффективности факторов, выделенных из плазмы.

Рекомбинантные факторы VII, VIII и IX, экспрессируемые в клетках млекопитающих, могут использоваться в качестве альтернативы продуктам, полученным из плазмы, фракционированным из человеческой крови. Несмотря на эффективность, экспрессия факторов в гетерологичных экспрессионных системах клеток млекопитающих в промышленных масштабах затруднена из-за сложной структуры факторов и характера посттрансляционных модификаций - специфически значимого N-гликозилирования. Тем не менее, рекомбинантные факторы обладают рядом преимуществ, в частности, исключают риск передачи вирусных инфекций, способных контаминировать препараты факторов, выделенных из плазмы крови. Выверенная дозировка этих факторов, с обеспечением долговременного клиренса в крови на уровне не менее 3-5 % от нормы, необходима поскольку важно поддержание гемостаза и одновременное предотвращение возможных тромбозов при введении избыточного количества продукта.

В начале 1980-х годов было продемонстрировано, что человеческий фактор VII может быть экспрессирован клетками почек хомяка (ВНК). С учетом этих возможностей, NovoNordisk была представлена идея использования рекомбинантной технологии для получения активированного фактора VII

(фактор VIIa) для лечения пациентов с гемофилией с высоким уровнем ингибиторов. К этому времени уже было получено принципиальное доказательство гемостатического эффекта рекомбинантного фактора VIIa. Установлена его способность инициировать гемостаз в месте повреждения за счет формирования комплексов с тромбопластином поврежденной ткани, независимо от присутствия факторов свертывания крови VIII и IX, активируя факторы IX и X [397].

Фактор VII является предшественником сериновой протеазы, которая присутствует в плазме млекопитающих. В своей активированной форме он участвует в свертывании крови, активируя фактор X и/или фактор IX в присутствии тканевого фактора и кальция. Клоны, кодирующие фактор VII, были получены из двух библиотек кДНК, полученных из поли(A) РНК из клеток печени человека и гепатоцитов G2. Циркулирующий в плазме фактор VII представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из 406 аминокислот. Анализ аминокислотной последовательности белка и аминокислотной последовательности, полученной из кДНК, показывает, что фактор VII преобразуется в активированный фактор VIIa путем расщепления единственной внутренней связи между аргинином и изолейцином. Это приводит к образованию легкой цепи (152 аминокислоты) и тяжелой цепи (254 аминокислоты), которые удерживаются вместе дисульфидной связью. Легкая цепь содержит домен гамма-карбоксиглутаминовой кислоты (Gla) и два потенциальных домена эпидермального фактора роста, в то время как тяжелая цепь содержит часть молекулы сериновой протеазы. Фактор VII демонстрирует высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей с другими белками плазмы, зависящими от витамина К [397].

Особенность механизма действия фактора VIIa заключается в низкой аффинности связывания с тромбоцитами, что используется для инициирования гемостаза у пациентов с гемофилией. В моделях было показано, что добавление

возрастающего количества рекомбинантного фактора VIIa приводит к дозозависимому увеличению выброса тромбина, что частично нормализует нарушенную генерацию тромбина, наблюдаемую в крови больных гемофилией с недостатком фактора VIII или фактора IX. Повышенная генерация тромбина, обеспечиваемая добавлением рекомбинантного фактора VIIa, приводит к образованию хорошо структурированного фибринового сгустка, устойчивого к преждевременному лизису. Таким образом, рекомбинантный фактор VIIa, образуя активный тканевой комплекс, обуславливает эффективный локальный гемостаз, а не системную активацию коагуляции, что существенно снижает риск обширного тромбообразования[260]. При этом индукция специфических антител и других иммунологических реакций минимальна, что актуально для больных с приобретенной ингибиторной гемофилией к FVIII и FIX.

Таким образом, был получен активированный рекомбинантный фактор свертывания крови VIIa, состоящий из легкой и тяжелой цепей с общей молекулярной массой около 50 кДа и получивший международное непатентованное наименование - Эптаког альфа [397]. Использование эукариотических клеток-продуцентов и механизм активации фактора обеспечивают посттрансляционные модификации белка, необходимые для его коагулирующей активности: N-гликозилирование и карбоксилирование остатков глутамата в N-концевом участке белка с образованием γ -карбоксиглутамата, аминокислоты Gla (Gla-домен). Для молекулы фактора VIIa характерно присоединение гликанов по типу N- (Asn145 и Asn322) и O-гликозилирования (Ser 52 и Ser 60).

Сайты O-гликозилирования содержат от 1 до 4 моносахаридных остатков, сайты N-гликозилирования имеют более сложную природу и представляют собой биантенные фукозилированные структуры с остатками N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты и фосфатных остатков. [52,112].

Помимо Эптакога альфа, технология рекомбинантной ДНК используется для производства антигемофильных препаратов, механизм действия которых основан на восполнении недостающего или отсутствующего фактора для обеспечения активации системной коагуляции.

Разработка рекомбинантного фактора VIII (rFVIII) изначально была обусловлена необходимостью лечения пациентов с гемофилией А концентратами факторами VIII без риска передачи инфекционных агентов.

Фактор свертывания крови VIII человека (фактор VIII) представляет собой гликозилированный белок плазмы крови, состоящий из шести доменов (A1, A2, B, A3, C1 и C2) вместе с 19-аминокислотным сигнальным пептидом. В кровотоке фактор VIII образует комплекс с фактором фон Виллебранда с периодом полураспада 12–18 часов. После активации тромбином для удаления большого домена В в случае повреждения кровеносных сосудов фактор VIII трансформируется в фактор VIIIa с последующим образованием комплекса с фактором IXa, которые необходим для активации фактора Xa и образования сгустка крови [240].

Разработка и внедрение концентратов рекомбинантного фактора VIII почти 20 лет назад стало крупным достижением в лечении пациентов с гемофилией А. Безопасность rFVIII была дополнительно улучшена за счет полного удаления животных или человеческих белков из производственного процесса, чтобы пациенты не подвергались воздействию известных или новых патогенов.

Исходно rFVIII был структурно идентичен фактору VIII, выделенному из плазмы крови. Усилия последних лет были сосредоточены на улучшении экспрессии фактора VIII, снижении его иммуногенности и улучшении его фармакокинетики. Достижение этих целей стало возможно благодаря совершенствованию биотехнологических производственных процессов и модификации функции и структуры фактора VIII. Было использовано несколько подходов: таких как полное или частичное удаление В-домена, а также варианты

частичного или полного замещения В-домена линкерными остатками; экспрессия фактора VIII человеческими клеточными линиями; модификация последовательности помимо области В-домена; структурная модификация в виде коэкспрессии с другими белками, слияния с Fc-фрагментом иммуноглобулинов, РЕГимирование. Кроме того, рекомбинантные факторы VIII второго поколения содержат в качестве стабилизатора сахарозу, в отличие от факторов VIII первого поколения, стабилизированных человеческим альбумином. В настоящее время изучаются другие технологии для улучшения фармакокинетики фактора VIII и обеспечения возможности его подкожного введения. Хотя незаместительная терапия и генная терапия кажутся многообещающими альтернативами для лечения гемофилии, фактор VIII, скорее всего, останется критически важным компонентом для лечения из-за его физиологической активности и способа действия, а также его уникальной способности вызывать или восстанавливать толерантность к экзогенному фактору VIII [374].

В результате этих усилий в настоящее время для медицинского применения доступны препараты рекомбинантного фактора VIII первого, второго и третьего поколений, представленные структурно разнообразными белками, например, такие как Октоког альфа, Мороктоког альфа, Бероктоког альфа, Симоктоког альфа, Туроктоког альфа, Дамоктоког альфа пегол, Лоноктоког альфа.

Современные биотехнологические подходы позволяют сформировать эффективную и разнообразную панель инструментов для лечения гемофилии. К таким препаратом следует отнести и фактор свертываемости IX (Ф IX).

Фактор IX является сериновой протеазой, синтезирующейся в печени в форме, которые активизируется в процессе посттрансляционной модификации. Зрелая форма фактора имеет молекулярную массу 57 кДа и способна гидролизовать связь аргинин-изолейцин в молекуле фактора X, что приводит к активации фактора X. Функциональная активность фактора IX зависит от связывания с кофактором–активированным фактором VIII. Фактор IX - это

гликопротеин, зависящий от витамина К. Он участвует во внутреннем процессе свертывания крови, являясь частью каскада свертывания. В системе свертывания крови фактор IX протеолитически активируется активированным фактором XI в присутствии Ca или активированным фактором VII, что в конечном итоге приводит к образованию сгустка. Фактор IX относится к семейству витамин К зависимых протеаз. Наличие Gla-домена на N конце активной молекулы, является характерологической особенностью витамин К зависимых белков. Естественный фактор IX подвержен N- и O-гликозилированию.

Большинство биофармацевтических препаратов, активность которых зависит от наличия гликанов, производятся из клеток CHO благодаря хорошо разработанным методам получения высоких титров продукта и установленным показателям безопасности. Фактор IX не является исключением – при его производстве используются обычно клетки CHO, при этом продукция фактора определяется скоростью N-гликозилирования [100]. Первая линия клеток, экспрессирующая рекомбинантный IX, была получена в 1986 году. Различные варианты посттрансляционной модификации, используемые для производства рекомбинантного фактора IX, потенциально могут влиять на иммунный ответ, особенно на содержащиеся в них N-гликаны [195].

Модификации фактора IX представлены МНН Нонаког альфа, Нонакоггамма, Тренонаког альфа. К модифицированным факторам XI относятся связанные с альбумином Альбутрепенонаког альфа, при этом данные о его эффективности сильно разнятся, а также пегелированный Нонаког бета пегол, клиническая эффективность которого оценивается высоко, однако существуют осложнения, связанные с изменением фармакокинетики и эффектах на измененную молекулу фактора. Модификация факторов направлена на увеличение времени полувыведения факторов XI из кровотока, что важно для эффективного и комфортного для пациентов поддержания гомеостаза. Оригинальный подход был использован при разработке фактора Эфтренонаког альфа, где эффекторная

белковая молекула была связана с доменом Fc иммуноглобулина IgG1 человека. Стабильность фактора оказалась эффективной на протяжении более пятилетнего срока применения. К настоящему времени нет значимых данных, подвергающих сомнению безопасность всех типов модификации фактора IX, при этом срок полувыведения фактора в ряде случаев достигает 7-14 дней. При этом, эффективность образования ингибирующих антител заметно ниже, чем в случае других факторов свертывания [318].

Следует отметить, что процесс пегелирования (гликоPEG-модификации), не затрагивает сами структуры активированного фактора IX. Проведенный экспериментальный анализ показал, что первичная структура, а также посттрансляционные модификации (дисульфидные связи, γ -карбоксилирование, β -гидроксилирование, сульфатирование и O- и N-связанные гликановые структуры) гликоPEGилированной формы подобны структуре рекомбинантного фактора IX. Исследование методом кругового дихроизма в дальнем и ближнем УФ, показал схожие вторичные и третичные структуры этих факторов [340].

Значительные возможности для посттрансляционной модификации рекомбинантных факторов свертывания требуют особого внимания к стандартизации процессов биопроизводства. Любые изменения состава среды или даже фазы культивирования клеток – продуцентов могут приводить, например, к изменению процесса гликозилирования и в конечном счете к фармакологической активности фактора [433].

Данные изменения могут быть причиной появления недостоверных результатов, что в свою очередь может быть вызвано использованием различных наборов, реактивов и стандартных образцов разными производителями при проведении однотипных анализов. Желательно, чтобы факторы анализировались в соответствии с международными стандартами ВОЗ, однако, использование единого стандарта не обеспечивает сравнительную точность измерения активности и структуры при анализе факторов с модифицированной структурой,

функцией и фармакокинетикой. Таким образом, ставится задача разработки стандартных протоколов, стандартных образцов и методов определения подлинности для каждого из факторов свертывания, с учетом характера их модификации с обеспечением их соответствия международным стандартам. Таким образом, гармонизация требований к стандартным образцам и методам контроля качества, в том числе подлинности структуры факторов, остается актуальной задачей [143,346,347].

1.1.3 Рекомбинатные PEG-модифицированные терапевтические белки

В отличие от низкомолекулярных лекарственных средств, где биодоступность в первую очередь зависит от физико-химических свойств (например, растворимости), высокомолекулярные соединения, такие как белки, пептиды, моноклональные антитела и нуклеиновые кислоты, массово вошедшие в практику здравоохранения несколько десятилетий назад и обеспечившие новые терапевтические функции, вызвали новые проблемы в обеспечении биодоступности [417]. Свойственная белкам и пептидам сложная структура обеспечивает высокую специфичность и меньшую, по сравнению с малыми молекулами, токсичность [308]. В то же время, сложность структуры и зависимость биологической активности белка от его пространственной конфигурации, вызывают проблемы со стабильностью лекарственного средства, которая зависит от собственной стабильности белковой молекулы в условиях хранения, от восприимчивости молекулы к условиям *in vivo* (чувствительность к протеазам, pH, температуре), а также от способности молекулы индуцировать иммунный ответ [392].

Один из способов увеличить стабильность белковой молекулы – модификация структуры на уровне синтеза целевого белка и/или путем присоединения максимально инертных молекул или их фрагментов. Наиболее востребованным для такой модификации веществом является полиэтиленгликоль (PEG) – синтетический, полидисперсный полимер, нашедший широкое применение в

пищевой, фармацевтической, косметической, сельскохозяйственной промышленности и других отраслях. PEG не токсичен, обладает амфипатическим поведением (растворим в воде, хлороформе, метилхлориде и бензоле), слабо иммуногенен и при этом совместим с тканями человека [229,258].

PEG обычно синтезируют путем анионной полимеризации этиленгликоля и этилен оксида с раскрытием кольца этилен оксида [361]. В результате получают полимер с заданной молекулярной массой, содержащий две концевые гидроксильные группы, которые позволяют формировать линейную и разветвленную молекулу PEG, а также предоставляют возможность для получения гетерофункциональных производных PEG [361,436]. Синтез PEG с различными функциональными группами (альдегидные, тиольные концевые группы, малеимиды, метакрилаты, акрилаты, т.д.) раскрыл широкие возможности использования PEG в биофармацевтике.

Первые исследования по изучению терапевтических PEG-модифицированных белков начались в начале 1970-х годов [48,427]. В настоящее время в мире, в том числе в Российской Федерации, в практику здравоохранения внедрены PEG-модифицированные терапевтически активные белки, большинство которых получены с применением технологии рекомбинантной ДНК: интерфероны, интерлейкины, факторы свертывания крови, эритропоэтины, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, ферменты и т.д. [47].

Следует отметить, что PEG-модификация белковой молекулы, с точки зрения терапевтического применения, имеет как положительные, так и отрицательные стороны.

С одной стороны, ковалентное связывание молекулы полиэтиленгликоля с молекулой белка приводит к повышению физико-химической стабильности белка; снижает интенсивность протеолиза; приводит к снижению иммуногенности; повышает целевую селективность лекарственного средства [173,174]. Считается, что это связано со способностью PEG экранировать иммуногенные эпитопы,

снижать опсонизацию молекулы и избегать быстрого фагоцитоза, увеличивать гидродинамический диаметр лекарственного средства, ограничивать взаимодействие с ферментами [257,275,348]. Подобная физико-химическая трансформация способствует более длительному циркулированию белка, повышает его растворимость и изменяет фармакокинетику. Увеличение периода метаболического полувыведения повышает терапевтическую эффективность, снижает частоту введения препарата и может приводить к минимизации нежелательных побочных явлений [48,226,266].

С другой стороны - на кинетические свойства пегилированного белка существенно влияет на полидисперсность молекулярной массы исходного PEG (в среднем от 300 до 12000 Да), а также линейная или разветвленная стереохимия его молекулы [427]. Например, известно различие в почечном клиренсе пегилированного интерферона от 10% до 90% в зависимости от молекулярной массы PEG.

Разветвленная структура PEG способствует увеличению времени циркуляции и может быть причиной нежелательного явления - кумуляции лекарственного вещества в тканях и токсических реакциях [299,316]. В связи с этим для получения PEG-модифицированных терапевтических белков последнего поколения преимущественно используют линейный метоксиполиэтиленгликоль (mPEG).

Также, в последних научных публикациях, посвящённых теме PEG-модификации, появились доказательства иммуногенности PEG и PEG-модифицированной молекулы [163]. Иммуногенность PEG была выявлена на уровне доклинических и клинических исследований. Это свойство может приводить к нежелательным иммунным реакциям на PEG-модифицированные белки и пептиды, увеличивая клиренс и риск побочных эффектов, что в целом снижает терапевтическую эффективность и переносимость пегилированных продуктов [174,336,363,417].

Многочисленные исследования PEG-специфического иммунитета свидетельствуют о необходимости предварительного скрининга пациентов на наличие антител к PEG, а также постоянного мониторинга на протяжении курса приема PEG-модифицированного препарата. В связи с этим идет поиск новых инертных полимеров, например, синтетических полимеров или полипептидов с высокой плотностью зарядов, а также рассматривается способ nanoинкапсуляции белка в коллоидных системах (липосомы и другие липидные или полимерные наноносители). Такие стратегии обладают потенциалом для разработки белков следующего поколения[193,417,439].

Тем не менее, конъюгация с PEG остается востребованным и постоянно развивающимся направлением модификации терапевтических белков.

Сегодня известны различные стратегии получения конъюгата (Рисунок 2).

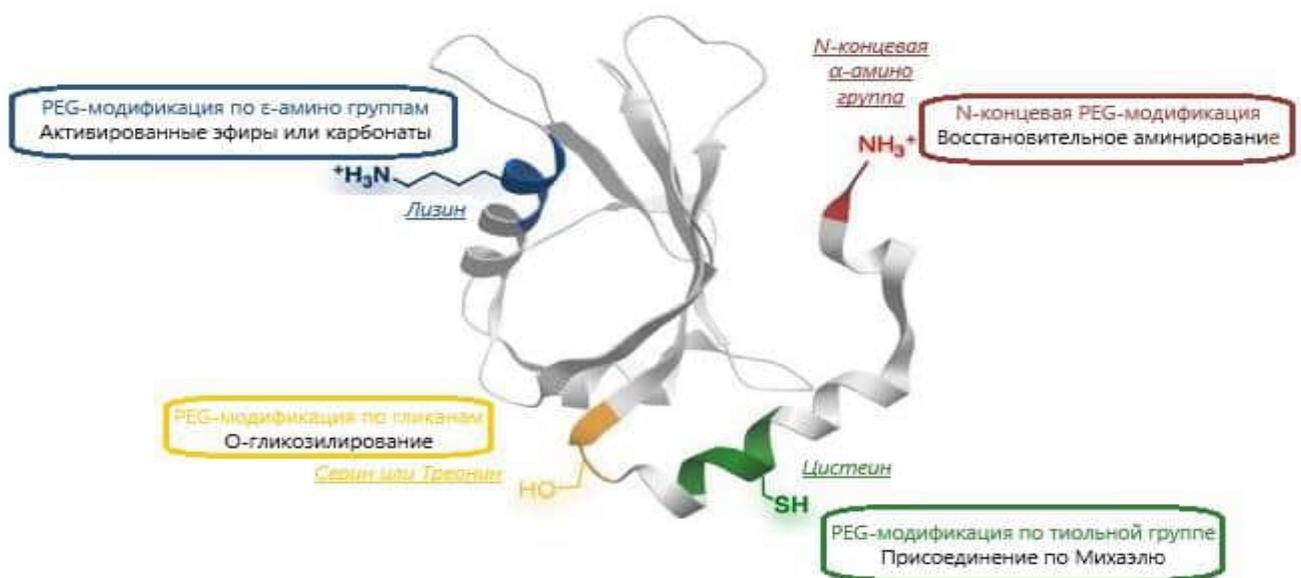


Рисунок 2 - Основные стратегии PEG-модификации белков. Адаптировано из источника [335]

Использование для PEG-модификации активного PEG (PEG-реагента), полученного путем взаимодействия с активированными эфирами, N-гидроксисукцинимидными эфирами и карбонатами позволяет получать конъюгаты по ε-аминогруппе Lis молекулы белка. Эта модель конъюгации не

отличается высокой селективностью, поскольку возможно неконкурентное взаимодействие PEG-реагента с δ -NH₂ His, Tyr и N-концевыми α -NH₂ [412].

Примером неселективного (рандомного) конъюгирования с применением разветвленного 40 кДа PEG может служить препарат Pegasys[®] - (Peginterferon- α 2a), предназначенный для лечения вирусного гепатита С [239]. PEG-модификация по α -NH₂N-Cys или ϵ -NH₂Lys 31, 121, 131, 134 приводит к образованию четырех основных позиционных изомеров и, как минимум, одного нецелевого изомера [157,188].

К такому же типу PEG-модификации с применением разветвленного 20 кДа PEG относится препарат Adynovate[®] (Ruriococogalfaregol), предназначенный для лечения гемофилии типа А и полученный путем модификации rFVIII[232].

Примером неселективного (рандомного) конъюгирования с применением 12 кДа mPEG может служить препарат PegIntron[®] - (Peginterferon- α 2b), также предназначенный для лечения вирусного гепатита С [421]. Изучение данного биоконъюгата методом ионообменной ВЭЖХ позволило выявить 13 позиционных изомеров δ -NH₂ His 34, ϵ -NH₂Lys 31, 121, 131, 134 и α -NH₂N-Cys, а также OH-группы Ser и Tyr [248,335,421]. Кроме того, свободные NH₂-группы PEG-модифицированного rINF- α 2a связаны с молекулой PEG стабильной уретановой связью, а основной изомер (около 47 %) соединен с имидазольным кольцом His34 карбаматной связью. Данная связь проявляется нестабильность в водных растворах, в связи с этим готовая лекарственная форма препарата PegIntron[®] является лиофилизатом[430].

К такому же типу PEG-модификации относятся, например, препарат Oncaspar[®] (Pegaspargase), полученный путем модификации L-аспарагиназы 5 кДа mPEG [249] и Mircera[®] (CERA), полученный путем модификации эпоэтина- β 30 кДа mPEG [319].

PEG-модифицированные данным способом белки требуют существенной очистки, поскольку спонтанное конъюгирование случайных остатков Lis

приводит к получению нестандартизованной смеси позиционных изомеров с возможным наличием молекул, конъюгированных по нецелевым аминокислотным остаткам. Такие белки могут обладать нежелательными свойствами, например, недостаточной активностью из-за наличия пространственных препятствий - перекрытий молекулой PEG участков молекулы, отвечающих за связь с рецептором, трансформацию данных участков, изменения микроокружения молекулы белка и возможного изменения фолдинга молекулы.

Ряд авторов наблюдал изменения структуры и функциональных свойств молекулы белка (на примере бычьей глутаматдегидрогеназы) в зависимости от степени PEG-модификации и молекулярной массы mPEG [434,435]. Другими авторами также было отмечено, что PEG-модификация может снижать активность белка за счет стерической помехи и возможной конъюгации с аминокислотами, формирующими домены, отвечающие за взаимодействие с рецепторами [335].

Для биоконъюгатов, полученных путем неселективной PEG-модификации важным показателем однородности (стандартности) целевого продукта является среднее число PEG-цепей, привитых к белку (степень PEGилирования). Для ее оценки возможно использование хроматографических или электрофоретических методов, однако наиболее информативным является аналитический подход количественного определения степени PEG-модификации с помощью спектроскопии ЯМР ^1H [434,435]. Кроме того, дополнительным недостатком случайного пегилирования является получение гетеропегилированной смеси: мультипегилированного, монопегилированного и непегилированного белка. В связи с этим в последние годы был проявлен большой интерес к технологиям сайт-специфической PEG-модификации.

Селективная сайт-специфичная PEG-модификация, основанная на различиях pKa между $\epsilon\text{-NH}_2$ Lys (около 10) и N-концевой $\alpha\text{-NH}_2$ белков (около 7) получила название «N-PEGilation» [231]. В данном случае в качестве PEG-реагента используется PEG-альдегид, который в кислых условиях (pH 4,0-5,0)

взаимодействует с N-концевой α -NH₂ группой с образованием основания Шиффа. Затем, путем восстановительного аминирования (например, в присутствии цианоборгидрида натрия) основание Шиффа восстанавливают до стабильного вторичного амина [356,414].

Примерами селективного конъюгирования с применением 20 кДа mPEG по принципу «N-PEGylation» могут служить, например, препарат Plegridy[®] (Peginterferon-beta1a), полученный путем модификации rIFN-beta1a и препарат Neulasta[®] (Pegfilgrastim), полученный путем модификации белка G-CSF [213,358].

Следующим вариантом селективной PEG-модификация является модификация по SH-группе Cys с образованием тиоэфирной связи. В данном случае может использоваться, например, PEG-малеимид, PEG-акрилат или PEG-винил сульфон [330,335,376,413]. Примерами селективной PEG-модификация по Cys могут служить:

- препарат Cimzia[®] (CertolizumabPegol), представляющий собой Fab-фрагмент рекомбинантного гуманизированного моноклонального антитела, направленного против провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли (TNF- α), конъюгированного с двухразветвленным 40 кДа PEG-малеимидом через тиоэфирную связь со свободным Cys тяжелой цепи [198,423];

- препарат Jivi[®] (Damoctokog alfa pegol), представляющий собой rFVIII с deletированным В-доменом, конъюгированный с двухразветвленным 60 кДа PEG-малеимидом через Cys домена A3 [349].

Особый вариант сайт-специфической PEG-модификации ориентирован на использование ферментов, например таких как сортаза, белковая фарнезилтрансфераза, сиалилтрансфераза, транслугтаминаза и других [231].

Эта стратегия была применена для гликозилированных белков, которые помимо значимого для специфической активности N-гликозилирования (Asn), имеют сайты O-гликозилирования (Ser, Thr). Конъюгацию проводят функционализированным сиаловой кислотой PEG в присутствии

сиалилтрансферазы по сиаловым остаткам О-олигосахаридов. Примером могут служить препарат Refixia[®] (Nonacogbetapegol) и препарат Esperoct[®] (Turoctocogalfaregol) - rFIX и rFVIII (соответственно) конъюгированные с 40 кДа PEG[335].

В научной периодике представлены различные аналитические подходы к характеристике PEG-модифицированных белков. Показано, например, что для минимизации неспецифического взаимодействия с PEG, количественная оценка белкового компонента предпочтительна в реакции с бицинхониновой кислотой[331]. Различные методики ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ, эксклюзионная ВЭЖХ, ионообменная ВЭЖХ) могут быть использованы для пептидного картирования, определения специфических примесей и остаточного PEG, разделения фракций моно- и ди-пегилированных молекул, определение позиционных изомеров [239,242,291,306,331,393]. Применение метода электрофореза в ПААГ имеет ограничения, связанные с разницей скорости миграции PEG-модифицированного белка в сравнении с маркерами молекулярных масс, представляющих собой нативные белки [306,437]. Показаны возможности методов MALDI-ToF-MS, ESI-MS для определения молекулярной массы конъюгата и идентификации сайтов связывания путем сравнения масс-спектров, полученных для продуктов ферментативного гидролиза исходного и PEG-модифицированного белка [359, 370,394, 405]. Здесь следует отметить, что выбор методов оценки качества PEG-модифицированного белка полностью зависит от индивидуальных особенностей конъюгата и каждый производитель разрабатывает методики и устанавливает нормы применительно к своему продукту.

Очевидно, что несмотря на объективное критическое мнение, PEG-модифицированные терапевтические белки - востребованный и активно развивающийся сектор БЛП. Таким образом, понимание специфических особенностей PEG-модификации крайне важно для формирования нормативно-регуляторной политики в отношении контроля качества данной группы БЛП.

1.2 Актуальные вспомогательные вещества в составе биологических лекарственных препаратов и особенности их оценки

Вспомогательные вещества являются неотъемлемой составляющей БЛП, обеспечивающей их стабильность, отсутствие контаминации, повышающей иммуногенность и, в комплексе, обеспечивающей эффективность и безопасность этой группы ЛС.

Выбор вспомогательных веществ - многофакторная задача, учитывающая природу действующего вещества, форму выпуска готового препарата, способ его применения, терапевтическую иммуногенность или, наоборот, снижение индукции образования антител и т.д.

Условно все вспомогательные вещества можно разделить на группы: консерванты (бактериостатики), адъюванты, стабилизаторы и антиоксиданты. При этом некоторые вещества могут выполнять несколько функций. Так, например, полисорбат 80 в составе комплексного реагента используют при инактивации вируса [161], а бактериостатики тиомерсал и бензиловый спирт обладают также свойствами стабилизаторов [54,148].

Известно, что белки, выделенные из живых систем, обеспечивающих их нативное и функциональное состояние за счет микро- и макроокружения, в водном или солевом буферном растворе как правило утрачивают стабильность. При этом, понятие «стабильность», применительно к белковой молекуле, носит разноплановый характер. В целом, это сохранение присущей конкретному белку специфической активности, зависящее от его склонности к химически и/или физически опосредованным конформационным изменениям [185,332]. Вещества, выступающие в роли стабилизаторов, призваны снижать способность белков к таким изменениям - агрегации, адсорбции, полимеризации, окислению, дезамидированию и т.д.

В связи с этим, идет постоянный поиск новых эффективных и безопасных стабилизаторов терапевтических белков. Одновременно не прекращается поиск

новых эффективных адъювантов и консервантов, совмещающих свойства стабилизаторов и антиоксидантов. А также, в связи с постоянным развитием приборной аналитической базы, расширяются технические возможности количественной оценки вспомогательных веществ.

Эти процессы находят отражение в совершенствовании методологии оценки качества БЛП, в частности, путем разработки актуальных унифицированных аналитических решений.

Выбор объектов настоящего исследования обусловлен отсутствием унифицированных фармакопейных методик для оценки наиболее востребованных стабилизаторов - полисорбата 80 и аминокислот, а также тенденцией последних лет – перехода на высокотехнологичные методы оценки вспомогательных веществ, в частности геля гидроксида алюминия, взамен традиционных методов количественного химического анализа (колориметрия, титриметрия и т.д.).

1.2.1 Стабилизаторы - полисорбат 80 и аминокислоты

Необходимость использования вспомогательных поверхностно-активных веществ при производстве биологических лекарственных препаратов обусловлена высокой склонностью белков к конформационным изменениям и взаимодействию гидрофобных участков частично развернутых молекул, что является частой причиной их агрегации и адсорбции/адгезии [168,301,310]. Это явление может быть причиной снижения специфической активности и возникновения нежелательных иммунных реакций [281].

Полисорбат 80

Полиоксиэтиленированные сорбитановые эфиры (полисорбаты) являются неионогенными поверхностно-активными веществами, различающиеся типом жирных кислот: полисорбат 20 (монолауреат); полисорбат 40 (монопальмитат); полисорбат 60 (моностеарат); полисорбат 80 (моноолеат). Эфир жирной кислоты определяет гидрофобные свойства молекулы, а полиоксиэтиленовая цепь - гидрофильные. Степень гидрофильности Полисорбата 80 определяет физико-

химические свойства молекулы: способность образовывать водные растворы, устойчивость к действию щелочей и кислот, способность смешиваться с органическими растворителями и т.д. Изучение полисорбатов, прежде всего их токсических свойств, позволило присвоить этому типу соединений категорию «практически нетоксичен», после чего началось массовое использование полисорбатов в косметологии, а затем и в биофармацевтике [211,303,311].

Механизм действия полисорбата, обеспечивающий защиту белка от межфазных напряжений, может заключаться в конкурентной адсорбции/адгезии, уменьшающей поверхность границы раздела фаз, и во взаимодействии с гидрофобными участками белковых молекул [191,247,309,313]. Образующийся при этом комплекс детергент-белок обладает более выраженными гидрофобными свойствами, что увеличивает растворимость и снижает тенденцию к агрегации [176]. Таким образом, благодаря высокой биосовместимости и стабилизирующим свойствам, полисорбаты были включены в базу неактивных ингредиентов FDA для препаратов для внутримышечного, внутривенного, перорального, ректального и вагинального применения, а также в список медикаментов для парентерального и непарентерального применения, лицензированных в Великобритании и сегодня полисорбат можно отнести к вспомогательным веществам «золотого стандарта» для парентеральных препаратов [164,172].

Однако, некоторые исследования отмечают возможность реакции гиперчувствительности на препараты, содержащие полисорбат. Возможно, причиной подобных реакций является не столько сам полисорбат, сколько продукты его деградации, в частности пероксидные производные [88].

В настоящее время в биофармацевтической практике применяют полисорбат 20 и полисорбат 80, при этом явное предпочтение отдается полисорбату 80, имеющего более длинную мононенасыщенную цепь и, как следствие, имеющего более низкую критическую концентрацию мицелл [247]. Некоторыми авторами было отмечено, что различные физико-химические свойства полисорбата 20 и

полисорбата 80 могут служить причиной их различной функциональности и химической стабильности [224, 328,400].

Собственная стабильность полисорбатов в последнее время является темой многочисленных исследований [292]. Деграция полисорбатов возможна путем химического и/или ферментативного гидролиза, индуцированного остаточными белками клетки-хозяина [233,261, 298,328]. Гидролиз полисорбата эстеразами (липазами панкреатической железы и крови) приводит к образованию жирных кислот, которые путем бета-окисления выводятся из организма при дыхании, и полиоксиэтиленового сорбитана, который выводится с мочой и, в меньшей степени, с калом [311,415].

Другой путь деграции полисорбата - окисление. Опасения по поводу окисления полисорбата, как основного механизма его деграции в фармацевтически значимых условиях, привели к подробному сравнению подверженности окислительному разложению полисорбата 20 и полисорбата 80 [300]. В этом исследовании было обнаружено что полисорбат 80 более подвержен окислению, чем полисорбат 20, поскольку для него характерны более низкие температуры и более раннее начало окисления, что, по мнению авторов, может быть связано с большим количеством ненасыщенных жирных кислот. Также авторы утверждают, что окислительные процессы значительно ослабевают при более высоких концентрациях полисорбата, а в целом окисление зависит от начальной концентрации полисорбата, рН среды, содержания ионов железа, доступности кислорода. Данные исследования поддерживают «конкуренцию» между полисорбатом 20 и полисорбатом 80 «в борьбе за роль ведущего сурфактанта», однако пока полисорбат 80 имеет «историческое» преимущество.

Полисорбат 80 входит в состав большого количества разнообразных по своему составу и природе действующего вещества БЛП: рекомбинантные факторы свертывания крови, противобактерийные и противовирусные вакцины, препараты интерферонов, моноклональные антитела, препараты крови (иммуноглобулины),

рекомбинантный человеческий активатор плазминогена и др. Содержание полисорбата 80 в большинстве белковых БЛП составляет от 0,006% до 0,1% (по массе) [47].

Также полисорбат 80 активно применяют на различных стадиях технологического процесса, например, в процессе фильтрации и лиофилизации [345], ультрацентрифугировании и ультрафильтрации [159], при контролируемой солубилизации [158], при формулировании готового продукта [236], а также при инактивации вирусов [160]. Механизм действия детергента, в последнем случае, заключается в специфическом разрушении вирусной липидной оболочки, при относительно слабом влиянии на целостность терапевтических белков. Также раствор полисорбата 80 в воде для инъекций может выступать в качестве растворителя для лиофилизированных форм [161].

Количество полисорбата 80, необходимое для стабилизации целевого вещества, определяется производителем на основании материалов доклинических и клинических исследований, и, согласно существующим регуляторным требованиям, нормативной документацией производителя предусмотрена количественная оценка полисорбата 80 на стадии конечного продукта [37,59,64].

Здесь следует отметить, что полисорбат 80 представляет собой смесь эфиров жирных кислот, преимущественно олеиновой, и этоксилированного сорбита и/или ангидрида. Согласно требованиям международных фармакопей (Европейская, Японская, Китайская и Американская фармакопей) в составе полисорбата, помимо олеиновой кислоты, могут присутствовать миристиновая, пальмитиновая, пальмитолеиновая, стеариновая, линолевая, линоленовая кислоты. Процентное содержание этих кислот определяется методом газовой хроматографии и нормируется полуколичественно как примесь («не более...»). Требования большинства фармакопей к содержанию олеиновой кислоты в составе полисорбата 80 гармонизированы и составляют «не менее 58,0%», за исключением Китайской фармакопей - «не менее 98%». Таким образом, только

полисорбат 80, соответствующий требованиям китайской фармакопеи, можно считать стандартизованным по содержанию олеиновой кислоты. Для остальных возможен разброс значений в диапазоне от 58 до 98% даже в пределах разных серий полисорбата 80 одного производителя.

Это обстоятельство создает определенные трудности при количественной оценке полисорбата 80 в случае если методика основана на определении полисорбата 80 по продукту его гидролиза - олеиновой кислоте или ее производным (дерииватам), поскольку в данном случае в качестве образца сравнения, необходимо использовать марку и партию полисорбата 80, которая применялась при производстве препарата, что не всегда возможно технически.

Колориметрическое определение полисорбата 80 основано на образовании окрашенных полисорбат-тиоционатных комплексов разных металлов (кобальта, железа, молибдена) [289,390]. Данные методики подразумевают экстракцию окрашенного комплекса в органическую фазу. К их недостаткам можно отнести общие особенности работы с органическими фазами: склонность к образованию эмульсий, нестабильность окрашенных комплексов, недостаточная точность при отборе органических фаз для колориметрирования. В целом все эти факторы негативно влияют на точностные характеристики методик - правильность и прецизионность. Кроме того, было установлено, что спектрофотометрический и колориметрический методы не позволяют селективно определять полисорбат 80 и продукты его деградации [288].

Методы прямого определения полисорбата 80, без предварительного гидролиза и получения химических производных, как правило, основаны на принципе ВЭЖХ и использовании детекторов CAD, ELSD и MS [217,237,265,338,339,350]. Однако не все эти методы обладают линейностью отклика и, кроме того, использование данных методов (прежде всего детекторов) в настоящее время пока сложно назвать рутинной лабораторной практикой.

Традиционная ОФ-ВЭЖХ с УФ-детектированием предполагает предварительный щелочной гидролиз и дальнейшее детектирование по олеиновой кислоте, о недостатке которого было сказано выше [55,177]. Также к технически доступным методам можно отнести одностадийный метод эксклюзионной ВЭЖХ с изократическим элюированием [408]. Авторы утверждают, что использование подвижной фазы, содержащей полисорбат 80 в концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования, исключает взаимодействие между полисорбатом 80 и колонкой. Это, в свою очередь, уменьшает время элюирования полисорбата 80, улучшает форму пика и его разделение с другими компонентами матрицы. Здесь, к недостаткам также можно отнести необходимость использования в полисорбата 80 той же партии, что использовалась при производстве анализируемого препарата. Это вызвано необходимостью определения критической концентрации мицеллообразования, которая зависит от состава полисорбата 80. Авторы обращают внимание, что молекулы с более длинными или более жирными кислотными остатками будут образовывать мицеллы при более низких концентрациях. Переход критической концентрации мицеллообразования полисорбата 80 является относительно резким и хорошо сопоставимым с переходом концентрации додецилсульфата натрия (SDS).

Аминокислоты

Помимо высокомолекулярных стабилизаторов хорошо известно стабилизирующее действие малых молекул. Аминокислоты, наряду с сахарами и полиолами, активно используют в биофармацевтике в качестве низкомолекулярных стабилизаторов водных растворов белков и их лиофилизатов. Эти соединения, одним из общих свойств которых является способность увеличивать поверхностное натяжение водных растворов, относят к так называемым «совместимым растворенным веществам», поскольку они не влияют на функцию макромолекул [185,293].

Многочисленные исследования свидетельствуют о способности как единичных аминокислот, так и их смеси улучшать профиль безопасности лекарственного средства путем обеспечения стабильности и повышения растворимости действующего вещества, выступать в роли лио- и криопротекторов, а также благоприятно влиять на сохранение активности в процессе производства и хранения БЛП [274].

Преимущества аминокислот, по сравнению с одним из традиционных стабилизаторов - ЧСА, заключаются, например, в отсутствии потенциального риска иммуногенности, возможной в случае конформационных изменений молекулы ЧСА, а также риска прионной или вирусной контаминации. Кроме того, при необходимости, аминокислоты легко элиминировать из раствора белка, например, при подтверждении подлинности структуры действующего вещества. В то же время, аминокислоты не вызывают нежелательные реакции, как, например, сахароза [214,253].

Ключевую роль в понимании механизма стабилизирующего действия аминокислот в растворе играет термодинамическая стабильность белков, которая определяется энергией, необходимой для изменения конформационного состояния молекулы, которая, в свою очередь, зависит от опосредованного растворителем сопряжения внутри- и межмолекулярных взаимодействий белковых молекул [102]. Увеличение относительного значения свободной энергии разворачивания (*unfoldin genergy*) молекул приводит к стабилизации нативного белка. Это увеличение может достигаться путем уменьшения свободной энергии нативных молекул, возможно за счет образования лигандов, специфичных для каждого белка [438]. Или путем увеличения собственно свободной энергии разворачивания, что также способствует стабилизации белка в его активном состоянии [185]. Этому явлению способствуют растворенные низкомолекулярные стабилизирующие добавки, в том числе некоторые аминокислоты, например, глицин, гистидин, пролин и т.д.

Наблюдения, основанные на равновесном диализе, показали дефицит этих добавок вблизи молекул белка, т.е. связывание их с белками, фактически является отрицательным [184]. Термодинамическим следствием такого «отталкивания» является увеличение свободной энергии разворачивания [185]. При этом, согласно изотерме адсорбции Гиббса, для увеличения поверхностного натяжения воды необходим недостаток растворенных веществ на границе раздела [234]. Такая взаимосвязь между поверхностным натяжением и вытеснением растворенных веществ лежит в основе стабилизации и самоассоциации макромолекул [399].

Кроме стабилизирующего действия на растворенные белки, хорошо известна эффективность малых молекул в поддержании нативной структуры высушенных белков. Пониманию этого механизма способствовало изучение микроорганизмов, выживающих в стрессовых условиях обезвоживания путем накопления трегалозы [200,210,369]. При удалении и/или замораживании воды, разрушение водородных связей может приводить к возникновению нежелательных межбелковых взаимодействий. Сахара и, как позже было установлено, аминокислоты, могут замещать молекулы воды при образовании водородных связей. Кроме того, аминокислоты, так же, как и сахара, обладают высокой температурой стеклования, что обеспечивает аморфную стекловидную среду для высушенных белков, ограничивая их подвижность и замедляя химические реакции [86,200,369,387].

В научной литературе широко представлены результаты исследований стабилизирующего действия пролина, гистидина, глицина, лизина. Отмечены свойства пролина предотвращать рефолдинг и высказаны предположения о его способности выступать в качестве шаперона; свойства гистидина как буферного агента, стабилизатора, крио-/лиопротектора, антиоксиданта, средства для повышения вязкости, восстановителя и солюбилизующего агента; востребованность метионина как антиоксиданта для нейтрализации активных форм кислорода и свободных радикалов [56,317,385,389].

Отдельно отмечено, что аргинин не является осмолитом и не влияет на температуру плавления белков. По мнению исследователей, аргинин может проявлять как стабилизирующие, так и денатурирующие свойства в зависимости от условий, главным образом температуры [269,290,428]. При этом, отличие аргинина заключается в его способности взаимодействовать с большинством боковых цепей аминокислотных остатков, в том числе ароматических [185]. Известна способность аргинина подавлять агрегацию белков, в том числе, во время рефолдинга, что делает его востребованным, например, в случае экспрессии белков в виде телец включения в культуре *Escherichia coli* (Hoetal., 2003 Blasiget al., 2006). По мнению авторов данный эффект достигается благодаря взаимодействию гуанидиновой группы аргинина с боковой цепью тирптофанов. Эти же авторы отмечают свойство аргинина увеличивать секрецию белков в периплазму [411]. Кроме того, аргинин обладает свойством изменять температуру стеклования [404]. Таким образом, аргинин оказывает влияние на термодинамическую стабильность путем непосредственного взаимодействия с молекулой белка и на кинетическую стабильность за счет изменения температуры стеклования.

Сегодня в биофармацевтике наиболее востребованы аминокислоты глицин, пролин, гистидин, метионин, аргинин, лизин. Например, для стабилизации препаратов крови, представляющих собой иммуноглобулины и альбумины, выделенные из плазмы крови человека, преимущественно используется глицин, редко пролин или смесь глицин-аргинин-гистидин. Препараты факторов свертывания крови, выделенных из плазмы или полученных методом рекомбинантной ДНК, содержат глицин, гистидин и метионин в качестве единичных аминокислот. В качестве смеси аминокислот могут присутствовать метионин-гистидин, глицин-гистидин, глицин-лизин, лизин-аргинин. Препараты интерферонов, как правило, содержат метионин или аргинин [47]. При этом тенденция последних лет - использование смеси аминокислот, которая за счет

синергетического эффекта может рассматриваться как альтернатива белковым и/или углеводным стабилизаторам.

Методы количественной оценки аминокислот в БЛП можно разделить на селективные и неселективные. К неселективным относятся классические реакции на функциональные группы: метод формольного титрования в реакции формальдегида с аминными группами, определении небелкового азота (например, по Къельдалю или Несслеру), реакции карбоксильных групп аминокислот с нингидрином, по реакции типтофана с раствором сахарозы, реакции на ароматические кислоты и т.д.

Этот аналитический подход обычно применяют производители для препаратов, содержащих одну аминокислоту, поскольку в данном случае селективный количественный анализ не нужен, а элиминация белкового компонента не представляет особой сложности.

Наиболее популярными и технически доступными для селективной оценки аминокислот являются методы ГЖХ и ВЭЖХ. К недостаткам методик, основанных на методе ГЖХ, можно отнести необходимость получения летучих производных, например, с помощью метилхлорформиата или этилхлорформиата с последующей экстракцией деривата в хлороформ [263,416].

Наиболее распространенным хроматографическим методом определения аминокислот является метод с постколоночной дериватизацией нингидрином и последующим УФ-детектированием [403]. На основе этого метода, разработанного в середине XX века, в последствии было разработано множество методик, в том числе, основанных на использовании современных систем ВЭЖХ. Позже был синтезирован высокореактивный дериватирующий агент для получения аминов - 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбамат (AQC) [218,430]. В настоящее время для дериватизации часто используется ортофталевый альдегид (OPA), предполагающий флуориметрическое детектирование [186,354]. Также описан метод ЯМР с использованием OPA-дериватов [384].

Предложен интересный подход к флуориметрическому определению L- и D-изомеров аминокислот путем двухэтапной дериватизации первичных аминов ортофталевым альдегидом/N-ацетил-L-цистеином (OPA/NAC) и, затем, 1-(9-флуоренил)этилхлорформиатом (FLEC) вторичных аминов [429].

Известна оптимизация методики предколоночной дериватизации АЭС и последующим УФ-детектированием путем использования MS-детектирования [364]. А также метод двойной дериватизации карбоксильных и аминогрупп аминокислот, с использованием бутанола и дансилхлорида соответственно, с последующим MS-детектированием объединенной пробы [227].

Наиболее устоявшиеся и технически доступные подходы анализа аминокислот суммированы в монографии 2.2.56 Amino Acid Analysis Европейской фармакопеи применительно к белковому гидролизату. Все предлагаемые ЕФ методики оценки аминокислот основаны на получении дериватов и, поэтому, в качестве приборной базы заявлена необходимость наличия системы, имеющей техническую возможность проведения постколоночной дериватизации, а также УФ- и флуоресцентного детектирования [106].

Основной недостаток данных методик - необходимость получения дериватов на стадии до (предколоночная дериватизация) или после (постколоночная дериватизация) разделения смеси. Последний вариант требует наличия дополнительных модульных систем, интегрированных с основной системой ВЭЖХ.

Определение аминокислот без получения дериватов возможно методом ВЭЖХ MS-MS[314]. А также, благодаря способности аминокислот образовывать анионы при щелочных значениях pH, возможно их прямое определение с помощью анионообменной хроматографии с интегрированным импульсным амперометрическим детектором (IPAD) [431]. Недостатком данных подходов, с позиции унификации аналитических процедур, можно считать необходимость наличия хроматографа, оснащенного IPAD- или MS-детектором.

Особый интерес, в контексте количественной селективной оценки аминокислот без дериватизации, представляет гидрофильная хроматография - HILIC (Hydrophilic interaction chromatography), открывающая широкие возможности для эффективного разделения полярных соединений. Известно, что разделение при ОФ-ВЭЖХ основано на использовании гидрофобных неподвижных (например, диоксид кремния, модифицированный алкилом) и полярных подвижных фаз. Разделение при нормально-фазовой ВЭЖХ основано на использовании полярных неподвижных фаз (например, диоксид кремния, модифицированный диолом) с органическими элюентами. HILIC определяется как метод, объединяющий свойства ВЭЖХ (нормально-фазовая) и ОФ-ВЭЖХ. Этот эффект достигается за счет смешанного режима сорбции на полярном сорбенте при использовании полярного элюента [235]. Авторы отмечают, что возможности HILIC позволяют применять его при разделении малых молекул, а также открывают новые перспективы в оценке белков и пептидов [327,353,440].

Например, на основе метода HILIC была разработана методика прямого определения аминокислот в пищевых добавках. Авторами показано, что использование элюента с низким порогом излучения (подвижная фаза, обогащенная ацетонитрилом), позволяет проводить УФ-детектирование аминокислот [409]. Также возможности HILIC в сочетании с тандемной масс-спектрометрии были реализованы при определении аминокислот в плазме крови человека [366].

Таким образом, необходимость количественной оценки наиболее широко встречающихся в БЛП стабилизаторов - аминокислот и полисорбата 80, отсутствие фармакопейных методик и наличие большого количества разнообразных аналитических решений, используемых производителями приводят к техническим сложностям их воспроизведения в ходе регистрационной экспертизы, а также при вводе БЛП в гражданский оборот.

Очевидным решением данной проблемы является разработка унифицированных методик контроля качества медицинских биопрепаратов по количественному содержанию полисорбата 80 и аминокислот - технически доступных для большинства производителей и рассчитанных на широкий спектр БЛП.

1.2.2 Адъюванты

Свойство некоторых соединений, получивших название адъювантов, усиливать иммунный ответ впервые было обнаружено в 20-х годах XX. В начале в качестве адъювантов были исследованы соли алюминия, позднее - водно-масляные эмульсии [241,246]. До 90-х годов XX века для медицинского применения были разрешены только адъюванты на основе алюминия [441].

Курс на снижение реактогенности вакцин, путем отказа от использования аттенуированных или инактивированных антигенов, привел к появлению субъединичных вакцин, сплит-вакцин, вакцин на основе очищенных или химически синтезированных полисахаридов, рекомбинантных вакцин, вакцин на основе нуклеиновых кислот. Обратная сторона данной стратегии - более низкая иммуногенность новых антигенов, стимулировала поиск новых веществ, усиливающих иммунный ответ [368].

Список веществ, способных проявлять свойства адъювантов, очень разнообразен - минеральные соли, поверхностно-активные соединения, производные микроорганизмов, эмульсии, цитокины, полисахариды, синтетические иммуноадъюванты и т.д. [98,418]. Однако возможность их использования в составе препаратов, вводимых людям - предмет, требующий особого изучения.

В результате исследований появился ряд новых адъювантов, получивших разрешение FDA к применению в медицинской практике. Например, эмульсия на основе сквалена (углеводород трипентенового ряда), содержащая также лимонную кислоту, полисорбат 80 и сорбитан, получившая название MF59 [297];

липосомальная адъювантная система AS01, содержащая два иммуностимулятора (3-О-дезацил-4'-монофосфорил липид А (MPL) и сапонин (QS-21) и липосомальные системы AS02, AS03, AS04 (MPL и гидроксид алюминия) [228,396,442]; собственно MPL, представляющий детоксифицированное производное липополисахарида из *Salmonella minnesota* [190]; олигонуклеотид CpG [285].

В Российской Федерации разрешены к применению иммуномодулятор-адъювант Полиоксидоний (сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксо)-1,4-этиленпиперазиния бромид) и адъювант Совидон (сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона), которые входят в состав отечественных гриппозных вакцин. Также в РФ зарегистрированы вакцина против вируса КОВИД, содержащая сквалан; вакцина против вируса ветряной оспы, содержащая MPL; мультивакцина против вирусов КОВИД, содержащая адъювант на основе сквалена [47,91,97].

Несмотря на почти 100-летнее активное использование адъювантов в медицинской практике, изучение механизмов их влияния на иммунный ответ и, собственно, иммунный ответ, являются предметом изучения современной молекулярной иммунологии.

Исследования последних десятилетий, посвященные взаимосвязи систем врожденного и адаптивного иммунитета, позволили расширить ранее существующее представление об адъювантах, как о веществах, аккумулирующих антиген и обеспечивающих его постепенное высвобождение *in vivo* [329,377]. Известно, что иммуногенность зависит от наличия ассоциированных с патогеном молекулярных паттернов (pathogen-associatedmolecularpattern - PAMP), способных активировать антиген-распознающие рецепторы (pattern recognition receptor-PRR) клеток иммунной системы. Активация PRR приводит к индукции клеточно-опосредованного ответа, активации эффекторных Т-клеток (CD4⁺, CD8⁺), а также патоген-специфического адаптивного гуморального иммунного ответа [343].

Активированные эффекторные Т-клетки секретируют цитокины, активирующие макрофаги для опсонизации фагоцитированных патогенов; стимулируют В-клетки; секретируют цитотоксические факторы, нацеленные на инфицированные патогеном или трансформированные клетки (Рисунок 3).

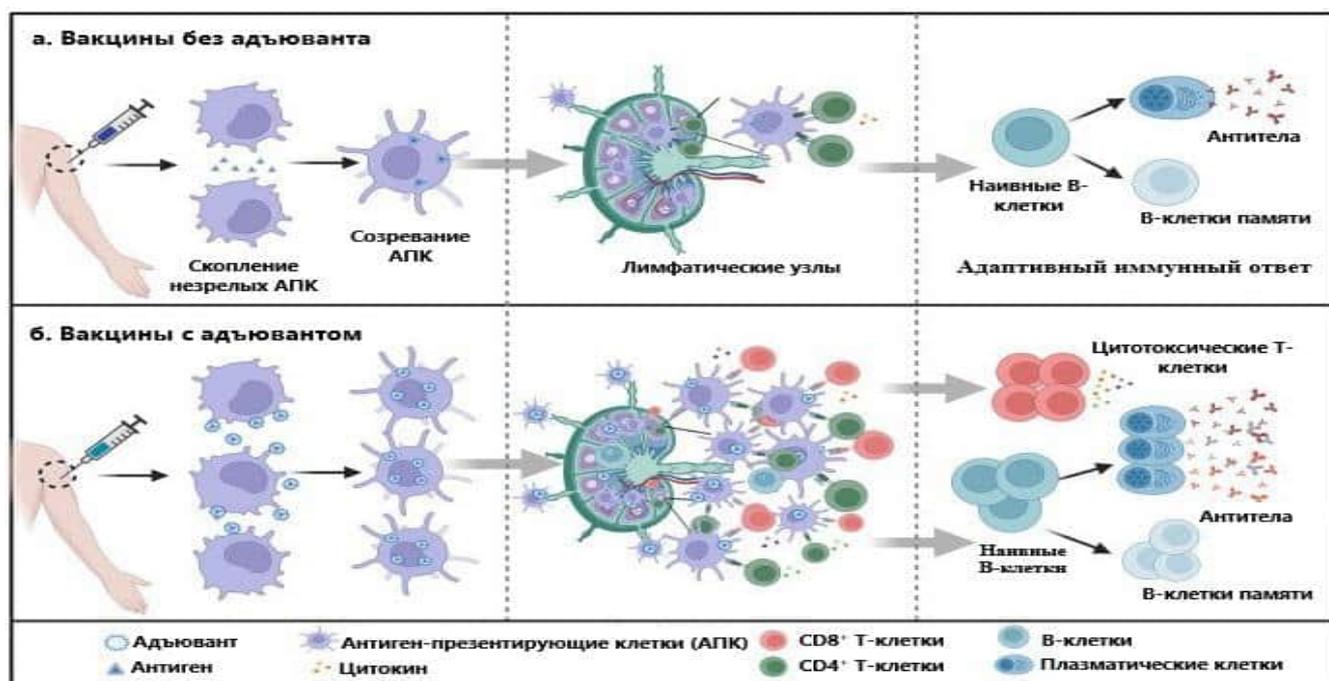


Рисунок 3 - Общие механизмы действия адъювантов. Адаптировано из источника [441]¹

Это открытие влияния активации врожденной иммунной системы на иницирование и усиление антигенспецифических реакций адаптивной иммунной системы позволило определить роль адъювантов как «неантигенных компонентов вакцин, стимулирующих врожденную систему иммунитета и усиливающих таким образом адаптивный (специфический) иммунный ответ» [270]. Таким образом действие адъювантов можно условно разделить на функцию системы доставки антигена и функцию иммуностимулятора [190].

¹«а. Вакцины без адъювантов вызывают скромное производство Т-хелпер-поляризирующих цитокинов, антител и активированных Т-клеток. б. Напротив, вакцины с адъювантами способствуют созреванию большего количества АПК, усиливают взаимодействие между АПК и Т-клетками, способствуют производству большего количества Т-хелпер-поляризирующих цитокинов, многофункциональных Т-клеток и антител, что приводит к длительному иммунитету, а также к экономии дозы и антигена» [441].

Несмотря на поиск и активное внедрение в медицинскую практику новых адъювантов, адсорбция антигенов на производных алюминия остается наиболее популярным способом повышения иммуногенности. Гидроксид алюминия и фосфат алюминия в свое время пришли на смену сульфату алюминия и калия, благодаря стабильности их получения и адсорбционным свойствам.

Предположительно, механизм адсорбции заключается в сочетании электростатического взаимодействия (между отрицательно заряженными белками и гидроксидом алюминия или положительно заряженными белками и фосфатом алюминия), анионного обмена лигандами в ходе ковалентного взаимодействия гидроксильных групп адъюванта и фосфатных групп антигена, а также вероятных гидрофобных взаимодействий [322].

Для повышения иммуногенности БЛП преимущественно применяют гидроксид алюминия. Этот адъювант, сочетает функции системы доставки (за счет сорбирующих свойств) и иммуностимулятора, путем создания локального воспаления в месте инъекции и активации врожденного иммунитета.

Гидроксид алюминия традиционно используют при производстве вакцинных препаратов, представленных в отечественном календаре профилактических прививок и календаре прививок по эпидемиологическим показаниям: АКДС- и АДС вакцин, вакцин против гепатита В, вакцин против клещевого энцефалита, вакцины против гепатита А, полисахаридных вакцин против пневмококковой инфекции, комбинированных пяти- и шестикомпонентных вакцин на основе АКДС (компонент против гепатита В и гемофильной инфекции), а также АС- и АДС-М-анатоксинов [1,47].

Роль гидроксида алюминия в стимуляции иммунного ответа имеет достаточно подтверждений [244,320], в частности, рядом авторов было отмечено, что процесс презентации антигена макрофагами и дендритными клетками коррелирует со степенью адсорбции антигена в интерстициальной жидкости [219]. Авторы отмечают, что десорбированные *in vivo* антигены интернализуются

дендритными клетками в результате макропиноцитоза, в то время как адсорбированные антигены интернализируются непосредственно адьювантом в результате фагоцитоза [337]. Таким образом, подтверждается важность контроля степени сорбции для конечного продукта.

В это же время, спорным остается вопрос о влиянии процесса сорбции на стабильность молекулы антигена [171]. Ряд авторов утверждает, что антиген сохраняет исходную термостабильность молекулы после сорбции [179,219,230,272,352]. Другие исследования показывают, что адсорбированный антиген в растворе стабилизаторов проявляет меньшую термостабильность по сравнению с исходным белком в силу его конформационных изменений [205,278,352].

Например, в исследовании конформационных изменений адсорбированного дифтерийного анатоксина с помощью пяти физико-химических методов (внутренней и внешней флуоресцентной спектроскопии, кругового дихроизма, инфракрасной спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии) авторами были показаны существенные изменения в структуре белка [378]. Было показано более чем 5-ти кратное увеличение интенсивности внешней флуоресценции сорбированного белка, что свидетельствует о частичном дефолдинге молекулы и большей доступности гидрофобных областей. Исследования методами ИК-спектроскопии и кругового дихроизма позволили авторам сделать вывод об относительной потере структуры α -спирали и увеличении β -слоя и случайной спирали.

Так или иначе, степень и характер сорбции будут зависеть от природы белковой молекулы и условий сорбции, в частности, соотношения белок-сорбент, pH среды и природы стабилизаторов. Таким образом, при разработке препарата, применительно к каждому антигену подбирается оптимальное количество сорбента, учитывающее терапевтическую дозу антигена, а также состав стабилизаторов, ориентированный на свойства сорбированного антигена.

Данное соотношение должно обеспечивать максимальную полноту сорбции и при этом минимизировать вероятность нежелательных реакций - уплотнения, покраснение в месте введения, а также развития воспалительного синдрома, ассоциированного с адьювантами [90]. Тем более, что в последние годы достаточно много исследований посвящены предположительной нейротоксичности адьювантов на основе алюминия, а также их предполагаемой связи с макрофагальным миофасцитом или миалгическим энцефаломиелитом/синдромом хронической усталости [244,323,365,425].

Количественная оценка гидроксида алюминия на соответствие установленной норме является фармакопейным требованием к готовым формам вакцинных сорбированных препаратов. Максимально возможное содержание ионов алюминия в БЛП ограничено требованиями ВОЗ - не более 1,25 мг в дозе [142]. Допустимое содержание данного адьюванта, обоснованное данными по разработке ЛП, устанавливается производителем. На момент выполнения настоящего исследования фармакопейным методом определения ионов алюминия был метод комплексометрического обратного титрования, основанный на реакции ионов алюминия с натрия эдетатом с предварительной минерализацией белковой матрицы путем нагревания с концентрированной серной кислотой [38]. Техническая доступность данного метода, а также его валидационные характеристики (специфичность, точность (правильность и прецизионность), чувствительность и т.д.), обеспечивают востребованность метода и позволяют определять соли алюминия по ионам алюминия в существующем диапазоне концентраций гидроксида алюминия от 0,2 до 1,7 мг/мл (в зависимости от препарата).

Международная система менеджмента качества и основанные на ее положениях требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий [23,24,28] сегодня представляют собой практически «абсолютную доктрину», следование которой обязательно для всех структур, задействованных

на фармацевтическом рынке. Внедрение высокотехнологичных методов, обеспечивающих автоматизацию процесса контроля качества и прослеживаемость результатов - одно из направлений обеспечения этой системы, открывающее пути ее совершенствования.

В качестве высокотехнологичных методов определения ионов алюминия достаточно давно используется метод атомно-абсорбционной спектрометрии. Особенно востребован данный метод элементного анализа в авиационной, нефтяной, тяжелой, сельскохозяйственной промышленности, а также в сфере экологии. Для этого метода известны несколько способов атомизации - пламенная и электротермическая. Оба эти способа предполагают предварительное термическое или кислотное озоление пробы при высоких температурах, например при 200-250⁰С в течение 3 часов или при 800⁰С в течение 30 мин, с последующим растворением минерализата в концентрированной серной или азотной кислотах. К достоинствам электротермической атомизации можно отнести небольшие объемы проб, более высокие показатели точности, связанные с увеличением эффективности атомизации и отсутствие проблем, связанных с возможным проскоком частиц сквозь просвечиваемую зону, характерным для быстрой атомизации в пламени [79].

Возможность использования данного метода для оценки алюминия в биомедицинских продуктах также требует предварительной минерализации образца. Так, например, определение ионов алюминия в анатоксинах и аллергенах требует подготовки пробы путем нагревания в концентрированной серной кислоте с последующей атомизацией в пламени ацетилен и закиси азота [325]. В другом случае, для определения ионов алюминия в сорбированных вакцинах, предназначенных для детей, использован более точный и технически удобный способ электротермической атомизации [395]. К недостаткам данной методики можно отнести необходимость использования системы для

микроволнового разложения пробы в присутствии концентрированной азотной кислоты и перекиси водорода.

Кроме того, в нормативной документации производителей достаточно часто используются различные методики контроля качества медицинских биопрепаратов по содержанию ионов алюминия в сорбированных препаратах, основанные преимущественно на атомно-абсорбционной спектрометрии с атомизацией в пламени и предварительной кислотной минерализацией или на атомно-эмиссионной спектрометрии, в том числе с индуктивно связанной плазмой. В последнем случае, чувствительность и точность метода для определения не следовых (на уровне нанограмм), а добавленных (на уровне миллиграмм) количеств алюминия явно избыточна. Кроме того, высокая стоимость оборудования, особые условия его размещения и эксплуатации создают массу технических сложностей, не оправданных функционально.

Однако очевидно, что тенденция отказа от методики титриметрического анализа в пользу спектральных методов анализа требует наличия альтернативной и технически удобной методики контроля качества медицинских биопрепаратов по содержанию ионов алюминия, основанной на методе атомно-абсорбционной спектрометрии, где преимущество имеет электротермическая атомизация, не требующая работы с горючими газами.

Резюме

Анализ научной литературы в комплексе с нормативно-регуляторными документами позволил выявить актуальные направления совершенствования методологии оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов.

Препараты на основе рекомбинантных интерферонов альфа-2b и бета-1b, широко применяющиеся в клинической практике, имеют структурные отличия на уровне аминокислотной последовательности ((rINF альфа-2b (Met и no-Met)) и посттрансляционных модификаций (rINFbeta-1a и rINFbeta-1b), влияющие на

специфическую активность белка и требующие индивидуального подхода при контроле качества - наличия соответствующих стандартных образцов.

Препараты на основе рекомбинантных факторов свертывания крови отличает особое структурное разнообразие, в основе которого лежит задача снижения индукции ингибирующих антител. Особенность этого активно развивающегося направления медицинской биотехнологии - постоянно растущее число белков с разными международными непатентованными наименованиями, в том числе белков, обладающих одним типом специфической биологической активности, требует наличия регуляторных документов, формирующих требования к данной группе БЛП, и стандартизации подходов к оценке подлинности первичной структуры и посттрансляционных модификаций получаемых белков в виде соответствующих стандартных образцов.

Приведенные примеры PEG-модификации терапевтически активных молекул не охватывают весь спектр существующих стратегий и методических решений оценки качества, но демонстрируют возможности и разнообразие технологий, а также индивидуальные особенности молекул, физико-химические и биологические свойства которых будут зависеть от многих составляющих процесса: особенностей структуры исходного белка; молекулярной массы, длины и строения исходной PEG-цепи; типа конъюгирования и локализации связи. Очевидна необходимость наличия регуляторных документов, формирующих требования к данной группе БЛП, в том числе к номенклатуре показателей качества, обязательных для характеристики PEG-модифицированного белка.

Оценка качества БЛП по количественному содержанию вспомогательных веществ - неотъемлемая составляющая контроля качества медицинских биотехнологических препаратов. Номенклатура актуальных вспомогательных веществ, используемых при производстве БЛП, постоянно расширяется за счет создания новых веществ и/или использования ранее известных веществ в новых комбинациях. На сегодняшний день одними из наиболее часто встречающихся

веществ, выполняющих функцию стабилизаторов, являются аминокислоты (одна или смесь) и полисорбат 80. Наиболее востребованным адъювантом, несмотря на активное развитие этого направления, остается гель гидроксида или фосфата алюминия. Разнообразие методических решений их количественной оценки в составе БЛП обусловлено постоянным расширением технических инструментальных возможностей. Данное разнообразие, приветствующееся в научном аспекте, создает множество технических проблем в ходе лабораторной фармацевтической экспертизы и рутинного контроля качества. Наличие унифицированных методик, рассчитанных на широкий спектр БЛП и основанных на использовании доступного для большинства производителей оборудования, очевидно оптимизирует процесс контроля качества БЛП как в рамках регистрационной/пострегистрационной процедуры, так и при подтверждении соответствия каждой вновь выпускаемой серии БЛП.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Анализ особенностей оценки подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков с целью разработки общих гармонизированных требований

Процесс гармонизации требований к оценке физико-химических показателей качества биотехнологических лекарственных средств, к которым относятся рекомбинантные терапевтические белки, имеет ряд проблемных аспектов:

- регистрация на российском рынке биоподобных препаратов отечественного производства до выхода соответствующей монографии в фармакопее ЕС, что приводит к различиям в методиках оценки качества установленной номенклатуры показателей для оригинального и биоподобного продукта;

- отсутствие в фармакопеех РФ и ЕС требований к оценке качества соответствующих субстанций, обусловленное опережающим выходом на рынок препаратов данной группы;

- структурные отличия рекомбинантных белков одного назначения/ одного МНН, полученных разными производителями;

- отсутствие отечественных фармакопейных стандартных образцов предназначенных для подтверждения подлинности (верификации) структуры рекомбинантного белка, отражающих индивидуальные особенности как первичной структуры молекулы, так и ее специфически значимых пост-трансляционных модификаций;

- сложности коммерческой доступности существующих международных стандартных образцов, предназначенных для оценки подлинности структуры рекомбинантных белков, при том, что их использование предусмотрено нормативными документациями отечественных производителей.

На момент выполнения исследования, несмотря на длительную практику применения и высокую востребованность, отечественные фармакопейные требования к качеству препаратов интерферонов, рекомбинантных факторов

свертывания крови и PEG-модифицированных белков не были представлены. Таким образом, исследование касалось разработки гармонизированных требований к оценке основных физико-химических показателей качества: подлинности структуры и чистоты субстанций рекомбинантных факторов свертывания крови, субстанций рекомбинантных интерферонов альфа-2b и бета-1b, PEG-модифицированных рекомбинантных белков, производимых в Российской Федерации.

Кроме того, согласно Стратегии «Фарма-2030», положениям постановления Правительства РФ и Приказа Минздрава России, курс на обеспечение независимости фармацевтического рынка РФ в условиях санкционной политики диктует необходимость разработки национальных фармакопейных стандартных образцов, являющихся полноценной заменой используемым ранее международным образцам [5,6,8].

В современных условиях, совершенствование методологии оценки физико-химических показателей качества БЛП заключалось в разработке гармонизированных требований к оценке подлинности структуры и чистоты групп препаратов на основе вышеуказанных рекомбинантных терапевтических белков, а также систематизации требований к разработке и аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры. В основу требований был положен анализ отечественных и международных документов, а также анализ технологических и структурных особенностей каждой из групп белков.

2.1 Особенности оценки подлинности структуры рекомбинантных интерферонов альфа и бета

Препараты интерферонов альфа имеют широкий спектр применения, включающий лечение онкологических и инфекционных (вирусных) заболеваний и готовые лекарственные препараты интерферонов альфа представлены большим количеством форм: капли, спреи, гели, мази, суппозитории, растворы для

инъекций, лиофилизаты для приготовления растворов для инъекций и т.д. [47]. Данные формы выпуска чаще всего содержат вспомогательные вещества, затрудняющие проведение полноценной характеристики действующего вещества на стадии готового продукта. Таким образом, основная оценка структуры и чистоты рекомбинантного интерферона проводится на уровне фармацевтической субстанции.

Субстанции интерферонов альфа отечественных производителей представлены подсемейством интерферонов альфа-2b, особенностью которого является N-концевой метионин с остатком муравьиной кислоты. В традиционно используемых клетках *Pichia pastoris*, *Pseudomonas putida* и *Escherichia coli* формилированный метионин отщепляется от белковой молекулы с помощью ферментов пептидилдеформилазы и метионинаминопептидазы. В условиях суперэкспрессии может наблюдаться недостаток данных ферментов, приводящий к неэффективному протеолизу, и экспрессии молекул с неотщепленным M₁. Таким образом, в зависимости от условий экспрессии белка в бактериях возможно получение двух форм интерферона альфа-2b: метиониновой формы и безметиониновой формы (идентичной эндогенному интерферону) [49,51,82, 197,280]. В Российской Федерации зарегистрированы и производятся 7 субстанций интерферона альфа-2b: пять субстанций безметиониновой и две субстанции метиониновой формы [47].

Международные требования к оценке качества субстанций рекомбинантных интерферонов альфа изложены в ЕФ - монография 07/2015:1110 «Interferon alpha-2 Concentrated Solution». Данный документ отражает структурные различия интерферонов подсемейств альфа-2a и альфа-2b (K₂₃ и R₂₃ соответственно) и содержит требования к оценке их качества. Согласно вышеуказанным монографиям, основные физико-химические показатели качества предполагают оценку подлинности структуры молекулы белка методами изофокусирования, электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в ПААГ и

пептидное картирование; количественное определение белка (метод Лоури) и анализ его чистоты (содержание родственных (специфических) и технологических (неспецифических) примесей) методом ОФ ВЭЖХ. В качестве образцов сравнения указаны rINF-alfa2aCRS (I03203000) и rIFN-alfa2bCRS (I0320301) [114,120].

Все вышеуказанные требования - показатели качества и методы их подтверждения, были учтены при разработке отечественных гармонизированных фармакопейных требований к качеству препаратов интерферонов альфа с учетом следующей специфики отечественных производителей:

- интерферон альфа-2а не производится российскими предприятиями и наличие образца Interferon alfa-2a CRS для отечественного производства не актуально;

- использование образца Interferon alfa-2b CRS, представляющего собой безметиониновую форму, возможно для субстанций rIFN-alfa2b (no-Met) в полном объеме;

- использование образца Interferon alfa-2b CRS для подтверждения подлинности субстанций rIFN-alfa2b (Met) методом пептидного картирования некорректно, поскольку требование по принципиальному совпадению пептидных карт испытуемого и стандартного образцов для подтверждения идентичности первичной последовательности исследуемых молекул, не выполняется из-за M₁ [92].

В клинической практике в качестве первой линии терапии при рассеянном склерозе применяют рекомбинантные формы интерферона бета: подтипы бета-1а и бета-1b. Данные белки имеют существенные структурные отличия, обусловленные разными технологиями их получения, которые оказывают влияние на их физические свойства и клиническую эффективность лекарственного препарата [101,178,192,194,225,294,324,379]. Таким образом, контроль

подлинности структуры, обеспечивающий идентификацию конкретного подтипа, является важным этапом оценки качества.

Интерферон бета-1а - гликозилированный белок, идентичный эндогенному интерферону бета человека. Технологическая основа его производства - использование в качестве исходной клеточной линии клеток эукариот (СНО - *Chinese hamster ovary*), обеспечивающих посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка максимально приближенную к эндогенному белку [115,344].

Интерферон бета-1b является негликозилированным белком, молекула которого, в отличие от молекулы интерферона бета-1а, не содержит M_1 и имеет замену C_{16} на S_{16} . Для производства используют трансфицированные клетки прокариот (*Escherichia coli*) [50,53].

Международные требования к оценке качества субстанций рекомбинантного интерферона бета изложены в монографии Европейской фармакопеи *Interferon beta-1a Concentrated Solution* 01/2009:1639 [115]. Требования включают подтверждение подлинности аминокислотной последовательности (метод пептидного картирования) и распределения гликоформ (метод ВЭЖХ-МС). В качестве образца сравнения указан образец rIFN-beta1a CRS (Y0001101) [120]. Кроме того, предусмотрен молекулярно-массовый анализ содержания димеров и родственных веществ с большей молекулярной массой (специфические примеси) методом электрофореза в ПААГ и количественное определение целевого белка. Одновременно, в ходе пептидного картирования, оценивают окисленные формы rIFN-beta1a в сравнении с окисленным rIFN-beta1a CRS по аминокислотным остаткам в положении 34-45.

Все вышеуказанные требования ЕФ - физико-химические показатели качества и методы их подтверждения были учтены при разработке отечественных гармонизированных фармакопейных требований к качеству препаратов rIFN-beta1a.

Отечественное производство рекомбинантного интерферона бета представлено двумя производителями и ориентировано на использование продуцентов прокариот. Таким образом отечественный интерферон бета- это негликозилированный rIFN-beta1b. Международные и отечественные требования к оценке качества данного белка, на момент выполнения настоящего исследования, отсутствовали, а требования ЕФ к rIFN-beta1a не применимы в силу значительных структурных отличий этих белков. Например, методика пептидного картирования непригодна в связи с условиями ферментативного гидролиза при щелочных значениях pH. В данных условиях rIFN-beta1b, менее стабильный из-за отсутствия углеводной части, образует осадок [220]. Требования к распределению гликоформ неприменимы, а использование образца rIFN-beta1a CRS в качестве образца сравнения при оценке подлинности методом пептидного картирования и чистоты методом электрофореза в ПААГ не корректно из-за структурных различий данных белков, в том числе существенной разницы молекулярных масс.

Кроме того, технологические подходы к обеспечению стабильности готовой лекарственной формы rIFN-beta1b у разных производителей отличаются: в одном случае это добавление стабилизатора ЧСА, в другом - смещение значений pH с 7,0 до 4,0 [50,53].

Таким образом, совершенствование методологии оценки подлинности структуры рекомбинантных интерферонов заключалось в разработке гармонизированных фармакопейных требований с учетом вышеуказанных особенностей (Таблица 1).

2.2 Особенности оценки подлинности структуры рекомбинантных факторов свертывания крови

Отличительной особенностью препаратов РФСК является структурное разнообразие молекул активного белка. Это обусловлено постоянным поиском технологий, позволяющих снизить индукцию ингибиторных антител и обеспечить

Таблица 1 - Результаты разработки гармонизированных фармакопейных требований к оценке подлинности первичной структуры рекомбинантных интерферонов альфа и бета

№ п/п	Результат	Документ, содержащий разработанные требования/Уровень внедрения
1.	Требование: 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.	1.ОФС.1.7.1.0012.18 «Интерфероны», XIV издание Государственной фармакопеи РФ/Федеральный.
2.	Требование: приведено указание на необходимость подтверждения подлинности rIFN-beta1b методом пептидного картирования, предусматривающим пригодные условия ферментативного гидролиза.	2.Научно-методические рекомендации «Руководство по экспертизе ЛС», Глава 8 - «Разработка биоаналогичных (биоподобных) препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции интерферон бета» и Глава 9 - «Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции интерферон альфа»/Отраслевой.
3.	Требование: 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).	
4.	Требование: Приведено описанием 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.	

пролонгацию терапевтического эффекта в результате повышения порога инактивации [84,103,183,204,222,284,360]. Данный эффект достигается путем направленной трансформации молекулы при условии сохранения целевой активности. Подробно структурные особенности рекомбинантных факторов свертывания крови рассмотрены в Главе 1 настоящего исследования.

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 рекомбинантными белками, структура которых идентична соответствующим эндогенным 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 международное непатентованное наименование (МНН). Так, например, зарегистрированные в Российской Федерации РФСК представлены следующими МНН: rFVIIa - «Эптаког альфа»²; rFVIIIa - «Октоког альфа»², «Мороктоког альфа»², «Симоктоког альфа»², «Туроктоког альфа», «Эфмороктоког альфа»², «Руриоктоког альфа пегол»; rFIXa - «Нонаког альфа»², из них отечественные препараты представлены белками «Эптаког альфа»,

²Входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения

«Мороктоког альфа», «Нонаког альфа» [7,47]. В то же время, на момент выполнения работы отечественные фармакопейные требования к качеству РФСК отсутствовали, а терминология и классификация данных препаратов не была систематизирована.

При разработке общих фармакопейных требований к РФСК руководствовались международными фармакопейными требованиями, представленными в ЕФ в виде следующих монографий:

1. «Human coagulation factor VIIa (rDNA) Concentrated solution» 01/2015:2534, предназначенная для rFVIIa, имеющего МНН Эптаког альфа. В монографии приведен перечень обязательных к оценке показателей качества, нормы и методики. В качестве основных физико-химическими показателями качества (подлинности и чистоты) указаны: пептидное картирование; анализ гликанов; продукты деградации тяжелой цепи и окисленные формы; молекулы, не содержащие Gla-домен; димеры и высокомолекулярные структуры; неактивированные молекулы. В качестве стандартного образца сравнения для оценки физико-химических показателей качества указан образец Human coagulation factor VIIa (rDNA) CRS (Y0001663) [112].

Подходы к оценке чистоты Эптакога альфа обусловлены особенностями его молекулы, которые заключаются в характерной деградации по аминокислотным остаткам в позициях 290-291 и 315-316, а также профилю окисления по остаткам метионина 298 и 306. Получаемые в результате данных трансформаций молекулы являются родственными примесями, снижающими специфическую активность. Также к родственным примесям можно отнести образование в процессе хранения димерных, олигомерных и полимерных белковых структур. Количественная оценка молекул, содержащих Gla-домен обусловлена тем, что эта структурная особенность фактора VII отвечает за его активность. При этом известно, что формирование Gla-домена происходит за счет посттрансляционной модификации, включающей витамин К - зависимое карбоксилирование, приводящее к

образованию десяти остатков γ -карбокситглютаминовой кислоты на N-концевом участке молекулы, а значит не может быть проконтролировано на этапе оценки генетической стабильности штамма-продуцента [52,215,254,383].

Здесь следует отметить, что профиль гликозилирования рекомбинантных белков также может зависеть от используемого штамма-продуцента и различий технологий культивирования [75,76]. Таким образом, возможность применения вышеуказанного стандартного образца для контроля профиля гликозилирования белков РФСК, полученных разными производителями, требует оценки. Данная особенность в монографии не учтена.

2. «Human coagulation factor VIII (rDNA) Concentrated solution» 01/2008:1643, предназначенная для rFVIII, имеющих МНН Октоког альфа и Мороктоког альфа. В монографии приведен перечень обязательных показателей качества: оценки состава белка (рекомендованы методы пептидного картирования, вестерн-блоттинга, ВЭЖХ, гель-электрофореза, капиллярного электрофореза масс-спектрометрии и др.); показателей, характеризующих молекулярную массу и структуру белка - распределение молекул по размерам и контроль моносахаридов и степень сиалирования или олигосахаридный профиль [113]. Конкретные методики, нормы и международные стандартные образцы (CRS EDQM) не представлены. Таким образом, индивидуальные особенности каждой модификации в данном документе не отражены, а в качестве образца сравнения рекомендовано использования стандартного образца предприятия.

3. «Human coagulation factor IX (rDNA) concentrated solution» 01/2015:2522, предназначенная для rFIXa, имеющего МНН Нонаког альфа, а также «Human coagulation factor IX (rDNA) powder for solution for injection» 01/2021:2994. В монографиях приведен перечень обязательных к оценке показателей качества, нормы и методики. В качестве основных физико-химическими показателями качества (подлинности и чистоты) указаны: пептидное картирование³; анализ

³Данные показатели указаны только в монографии 01/2015:2522.

гликанов³; установлен лимит содержания гамма-карбоксихлутаминовой кислоты³, родственных белков и не идентифицированных примесей; примеси с молекулярной массой, отличной от массы стандартного образца (электрофорез в ПААГ) и превышающей эту массу (ВЭЖХ); неактивированные молекулы³. В качестве стандартного образца сравнения для оценки физико-химических показателей качества указан образец Human coagulation factor IXa (rDNA) CRS EDQM [111].

Для данной молекулы характерно наличие сложных посттрансляционных модификаций, из которых критичными для обеспечения активности являются: гамма-карбоксихлутаминование 12 N-концевых N-концевых остатков глутаминовой кислоты с образованием N-концевого Gla-домена и N-связанное гликозилирование. Известно, что причиной наличия незрелых форм данного белка может быть сверхэкспрессия, приводящая к получению продукта со специфической активностью, в несколько раз ниже по сравнению с активностью белка, выделенного из плазмы крови человека [183,201,204,284,312].

Таким образом, при формировании общих для РФСК фармакопейных требований было учтено, что помимо основных показателей качества, предусмотренных фармакопейными требованиями к терапевтическим белкам, полученным с применением технологии рекомбинантной ДНК [37] и парентеральной формы выпуска [43], оценка чистоты белка РФСК должна предусматривать его структурные особенности, заключающиеся в оценке родственных примесей, потенциально снижающих активность: наличие характерных окисленных и/или деградированных форм; способность образования димерных, олигомерных и полимерных белковых структур в процессе хранения; для активированных форм - количество не активированного белка; наличие молекул с несформированным доменом, отвечающим за активность. Кроме того, необходима оценка профиля гликозилирования и (для биоподобных белков) сравнительный анализ профиля гликозилирования с оригинальным препаратом

или международным стандартным образцом, а также оценка стабильности данного профиля [75,76,145].

В результате выполненного исследования были систематизированы сведения по данной группе препаратов - установлено определение и классификация РФСК, а также обоснованы и сформулированы фармакопейные требования к оценке подлинности структуры РФСК (Таблица 2).

2.3 Особенности оценки подлинности структуры и чистоты PEG-модифицированных белков

Широкое применение препаратов на основе PEG-модифицированных белков объясняется преимуществом применения препаратов пролонгированного действия. В Российской Федерации зарегистрированы и имеют достаточно длительную практику применения препараты на основе PEG-модифицированных рекомбинантных интерферонов, фактора свертывания крови, эритропоэтинов, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГКСФ), моноклональных антител: четыре отечественных препарата (PEGинтерферон альфа-2b, цеPEGинтерферон альфа-2b, эмPEGфилграстим и PEGфилграстим) и десять зарубежных (PEGинтерферон альфа-2a, PEGинтерферон альфа-2b (2 производителя), PEGинтерферон бета-1a, PEGфилграстим, липPEGфилграстим, метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета, церолизумабPEGол, PEGцетакоплан, руриоктоког альфа PEGол) [47].

Несмотря на несомненную востребованность данного типа препаратов, фармакопейные требования к оценке качества PEG-модифицированных белков не были представлены. В качестве источника регуляторных требований был рассмотрен краткий документ Руководства Европейского агентства по оценке лекарственных средств (EMA/CPMP/BWP/3068/03) [141].

Данные препараты имеют ряд отличительных характеристик, способных оказывать влияние на безопасность и эффективность готового продукта, что

Таблица 2 - Результаты систематизации и разработки гармонизированных фармакопейных требований к оценке подлинности структуры рекомбинантных факторов свертывания крови человека

№ п/п	Результат	Документ, содержащий разработанные требования/Уровень внедрения
1.	<p>Определение: «Препараты РФСК – представляют собой биотехнологические лекарственные препараты, полученные с применением технологии рекомбинантной ДНК и обладающие биологической активностью плазменного фактора свертывания крови соответствующего типа».</p>	<p>1.ОФС.1.8.1.0006.18 «Факторы свертывания крови (генноинженерные, рекомбинантные)», XIV издание Государственной фармакопеи РФ/Федеральный</p>
2.	<p>Классификация: «По характеру специфической активности РФСК возможно разделить на следующие группы:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 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». 	<p>2. ФС «Эптаког альфа [активированный] рекомбинантный фактор свертывания крови VIIa, субстанция-раствор», предназначена для включения в ГФ XV/Федеральный</p> <p>3. Научно-методические рекомендации «Руководство по экспертизе лекарственных препаратов крови», подраздел «Рекомбинантные факторы свёртывания крови»/Учреждение</p>
3.	<p>Требование: приведено указание на возможность наличия внутри одной группы РФСК с заданной активностью, белков различной структуры, имеющих различные МНН.</p>	
4.	<p>Требование: приведено указание на необходимость оценки подлинности аминокислотной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций в сравнении со стандартным образцом с установленной структурой, соответствующей заявленному МНН</p>	

Окончание таблицы 2	
5.	Требование: приведено указание на необходимость оценки возможности применения международного стандартного образца (при наличии) для оценки подлинности значимых посттрансляционных модификаций биоподобного препарата;
6.	Требование: приведено указание 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.
7.	Требование: приведено указание 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.

связано с особенностями строения PEG и химией процесса пегилирования [95,258,341,361]. Более подробно особенности строения молекулы PEG, процессов конъюгации и свойств целевого модифицированного белка рассмотрены в Главе 1 настоящего исследования.

Анализ научной периодики и регистрационных досье ЛП на основе PEG-модифицированных белков позволяет утверждать, что специфическая биологическая активность и стабильность PEG-модифицированного белка, его фармакодинамические и фармакокинетические свойства, а также безопасность применения зависят от следующих факторов: 1. Структура исходного очищенного рекомбинантного белка; 2. Структура исходного PEG; 3. Выбор пегилирующих агентов и сведения об их достаточной элиминации; 4. Общие особенности процесса PEG-модификации; 3. Структура целевого конъюгата [85,239,242,245,291,306,331,358,370,393, 394,427].

При разработке фармакопейных требований к препаратам на основе PEG-модифицированных рекомбинантных белков учитывали, что подлинность структуры исходного очищенного рекомбинантного белка должна быть подтверждена в соответствии с фармакопейными требованиями, гармонизированными с международными требованиями. В разработанном документе (проект ОФС) отражено, что если оценка белковой части молекулы на стадии конъюгата-субстанции или готового продукта невозможна и не может быть включена в спецификацию нормативной документации, сведения о соответствии исходного белка заявленной структуре должны быть представлены в регистрационном досье, включая информацию о методах исследования и первичных данных в виде хроматограмм, пептидных карт, масс-спектров и т.д.

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 [238,427]. Известно, что

предпочтительнее использование линейного PEG (монометоксиполиэтиленгликоль - mPEG) [248,421]. Поэтому характеристика исходного PEG, как и характеристика очищенного рекомбинантного белка, должна быть представлена в досье на препарат, а именно указаны молекулярная масса, полидисперсность, длина цепи и ее строение (линейное/разветвленное).

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 [245,306,331]. Таким образом, в регистрационном досье должны быть представлены 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 [85,96]. Поскольку в ходе конъюгации задействованы, как правило, высокотоксичные соединения, сведения об их достаточной элиминации должны быть также предоставлены в регистрационном досье в виде так называемых контрольных точек производственного процесса, с указанием методов очистки и контроля очищенного полупродукта с указанием допустимой остаточной концентрации или полного отсутствия нежелательных/недопустимых примесей.

К особенностям процесса PEG-модификации белка следует отнести получение смеси целевого конъюгата (моно-PEGилированного белка) и сопутствующих продуктов конъюгации (свободного/остаточного белка, свободного/остаточного PEG, поли-PEGилированного белка). Требования к содержанию пегилированного интерферона колеблются в диапазоне от 85% до 95%. При этом нормирование по содержанию ди- и моно-пегинтерферона, а также количественные требования к процентному содержанию позиционных изомеров носят единичный характер. Для

препаратов PEG-модифицированных рекомбинантных терапевтических белков, зарегистрированных в Российской Федерации, актуально требование к содержанию моно-PEGилированного белка «не менее 95%» [242]. Поскольку от свойств PEGилирующего агента зависит характер и локализация сайта конъюгации, моно-PEGилированные молекулы могут быть представлены так называемыми позиционными изомерами, где молекулы PEG связаны с целевыми аминокислотными остатками в разных позициях аминокислотной последовательности [239].

На основе проведенного анализа были сформулированы требования к спецификации нормативной документации на субстанцию очищенного PEG-модифицированного белка: спецификация должна содержать указание на норму содержания и методы оценки общего моно-пегилированного белка, степени модификации белка (среднего количества молекул PEG связанных с белком), свободного/остаточного белка, свободного/остаточного PEG, требования к позиционным изомерам (наличие, характер и процентное соотношение).

Итоговая структура молекулы целевого конъюгата имеет решающее значение в обеспечении эффективности лекарственного препарата. Помимо вышеперечисленных требований к оценке качества продукта важно наличие данных о стабильности и стандартности конформационной структуры, включая общий размер PEG-модифицированной молекулы, оценку полидисперсности в (случае наличия целевых поли-PEGилированных форм) и молярное отношение полимера к белку. Для оценки качества готового лекарственного препарата на основе PEG-модифицированного белка допускается сократить количество показателей, исключив определение остаточного PEG, содержание позиционных изомеров и пептидное картирование (если применимо), т.е. сократить номенклатуру показателей оценки качества готовой формы возможно за счет тех показателей, изменение которых не предполагается в процессе производства готовой формы, а также хранения препарата.

В связи с тем, что фармакопейные требования к качеству PEG-модифицированных рекомбинантных белков отсутствуют, на примере субстанций препаратов PEG-модифицированных интерферонов, одними из первых зарегистрированных в Российской Федерации, был проведен сравнительный анализ спецификаций нормативных документаций по показателям, характеризующим подлинность структуры и чистоту действующего вещества (Таблица 3). В результате была подтверждена необходимость унификации требований, поскольку единый подход к оценке подлинности и чистоты данных конъюгатов отсутствует в целом - по номенклатуре показателей и методам их оценки, по показателю «Остаточный PEG» (контролируются субстанции 3-х производителей и один производитель контролирует остаточный PEG на стадии производства, без внесения в спецификацию), по показателю «Позиционные изомеры» контролируются субстанции двух производителей.

Следует отметить особенность оценки подлинности структуры и чистоты PEG-модифицированных рекомбинантных белков: структурное разнообразие исходных рекомбинантных белков, типов PEG и процессов модификации не позволяет расценивать данную группу препаратов как структурно стандартизованный продукт. Для каждого PEG-модифицированного белка целесообразно использование индивидуальных валидированных методик оценки подлинности структуры и чистоты конъюгата, а также разработка и аттестация стандартного образца предприятия, сведения о котором должны быть представлены в регистрационном досье.

Таким образом, совершенствование методологии оценки подлинности структуры и чистоты PEG-модифицированных белков заключалось в разработке соответствующих фармакопейных требований к характеристике PEG-модифицированного белка и номенклатуре обязательных показателей качества субстанции и готового препарата (Таблица 4).

Таблица 3 - Оценка чистоты и подлинности субстанций ПЭГ-модифицированных интерферонов разных производителей

Показатель	№ субстанции	Метод испытания	Учет результатов
Подлинность	1	Иммуноблоттинг	Взаимодействие с иммуноглобулинами против INF-alfa2 человека
		Электрофорез в ПААГ в редуцирующих условиях с окраской геля раствором йода	Наличие на электрофореграмме одного пятна желто-коричневого цвета
	2	Электрофорез в ПААГ в редуцирующих условиях	Молекулярная масса основной полосы испытуемого раствора должна лежать в диапазоне от 34 до 48 кДа
	3	Изоэлектрофокусирование	Совпадение pI основных пиков в диапазоне от 5,7 до 6,1с внутренним стандартным образцом
		Электрофорез в ПААГ в редуцирующих условиях	Молекулярная масса основной полосы испытуемого раствора должна лежать в диапазоне от 34 до 48 кДа
	4	ОФ- ВЭЖХ	Совпадение пиков PEG INF с внутренним стандартным образцом
		Электрофорез в ПААГ в редуцирующих условиях с окраской геля раствором йода	Наличие на электрофореграмме одного пятна желто-коричневого цвета
5	ОФ-ВЭЖХ	Пептидное картирование Совпадение пептидных карт с внутренним стандартным образцом	
Содержание белка	1	ОФ- ВЭЖХ	Не менее 1,2 мг/мл
	2	Спектрофотометрический	От 0,80 до 1,20 мг/мл
	3	Эксклюзионная ВЭЖХ	Не менее 2,0 мг/мл
	4	Спектрофотометрический	1,0 – 2,0 мг/мл
	5	Спектрофотометрический	0,9 – 1,3 мг/мл

Продолжение таблицы 3			
Чистота	1	Электрофорез в ПААГ в редуцирующих и нередуцирующих условиях	PEGINF – не менее 95,0 % Любая единичная примесь – не более 4,0 % Сумма примесей неинтерфероновой природы не более 5,0 %
		ОФ-ВЭЖХ	PEGINF – не менее 95,0 % Любая единичная примесь – не более 4,0 % Сумма примесей неинтерфероновой природы не более 5,0 %
		Эксклюзионная ВЭЖХ	Остаточный PEG - не более 1 %
	2	Электрофорез в ПААГ в редуцирующих и нередуцирующих условиях	Сумма примесей неинтерфероновой природы – не более 3,5 %
		Эксклюзионная ВЭЖХ	Родственные соединения: Моно-PEGINF - не менее 85,0 %; Ди-PEGINF – не более 10,0 %; Свободный INF - не более 5,0 %; Сумма примесей неинтерфероновой природы - не более 1,0 %.
	3	Электрофорез в ПААГ в редуцирующих и нередуцирующих условиях	Сумма примесей неинтерфероновой природы не более 3,5 %
		ОФ - ВЭЖХ	Позиционные изомеры Группа 1: 6,0 % - 21,0 %; Группа 2: 41,0 % - 54,0 %; Группа 3: 11,0 % - 25,0 %; Группа 4: 3,0 % - 10,0 %; Группа 5: 7,0 % - 20,0 %; Группа 6: не более 2,5 %; Другие формы - не более 2,0 %

Окончание таблицы 3			
Чистота	3	Эксклюзионная ВЭЖХ	Родственные соединения: Моно-PEGINF - не менее 88,0 %; Ди-PEGINF - не более 10,0 %; Свободный INF - не более 3,0 %; Сумма примесей неинтерфероновой природы - не более 1,0 %.
		ОФ- ВЭЖХ	Остаточный ПЭГ - не более 7,5 %
	4	ОФ-ВЭЖХ	Родственные соединения: Моно-PEGINF - не менее 97,0 %; Олиго-PEGINF - не более 3,0 %; Все остальные минорные формы - не более 3,0 %; Свободный INF не более 0,5 %
		Эксклюзионная ВЭЖХ	Остаточный ПЭГ - не более не более 1%
		Ионообменная ВЭЖХ	Позиционные изомеры: Группа 1: 11 % - 24 % Группа 2: 19 % - 24 % Группа 3: 17 % - 20 % Группа 4: 34 % - 40 % Другие формы: не более 10 %
	5	ОФ-ВЭЖХ	Окисленный INF не более 4,8 %
		Эксклюзионная ВЭЖХ	Высокомолекулярные примеси не более 4,5 %
		ОФ- ВЭЖХ	Моно-PEGINF - не менее 96,0 %; Свободный INF не более 0,6 %
		Ионообменная ВЭЖХ	Карбогидратный анализ: Биантеннарное сиалирование - не менее 91 %

Таблица 4 - Требования к характеристике PEG-модифицированного белка и номенклатуре обязательных показателей качества субстанции и лекарственного препарата

№ п/п	Результат	Документ/Уровень внедрения
1.	Требование: 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)	<p>1. ОФС «Пегилированные (конъюгированные) терапевтические белки, полученные с применением технологии рекомбинантной ДНК», предназначена для включения в XV издание Государственной фармакопеи РФ/Федеральный</p> <p>2. Научно-методические рекомендации «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-</p>
2.	Требование: Должны быть указаны и охарактеризованы все побочные продукты производства и остаточные количества веществ, применяемых в процессе производства (примеси), а также способы очистки конъюгата	
3.	Требование: 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).	
4.	Требование: 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.).	
5.	Требование: 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.	
6.	Требование: 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».	

Окончание таблицы 4

7.	Требование: 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 PEG, свободного белка, агрегированных молекул конъюгата, возможных продуктов деградации.	модифицированных рекомбинантных интерферонов»/Учреждение
----	--	--

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

Пептидное картирование с последующим УФ-ВЭЖХ анализом продуктов ферментативного гидролиза и ВЭЖХ с использованием флуоресцентного детектора на сегодняшний день остаются наиболее востребованными методическими подходами к оценке подлинности аминокислотной последовательности и профиля гликанов (соответственно) при посерийной оценке качества белков, полученных с применением технологии рекомбинантной ДНК. Кроме того, оценка чистоты данных белков с применением методов ВЭЖХ, изофокусирования и электрофореза в ПААГ также предполагает использование стандартного образца сравнения [107,110]. Подобное предпочтение, на фоне возможностей ВЭЖХ-МС, обусловлено тем, что вышеуказанные традиционные подходы являются фармакопейными, требуют наличия менее дорогостоящего оборудования и более доступны в плане эксплуатационных расходов и наличия квалифицированных специалистов.

Таким образом, основная проблема оценки подлинности структуры и чистоты терапевтических рекомбинантных белков заключается, прежде всего, в необходимости использовании стандартного образца сравнения, аттестованного в соответствии с процедурой, которая, с одной стороны, отвечает отечественным и международным регуляторным документам, а с другой - обеспечивает достоверность результатов оценки подлинности и чистоты конкретного рекомбинантного белка с учетом его терапевтически значимых структурных особенностей. Даже при наличии международного стандартного образца (как правило для лекарственных препаратов или субстанций, имеющих длительную практику применения), может быть необходимо наличие стандартного образца предприятия или фармакопейного (национального) стандартного образца, что связано с высокой вероятностью отличий посттрансляционных модификаций или

с необходимостью обеспечения независимости российского фармацевтического рынка [5,6,8,75,139,145].

Требования к разработке, аттестации и применению биологических стандартных образцов изложены в Руководствах ВОЗ, документах ЕМЕА и ICH, а также документах ЕАЭС и ГФ РФ, разработанных по принципу гармонизации [33,45,46,59,61-64,122,123,125-127,128-131,135,138,139,147,144].

Метрологические требования к стандартным изложены в документах ISO и ГОСТ [19,25-27,29,30,152-156], а также в ГФ РФ и ЕФ [33,46,119,121].

Данные регуляторные документы содержат общие требования к предоставлению информации об используемом стандартном образце и процедуре его характеристики. Стандартные образцы, предназначенные для оценки подлинности структуры и чистоты белков, полученных с применением технологии рекомбинантной ДНК, являются частным случаем и требования к ним не регламентируются отдельно. Таким образом, характер информации и полнота сведений об аттестации используемого стандартного образца остаются на усмотрение производителя, что может осложнять экспертную оценки сведений, представленных в регистрационном досье, а также лабораторную фармацевтическую экспертизу с применением стандартного образца предприятия.

С целью систематизации разработки и аттестации, а также структурирования сведений о стандартных образцах, предназначенных для подтверждения подлинности структуры молекулы рекомбинантных терапевтических белков, представляемых в регистрационном досье, 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. Предполагаемый формат каждого этапа должен учитывать структурные особенности конкретного белка и его состава (стабилизаторы, концентрация, первичная упаковка и т. д.) и назначения СО (оценка первичной структуры, посттрансляционных модификаций, характеристика направленно модифицированной молекулы).

Первый этап предполагает выбор кандидата в стандартный образец, обоснование его статуса и определение области применения. В качестве кандидата в СО обычно рассматривают активную фармацевтическую субстанцию или очищенный белок на стадии до добавления вспомогательных веществ, которые неспецифически влияют на результат исследования. Здесь же целесообразно рассмотрение необходимости изменения состава и обоснование формы выпуска кандидата в стандартный образец.

Далее для кандидата в стандартный образец должна быть разработана спецификация, отражающая в полной мере качество кандидата с учетом предполагаемой области его применения. В качестве базовой в данном случае возможно рассматривать действующую спецификацию производителя на субстанцию с учетом возможных изменений формы выпуска и состава предполагаемого СО (концентрации белка, наличие/отсутствие стабилизаторов, объем розлива, форма выпуска и т.д). При изменении состава и формы выпуска следует руководствоваться областью применения СО. Так, например, целесообразно предусмотреть минимальную концентрацию белка, достаточную для проведения испытаний на подлинность и чистоту; изменить розлив большого объема с последующим замораживанием на ампулирование с последующим лиофильным высушиванием; исключить использование стабилизаторов, мешающих испытаниям и т.д.

При формировании спецификации на СО, в качестве ключевого показателя качества, необходимо рассматривать оценку подлинности структуры молекулы белка, предполагающую максимально полную верификацию аминокислотной

последовательности (не менее 95%) и значимых посттрансляционных модификаций, предпочтительно методом MS-анализа. Данный подход, как правило, отсутствует в спецификации на субстанцию. Кроме того, возможно исключение ряда показателей с учетом области назначения продукта (не является препаратом вводимым людям).

Таким образом, первый этап включает:

- выбор кандидата, в качестве которого может рассматриваться субстанция, очищенный белок, балк или готовый лекарственный препарат;
- обоснование формы выпуска, где может быть изменен состав раствора кандидата, концентрация целевого белка, объем и физическое состояние раствора;
- разработку спецификации кандидата, где учтены все изменения формы выпуска и состава, предусмотрена расширенная верификация подлинности структуры, включая посттрансляционные и направленные модификации, заявленные на стадии разработки и доклинических исследований целевого белка;
- проведение испытаний полученного кандидата в СО согласно разработанной спецификации.

Второй этап предполагает непосредственно аттестацию стандартного образца. Поскольку аттестованная характеристика стандартного образца и методика, предназначенная для его использования представляют собой единый методический комплекс, аттестацию необходимо проводить с применением валидированной методики, предназначенной для включения в нормативную документацию на субстанцию и/или готовый продукт для рутинного контроля качества [45,64,72]. 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. В качестве обоснования выбора данных пиков следует рассматривать общие хроматографические критерии (стабильность выхода,

разрешение, симметричность и т.д.), а также результаты MS-анализа фракций, соответствующих данным пикам.

Аттестованная характеристика должна быть установлена с учетом предполагаемого статуса аттестуемого стандартного образца (фармакопейный стандартный образец или стандартный образец предприятия). Для фармакопейного стандартного образца необходимо предусмотреть возможность его применения на разных предприятиях, а именно оценить устойчивость (робастность) методики и аттестованной характеристики на разных моделях оборудования и хроматографических колонках, а также реактивах разных производителей. Здесь, при условии технической возможности точного следования условиям методики, могут быть аттестованы диапазоны времен удерживания, соответствующие характеристическим пикам, или, в качестве аттестованной характеристики, может быть установлена величина относительного стандартного отклонения времени удерживания для характеристических пиков стандартного и испытуемого образца.

Для стандартных образцов предприятия достаточно получения диапазона значений времени удерживания характеристических пиков в условиях промежуточной прецизионности (внутрилабораторной воспроизводимости) и оценки принципиального совпадения хроматографических профилей.

Третий этап заключается в изучении стабильности аттестованной характеристики стандартного образца для определения его срока годности. Здесь может быть рекомендован мониторинг стабильности пептидных/гликановых карт в режиме реального времени с обоснованной периодичностью [30,35,64,131,135].

Четвертый этап заключается в разработке сопроводительной документации - паспорта на СО, инструкции по его применению и требований к оформлению в виде макета упаковки.

Инструкция по применению должна содержать методику применения СО, с описанием возможных критичных позиций (реагенты, расходные материалы,

особенности процедуры, установленные в процессе оценки валидационных характеристик методики). В целом формат документации должен соответствовать действующим регуляторно-нормативным документам [64,131,135].

Таким образом, разработаны требования к процедуре разработки и аттестации стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных белков. Требования систематизированы в виде универсального алгоритма, состоящего из четырех этапов, и изложены в Научно-методических рекомендациях из серии Руководств ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ - «Требования к стандартным образцам в досье на биологические лекарственные средства».

Резюме

В результате анализа международных и отечественных фармакопейных требований, а также анализа регистрационных досье соответствующих препаратов и научной литературы, были разработаны общие гармонизированные требования к оценке подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных интерферонов альфа и бета, рекомбинантных факторов свертывания крови и PEG-модифицированных рекомбинантных белков, а также систематизированы требования к разработке и аттестации стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности их структуры.

Для препаратов интерферонов альфа и бета сформулированы общие гармонизированные фармакопейные требования к оценке физико-химических показателей, перечислены показатели качества, обязательные к включению в спецификацию. Также, наряду с гармонизированными требованиями, отражена специфика отечественных препаратов - показана необходимость:

- использования стандартного образца сравнения для rIFN-alfa2b (Met), производимого на двух отечественных предприятиях;

- целесообразность использования (в прослеживаемости к образцу CRS EDQM) стандартного образца сравнения для rIFN-alfa2b (no-Met), производимой на пяти отечественных предприятиях, с целью выполнения программы импортзамещения;

- использования индивидуальной методики пептидного картирования и аттестации стандартного образца сравнения rIFN-beta1b, производимого на двух отечественных предприятиях.

Дано определение рекомбинантного фактора свертывания крови (РФСК); отражена основная тенденция создания РФСК – получение молекул, структуры которых отличны от структуры молекулы ФСК, выделенных из плазмы, с целью снижения индукции ингибирующих антител; перечислены актуальные на сегодняшний день международные непатентованные наименования rFVIIa, rFVIII, rFIXa; показана целесообразность использования (в прослеживаемости к образцу CRS EDQM) стандартного образца сравнения для методов пептидного и гликанового картирования.

Разработанные требования были использованы при формировании ОФС «Интерфероны» и ОФС «Факторы свертывания крови человека (генно-инженерные, рекомбинантные)», вошедшие в XIV издание Государственной фармакопеи РФ.

При разработке требований к оценке подлинности и чистоты препаратов на основе PEG-модифицированных белков учитывали документ ЕМА, данные научной литературы и опыт регистрационной экспертизы препаратов данной группы. Требования к оценке исходных белка и PEG, а также полученного конъюгата на уровне субстанции и готового продукта, отражены в виде разработанного единого формата спецификации, устанавливающего перечень обязательных к оценке показателей качества. Данные требования использованы при формировании проекта ОФС «Пегилированные (конъюгированные) терапевтические белки, полученные с применением технологии рекомбинантной

ДНК", предназначенной для включения в XV издание Государственной фармакопеи РФ.

Разработанные требования изложены в Руководстве по экспертизе лекарственных препаратов крови (раздел «Рекомбинантные факторы свёртывания крови») и Руководстве 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») ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Систематизация требований к разработке и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков выполнена с учетом регуляторных и нормативных документов РФ, ЕМА и ИСН. Разработанные рекомендации, содержат единый порядок аттестации - алгоритм, состоящий из 4-х основных этапов, на основании которого возможна разработка индивидуальных программы аттестации СО для конкретного белка.

Использование разработанного алгоритма позволяет систематизировать процесс разработки СО и обеспечивает независимость аттестации фармакопейных стандартных образцов и/или стандартных образцов предприятий от наличия международных СО. Данные рекомендации изложены в Руководстве «Требования к стандартным образцам в досье на биологические лекарственные средства» ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

ГЛАВА 3. 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 момент выполнения настоящего исследования в Российской Федерации шло формирование нормативно-методической базы по разработке и аттестации СО для оценки качества биологических лекарственных средств [104]. При этом имеющиеся международные и отечественные нормативные документы, содержащие общие требования к процедуре аттестации СО лекарственных средств, принимали за основу с учетом специфики биологических лекарственных средств [12,13,17,18,29,153,156,131,152].

В ходе исследований, представленных в Главе 2, разработаны общие требования к разработке и аттестации СО, предназначенных для оценки подлинности рекомбинантных терапевтических белков на уровне аминокислотной последовательности и значимых посттрансляционных модификаций. Требования представлены в виде алгоритма, состоящего из 4-х основных этапов. При этом программа аттестации СО каждого рекомбинантного белка должна быть разработана индивидуально с учетом его предполагаемого статуса, структурных особенностей исходного белка, технологии его получения (формы выпуска), наличия/отсутствия методик установления значений аттестованной характеристики и т.д. В качестве объектов исследования были выбраны имеющие достаточно длительную практику применения рекомбинантные терапевтические белки интерферон альфа-2b, интерферон бета-1би и фактор свертывания крови VIIa. При выборе объектов исследования руководствовались высокой востребованностью БЛП на основе данных белков и актуальностью аттестации отечественных СО, обеспечивающих технологическую независимость Российского биофармацевтического сегмента, а также существенными различиями структур для демонстрации индивидуальных

подходов к аттестации СО (количество полипептидных цепей в молекуле, наличие/отсутствие гликозилирования).

3.1 Оптимизация оценки подлинности рекомбинантных интерферонов альфа и бета на уровне аминокислотной последовательности

3.1.1 Стандартизация оценки аминокислотной последовательности рекомбинантных интерферонов альфа-2b, содержащих и не содержащих N-концевой метионин

Интерфероны альфа-2b представлены на рынке широкой линейкой различных парентеральных и ректальных форм ЛС (растворы и лиофилизаты для инъекций, мази, гели, спреи, капли, суппозитории) в зависимости от назначения [47]. В соответствии с формой выпуска меняется состав вспомогательных веществ и дозировка действующего вещества - rIFN-alfa2b (содержащих и не содержащих N-Met). Зачастую вспомогательные вещества мешают полноценной оценке структуры действующего вещества на стадии готовой формы, в связи с чем данная оценка предусмотрена для очищенного рекомбинантного белка (субстанции или продукта, отобранного на стадии до добавления мешающих веществ).

В Российской Федерации зарегистрированы субстанции rIFN-alfa2b содержащие N-Met (2 производителя) и не содержащие N-Met (5 производителей) [47]. Номенклатура показателей качества INF альфа-2b, указанная в монографии ЕФ 07/2015:1110 [114], поддерживается всеми отечественными производителями, при этом методическое обеспечение их оценки может быть индивидуальным. Однако rIFN-alfa2b (Met) не обеспечен СО для пептидного картирования, поскольку образец CRS, указанный в монографии 07/2015:1110, представляет собой форму no-Met.

Таким образом, оптимизация оценки качества препаратов на основе rIFN-alfa2b (Met) заключалась в разработке и аттестации СО, предназначенного для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности молекулы

интерферона методом пептидного картирования на уровне субстанции. Поскольку в отечественное биофармацевтическое производство представлено более чем одним производителем, принято решение о целесообразности аттестации СО образца, имеющего статус отраслевого (фармакопейного).

Разработка и аттестация ФСО для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности rIFN-alfa2b (Met)

В качестве кандидата в ФСО, была выбрана субстанция ООО "Фармапарк". Здесь следует отметить, что субстанции обоих производителей соответствовали заявленному качеству и требованиям ЕФ по номенклатуре показателей. Выбранная субстанция по показателю "Подлинность" оценивалась несколькими методами, что обеспечивало большую информативность. Область применения данного образца предполагает использование методики пептидного картирования согласно монографии 07/2015:1110 [114].

Для удобства применения, предполагаемого ФСО была подобрана форма выпуска: исходная концентрация белка в субстанции снижена до 1 мг/мл, а объем розлива уменьшен до 0,5 мл, для чего использованы полипропиленовые криопробирки вместимостью 1 мл. Для оценки качества кандидата в ФСО, на основе спецификации производителя на субстанцию, была разработана спецификация со следующими изменениями: исключен показатель «Вирусная безопасность», т.к. образец не является лекарственным средством; изменены требования к содержанию белка и к упаковке/маркировке флаконов; раздел «Подлинность» дополнен требованием к оценке качества путем верификации аминокислотной последовательности относительно известной [114], включая подтверждение наличия N-Met и дисульфидных связей C₂₋₉₉ и C₃₀₋₁₃₉. Для верификации использовали метод масс-спектрометрии высокого разрешения ВЭЖХ/МС/МС с ионизацией электрораспылением (ESI) и вторичной ионизацией, инициируемой соударениями (CID). Образец предварительно подвергли

мультиферментному гидролизу с применением ферментов эндопротеаза Asp-N, пепсин, эндопротеаза Glu-C, эндопротеаза Lys-C, иммобилизованный трипсин.

В результате проведенных исследований, с вероятностью 98%, была верифицирована аминокислотная последовательность кандидата в ФСО rIFN-alfa2b (Met), возможные модификации и мутации не превышали 1% (Рисунок 4).



Рисунок 4 - Верификация аминокислотной последовательности кандидата ФСО rIFN-alfa2b (Met) (мультиферментный протеолиз) методом ВЭЖХ/МС/МС.

Также, в результате поиска и идентификации пептидов с дисульфидными связями, были выявлены следующие пептиды:

1. Дисульфидный пептид 1 [MCDLPQTHSLGSR]-[ACVIQGVGVTE], состоящий из двух пептидов 1-13 и 98-108, соединенных дисульфидной связью между 2 и 99 цистеинами белковой цепи.

2. Дисульфидный пептид 2 [ISLFSCLK]-[YSPCAWEVVR], состоящий из двух пептидов 25-32 и 136-145, соединенных дисульфидной связью между 30 и 139 цистеинами белковой цепи (Рисунки 5,6).

Присутствие указанных пептидов позволяет сделать вывод о наличии двух дисульфидных связей между цистеинами 2-99 и 30-139 белковой цепи образца.

Таким образом, реализация первого этапа аттестации ФСО rIFN-alfa2b (Met) позволила получить кандидат в ФСО с верифицированной аминокислотной последовательностью, имеющий удобную для применения форму выпуска.

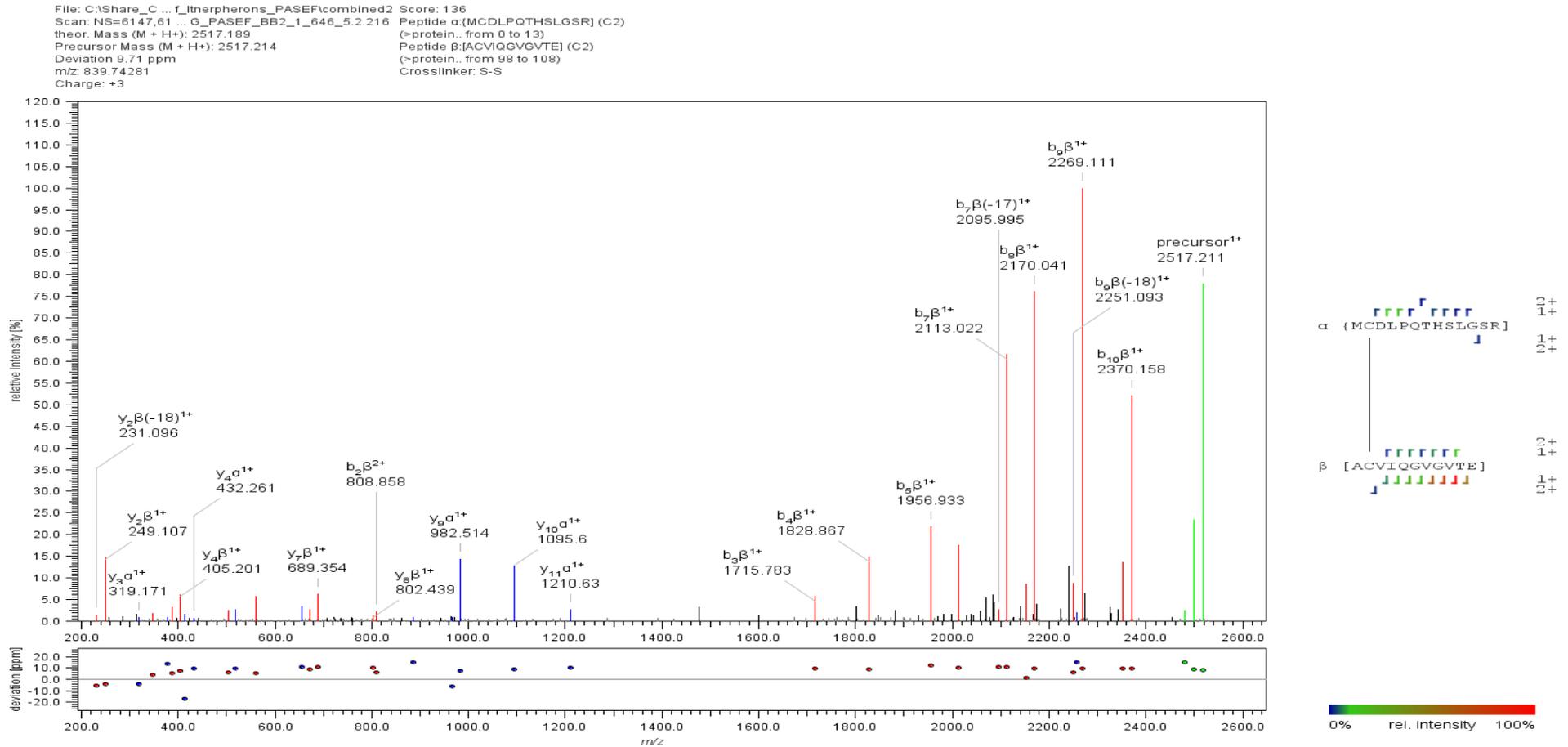


Рисунок 5 - Спектр фрагментации пептидов, полученных в результате мультиферментного протеолиза rIFN- α 2b(Met), содержащих дисульфидную связью C₂₋₉₉

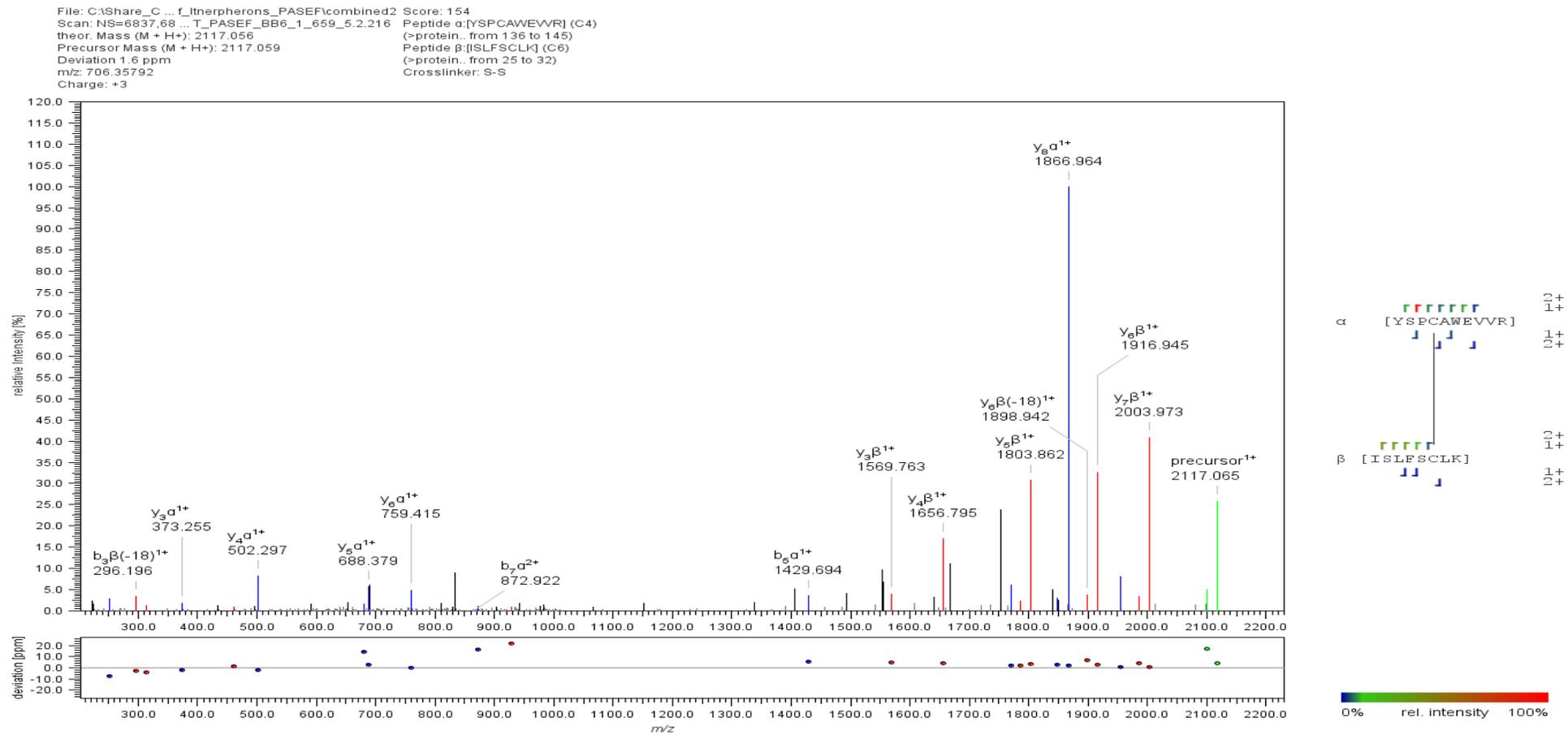


Рисунок 6 - Спектр фрагментации пептидов, полученных в результате мультиферментного протеолиза rIFN- α 2b(Met), содержащих дисульфидную связь C₃₀-139

Методика пептидного картирования, изложенная в монографии ЕФ 07/2015:1110 (фармакопейная методика, выбранная для аттестации), основана на использовании метода ОФ-ВЭЖХ с УФ-детектированием продуктов трипсинолиза. Известно, что трипсин специфически катализирует гидролиз связей, образованных карбоксильными группами лизина и аргинина. При этом полнота и специфичность гидролиза могут зависеть от активности и чистоты фермента, наличия химоотрипсина (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 [77].

Для обеспечения стандартизованных условий гидролиза изучили влияние активности трипсина на характер профиля и стабильность пептидной карты, используя трипсины с различной активностью и составом: около 3000 Ед/мг (3203); около 9000 Ед/мг (8868 и 9146); около 13000 Ед/мг без химоотрипсина (13165).

Пептидные карты, полученные с использованием трипсина с активностью около 3000 Ед/мг, содержали фрагменты негидролизованного белка в виде плохо разрешенных кластеров. Использование трипсина с активностью около 9000 Ед/мг позволило получить достаточно близкие профили, с возможностью установления основных характеристических пиков, объединенных в одну выборку. Трипсин с активностью около 13000 Ед/мг (очищенный от химоотрипсина) обеспечивал достаточно полный гидролиз, однако визуально профиль смещался относительно профиля карт, полученных с трипсином около 9000 Ед/мг за счет изменения интенсивности значимых и минорных пиков, а также их разрешения. Этот эффект не позволил включить результаты применения высоко активного трипсина в общую выборку.

На основании оценки пептидных карт, полученных с трипсином активностью около 9000 ЕД/мг (n=17), были выбраны и проанализированы 8 характеристических пиков (Рисунок 7, Таблица 5).

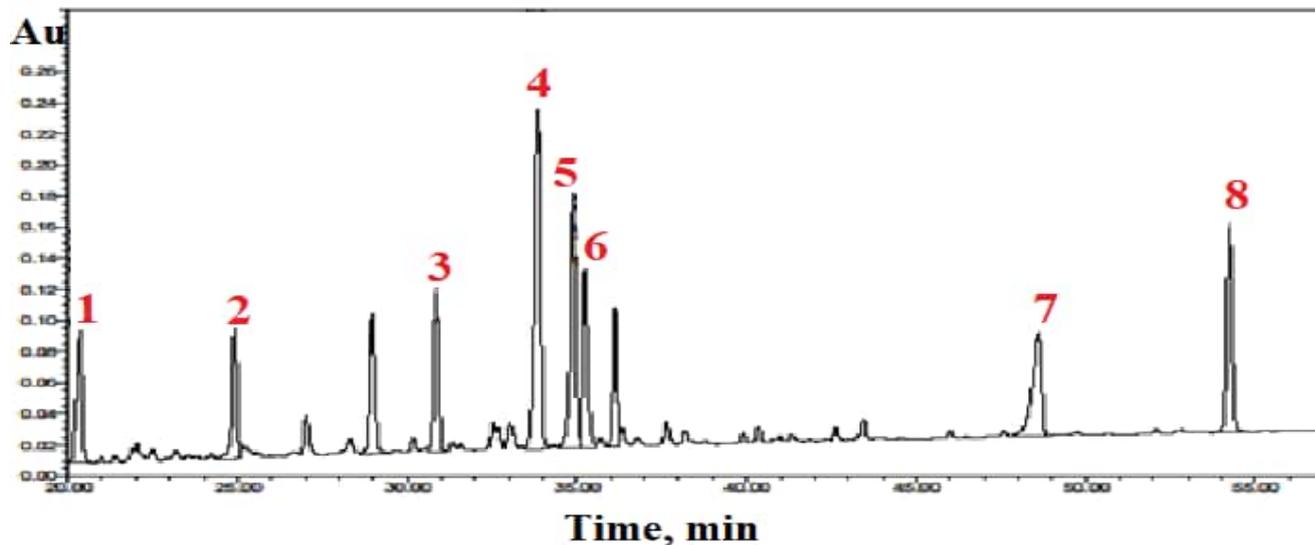


Рисунок 7 - Типичная пептидная карта rIFN-alfa2b (Met), полученная в результате ОФ-ВЭЖХ разделения и УФ-детектирования продуктов ферментативного гидролиза с применением трипсина с активностью около 9000 ЕД/мг

Таблица 5 - Параметры характеристических пиков (n=17)

№ пика	Среднее значение абсолютного времени удерживания, мин	Стандартное отклонение абсолютного времени удерживания, мин	Среднее значение площади пика
1	22,49	0,87	641856
2	26,91	0,78	755382
3	32,73	1,05	1036466
4	35,38	0,79	1698978
5	36,31	0,77	1155673
6	36,65	0,77	1162756
7	49,56	0,80	116102
8	54,82	0,85	1287807

На основании сочетания стабильности времени удерживания и интенсивности, основным выбран пик 4. Здесь следует отметить, что по значениям фактора асимметрии, числу теоретических тарелок и разрешению выборка не однородна. В качестве возможной причины можно предположить

неспецифический вклад химотрипсина. Далее характеристические пики были верифицированы относительно известной последовательности rINF-alfa2b. Фракции объемом около 200 мкл с содержанием пептидов около 0,5 - 1,0 мкг отбирали препаративно и исследовали методом масс-спектрометрического анализа. (Таблица 6, Рисунок 8).

Таблица 6 - Результаты верификации аминокислотной последовательности основных пептидов характеристических пиков кандидата в стандартный образец rINF-alfa2b (Met)

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

MCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAET
IPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVG
VTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTN
LQESLRSKE

Рисунок 8 - Верификация пептидов характеристических пиков⁴.

Как следует из Рисунка 8, характеристические пики презентируют более 50% участков молекулы INF альфа-2b, играющих ключевую роль в обеспечении специфической активности белка, а также N-концевую последовательность [295,372]. Общая степень покрытия известной последовательности, представленная основными пептидами характеристических пиков, составила 56%.

Аттестованная характеристика была представлена в виде диапазона времени удерживания каждого характеристического пика (абсолютного времени удерживания для пика 4 и относительного для остальных пиков), рассчитанного

⁴Зеленый цвет - пептиды, формирующие характеристические пики. Красный цвет - фрагменты аминокислотной последовательности, отвечающие за формирование участков, альфа-спиралей А, В и В₁, С, D, Е.

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 7) [104,33,34].

Таблица 7 – Аттестованная характеристика 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

В результате реализации данной программы аттестован первичный фармакопейный стандартный образец rINF-alfa2b(Met)- ФСО 3.2.00433. Разработана сопроводительная документация - паспорт, инструкция по применению, макет упаковки.

Стабильность ФСО 3.2.00433 исследовали в режиме реального времени по результатам оценки окисленных примесей по методике ЕФ 07/2015:1110 (требование - не более 5%). В течение 4-х лет содержание примесей возросло с 1,8% до 2,6%. Однако профиль пептидной карты, так же оцениваемый в режиме реального времени, утратил стабильность в течение 3-го года хранения: было зафиксировано смещение относительного время удерживания пиков 1,7 и 8 до значений 0,6; 1,44 и 1,61 соответственно, что не соответствовало аттестованному диапазону. Кроме того, изменился профиль пептидной карты в районе времен удерживания 20 - 22 мин и 25 - 28 мин (Рисунок 9). Таким образом, был установлен срок годности ФСО 3.2.00433 - 2 года.

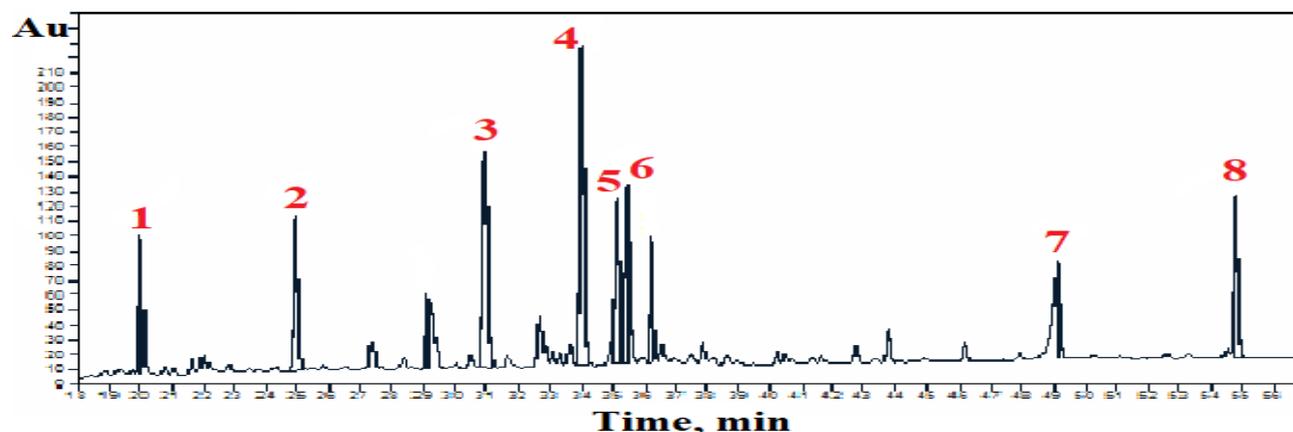


Рисунок 9 -Хроматографический профиль ФСО rINF-alfa2b (Met) 3-го года хранения

Разработка и аттестация ФСО для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности rINF-alfa2b (no-Met)

Необходимость разработки и аттестации СО для оценки подлинности rINF-alfa2b (no-Met) обусловлена сложностями коммерческой доступности международного образца CRS (EDQM, кат. № I0320301) - приостановка поставки и возросшая стоимость. Образец CRS, предназначенный для оценки подлинности методом пептидного картирования и использующийся для испытаний методами изофокусирования, электрофореза в ПААГ и методом ОФ ВЭЖХ (окисленные формы), традиционно применялся всеми отечественными производителями данной формы INF и был включен в соответствующие НД. Поскольку отечественное биофармацевтическое производство представлено более чем одним производителем (5 производителей), принято решение о целесообразности аттестации СО образца, имеющего статус фармакопейного.

В качестве кандидата в ФСО использовали субстанцию rINF-alfa2b (no-Met) производства ООО "Фирн-М". Для обеспечения удобства аттестации и применения предполагаемого ФСО в качестве образца сравнения для физико-химических показателей качества и для подтверждения биологической активности в культуре клеток (не рассматривается в данном исследовании) была изменена форма выпуска: концентрация белка снижена до 2,0 мг/мл и объем розлива уменьшен до 2,0 мл, для чего использованы флаконы из нейтрального стекла 1-го гидролитического класса формата 2R (ЕФ). Для оценки качества кандидата в ФСО, на основе спецификации производителя на субстанцию, была разработана спецификация со следующими изменениями: исключен показатель «Вирусная безопасность», т.к. образец не является лекарственным средством; изменены требования к содержанию белка и к упаковке/маркировке флаконов: раздел «Подлинность» дополнен требованием к оценке качества путем верификации аминокислотной последовательности относительно известной [114] (включая подтверждение отсутствия N-Met) и дисульфидных связей C₁₋₉₈ и C₂₉₋₁₃₈.

Для верификации использовали метод масс-спектрометрии высокого разрешения ВЭЖХ/МС/МС с ионизацией электрораспылением (ESI) и вторичной ионизацией, инициируемой соударениями (CID). Образец предварительно подвергли мультиферментному гидролизу с применением ферментов эндопротеаза Trypsin/Lys-СMix, эндопротеаза Lys-С, эндопротеаза Glu-С.

В результате проведенных исследований, с вероятностью 98%, была верифицирована аминокислотная последовательность кандидата в ФСО rIFN-alfa2b (no-Met) (Рисунок 10).

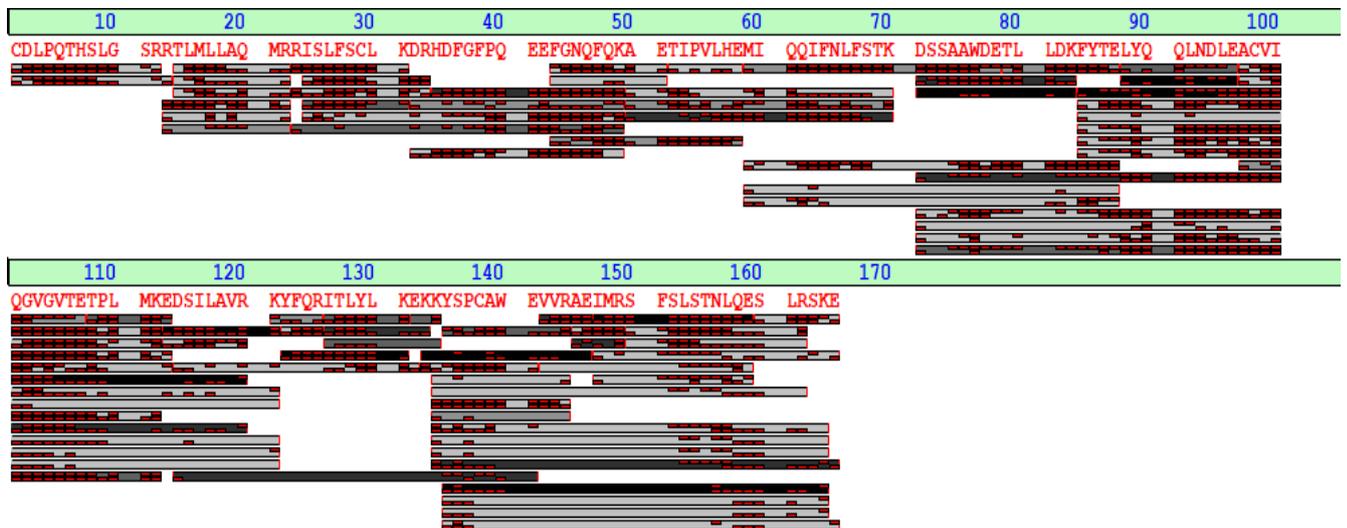


Рисунок 10 - Верификация аминокислотной последовательности rIFN-alfa2b (no-Met) (мультиферментный протеолиз) методом ВЭЖХ/МС/МС

Также, в результате поиска и идентификации пептидов с дисульфидными связями, были выявлены следующие пептиды:

1. Дисульфидный пептид 1 [CDLPQTHSLGSR]-[FYTELYQQQLNDLEACVIQGVGVTEPLMK], состоящий из двух пептидов 1-12 и 84-112, с дисульфидной связью между 1 и 98 цистеинами белковой цепи.

2. Дисульфидный пептид 2 [ISLFSCLK]-[YSPCAWEVVR], состоящий из двух пептидов 24-31 и 135-144, с дисульфидной связью между 29 и 138 цистеинами белковой цепи (Рисунки 11,12).

Присутствие указанных пептидов позволяет сделать вывод о наличии двух дисульфидных связей между цистеинами 1-98 и 29-138 белковой цепи образца.

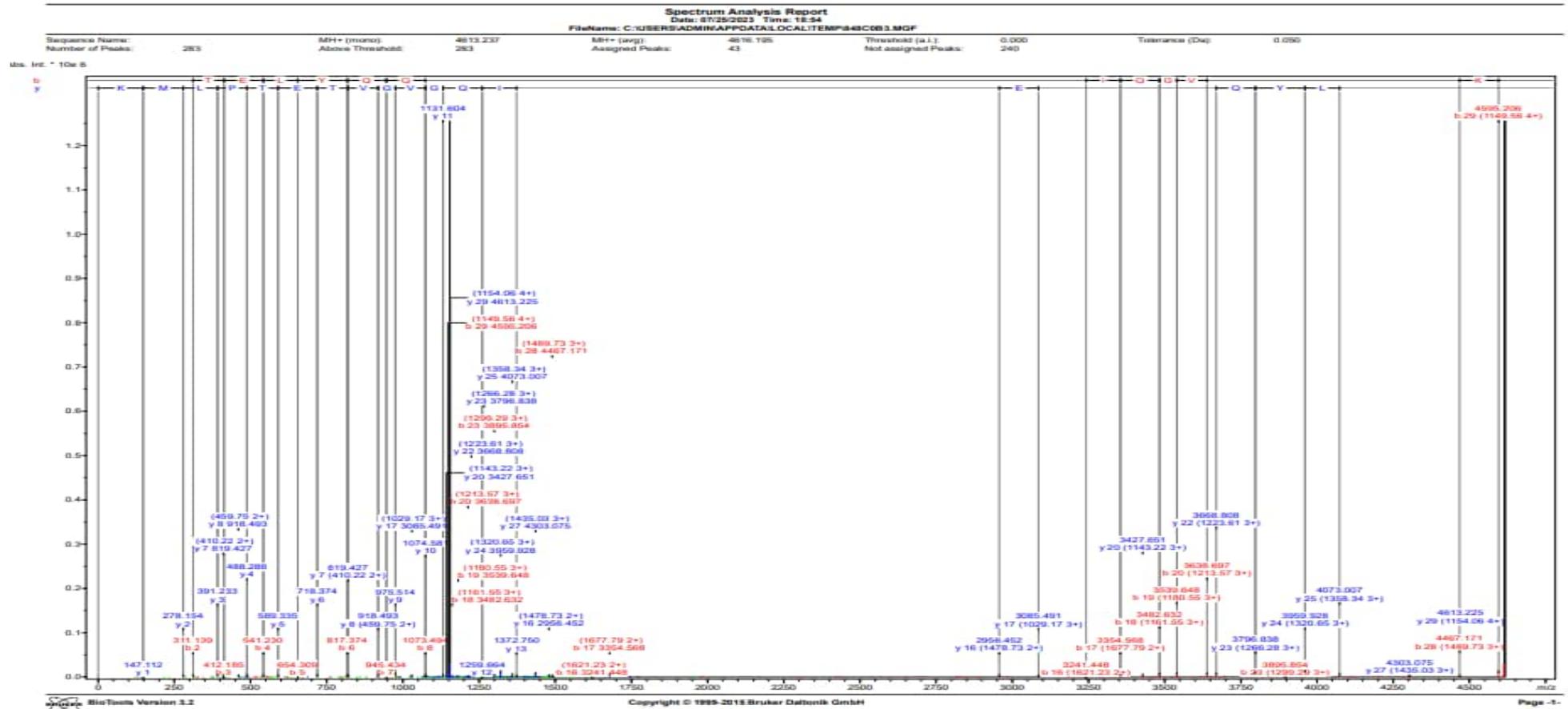


Рисунок 11 - Спектр фрагментации пептидов, полученных в результате мультиферментного протеолиза rIFN- α 2b (no-Met), дисульфидной связью C₁₋₉₈

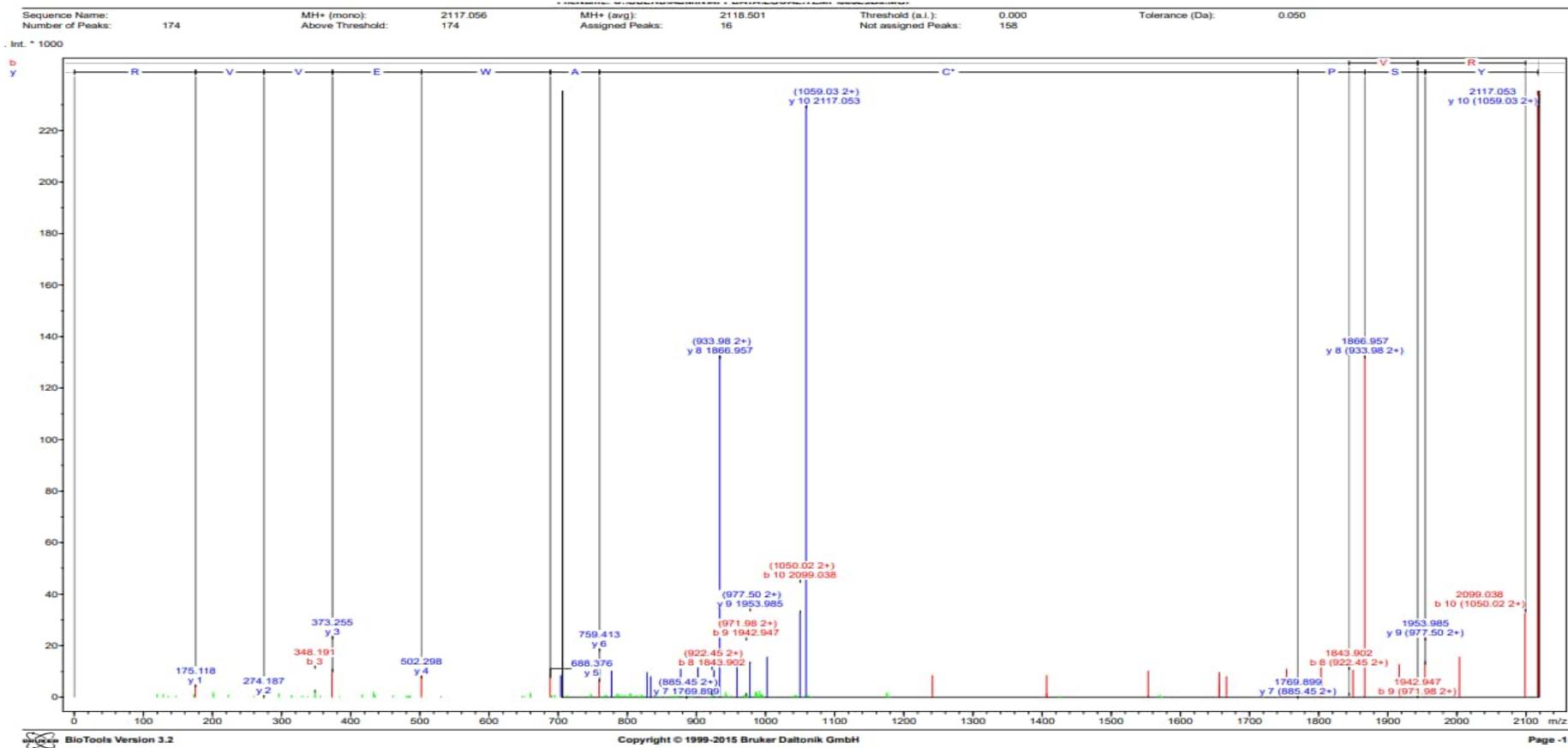


Рисунок 12 - Спектр фрагментации пептидов, полученных в результате мультиферментного протеолиза rIFN- α 2b (no-Met), с дисульфидной связью C₂₉-138

Возможные модификации и мутации в молекуле кандидата в ФСО rIFN- α 2b (no-Met) определяли путем исследования моноизотопной массы (Рисунок 13).

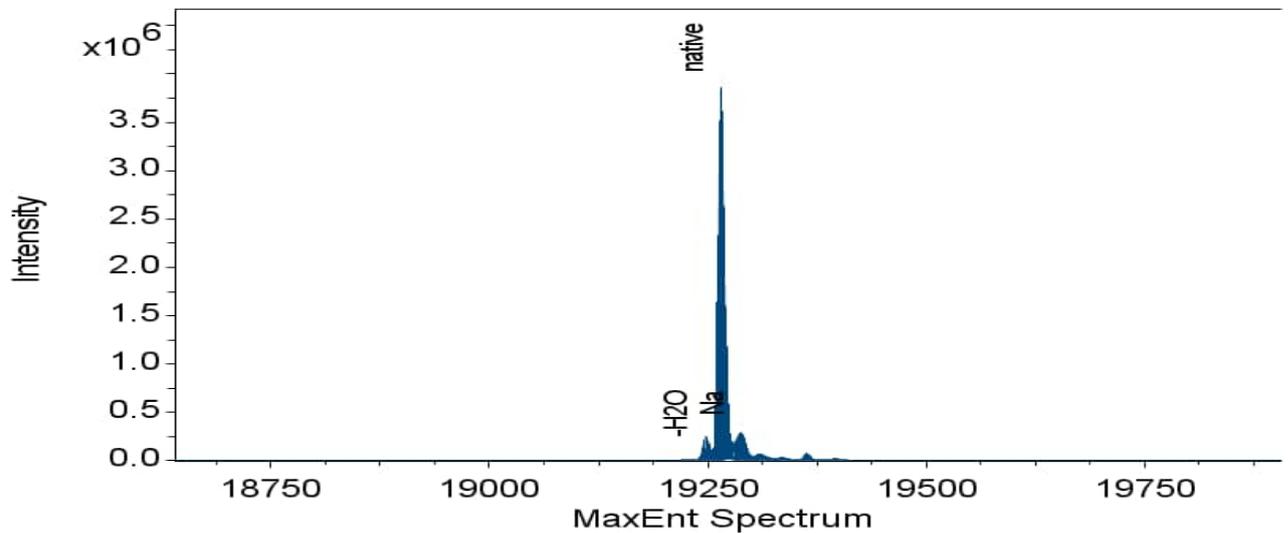


Рисунок 13 - Результаты исследования моноизотопной массы rIFN- α 2b (no-Met) (после деконволюции)

Расчет брутто-формулы, моноизотопной массы нативного белка и его основных изоформ производился на основании известной аминокислотной последовательности с учетом дисульфидных связей. Совпадение расчетной моноизотопной массы с экспериментальной, в случае нативной формы, составило менее 1 ppm, что можно считать подтверждением брутто-формулы и элементного состава. В случае обнаруженных минорных изоформ (моноокисленная форма - результат окисления одного метионина или триптофана, форма с замещением свободного протона карбоксильной группы атомом натрия, дегидратированная форма) различие составило порядка 50 ppm или 1 а.е.м., что связано с ошибкой алгоритма деконволюции Maximum Entropy Reconstruction программы BiopharmaCompass (США), часто возникающей в случае искажения изотопного распределения у малоинтенсивных ионов. Например, при частичном перекрывании сигналов ионов изоформ с небольшими отличиями в молекулярной массе. Ручной анализ спектра после деконволюции показал совпадение в пределах 1 ppm и для минорных изоформ. Таким образом, реализация первого этапа

аттестации ФСО rIFN-alfa2b (no-Met) позволила получить кандидат в ФСО с верифицированной аминокислотной последовательностью, имеющий удобную для применения форму выпуска.

Поскольку ФСО rIFN-alfa2b (no-Met) исходно запланирован как полноценная замена международного образца CRS, аттестацию проводили в сравнении с данным образцом и с использованием методики пептидного картирования, изложенной в монографии ЕФ 07/2015:1110. При этом, для идентификации структуры пептидов, полученных в результате триптического гидролиза кандидата в ФСО rIFN-alfa2b (no-Met) и образца CRS использовали систему BrukermaXis 2 4G ETD (Bruker, США), позволяющую проводить как УФ, так и МС-детектирование. Данный подход позволил исключить стадию препаративного отбора фракций. При этом, в связи с большим массивом протеолитических пептидов, для их идентификации при моделировании *in silico* были выбраны специфичные для трипсина (R, K) и химоотрипсина (M, I, S, T, N, Y, A, V, F, G) положения. Химоотриптическая специфичность была добавлена в связи с тем, что высокоочищенный от химоотрипсина трипсин природного происхождения (трипсин из поджелудочной железы быка) может содержать его остаточные количества, что необходимо учитывать при большом объеме продуктов протеолиза и высокой чувствительности детекции.

В результате, были получены пептидные карты при УФ-детектировании продуктов протеолиза кандидата в ФСО rIFN-alfa2b (no-Met) и образца CRS (Рисунки 14,15). MS-анализ по точной массе и фрагментным спектрам данных пептидов позволил идентифицировать последовательность основных пептидов (для 34-х пиков образца CRS и 37-ми пиков кандидата в ФСО rIFN-alfa2b (no-Met)), что суммарно составило около 85% общей АК-последовательности молекулы. Поскольку молекулы rIFN-alfa2b (no-Met) и rIFN-alfa2b (Met) являются практически идентичными по структуре за исключением M₁, были сопоставлены последовательности протеолитических пептидов 8-ми характеристических пиков,

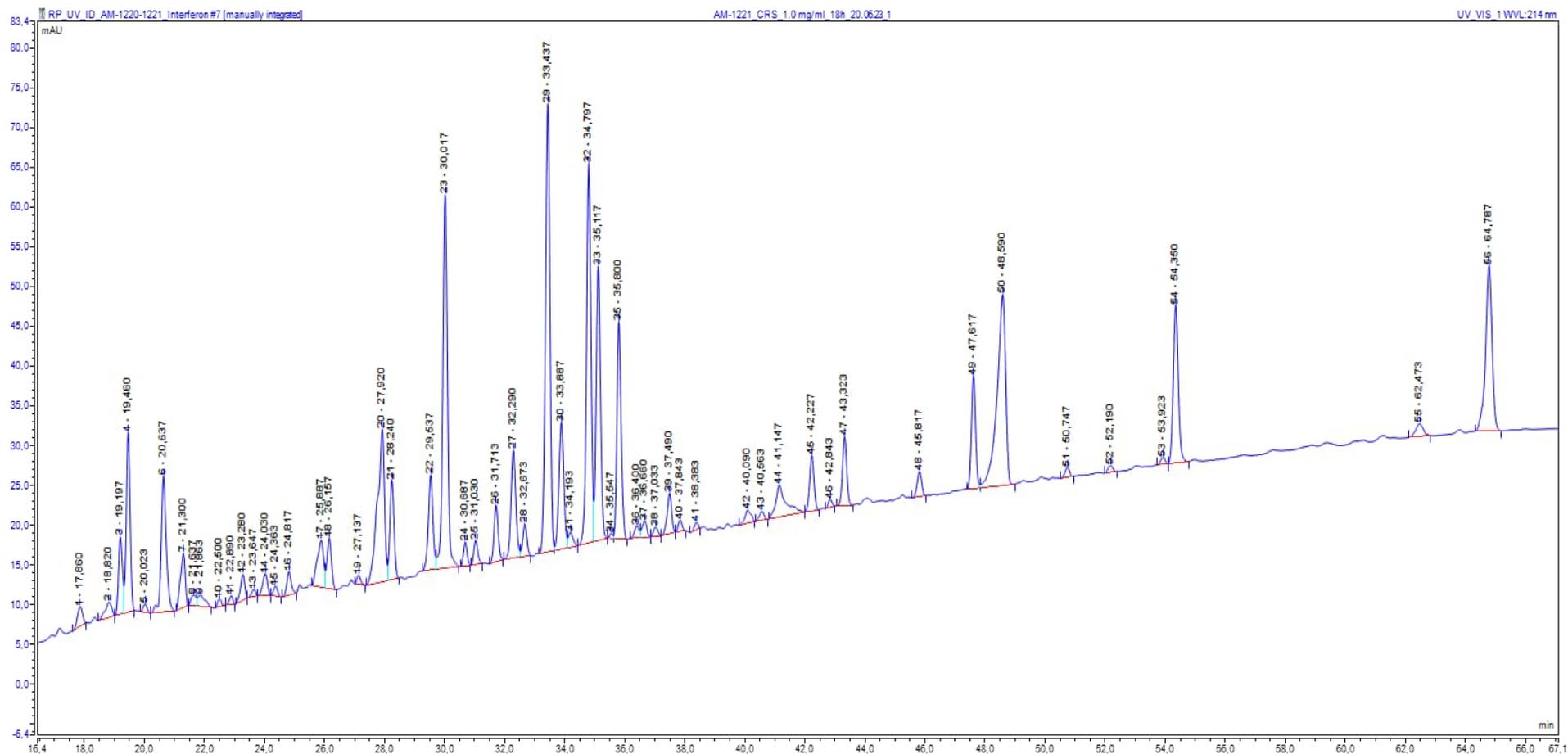


Рисунок 14 - Типичная пептидная карта образца CRS, полученная в результате ОФ-ВЭЖХ разделения и УФ-детектирования продуктов ферментативного гидролиза

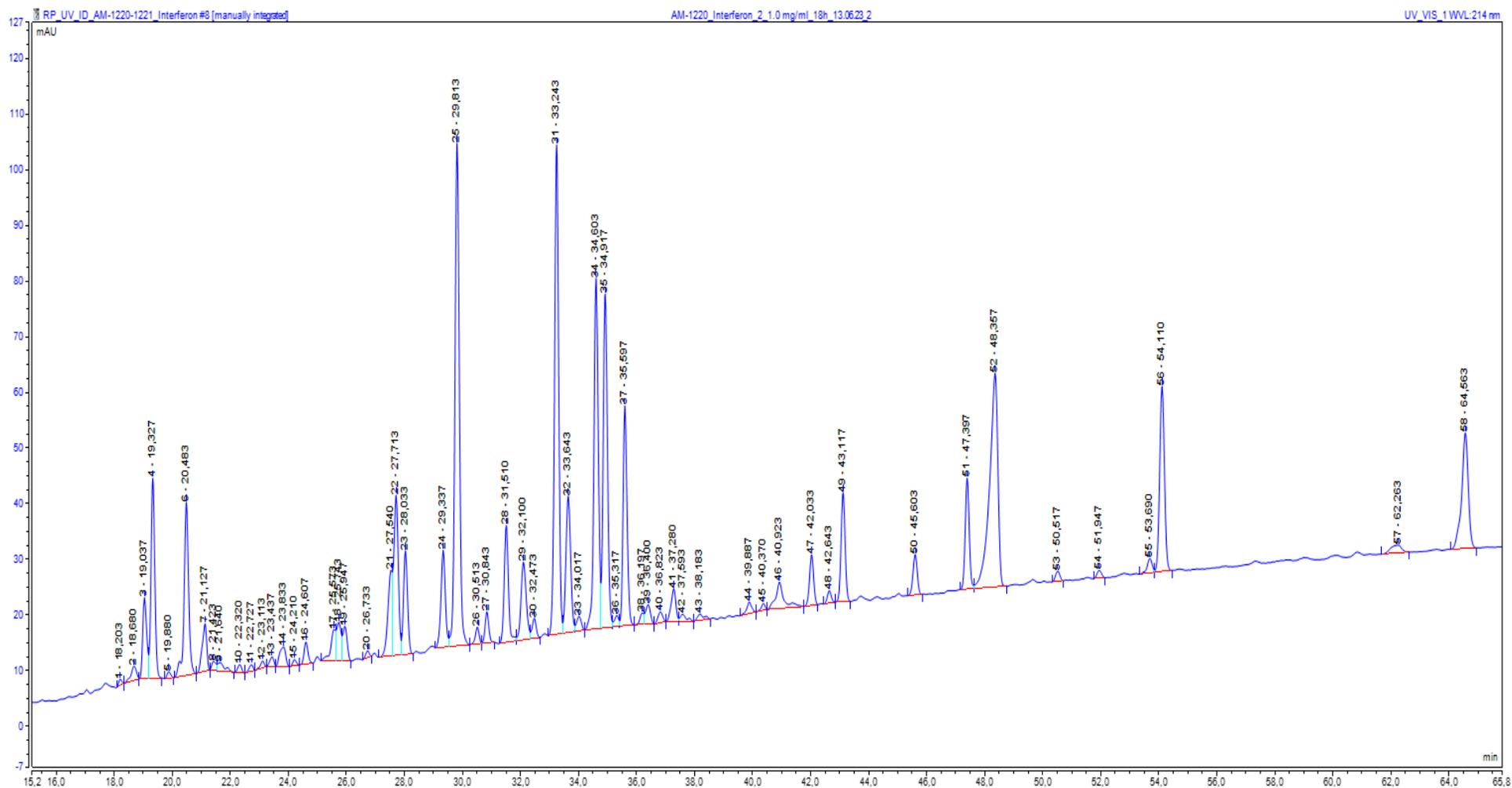


Рисунок 15 - Типичная пептидная карта кандидата в ФСО rIFN- α 2b (no-Met), полученная в результате ОФ-ВЭЖХ разделения и УФ-детектирования продуктов ферментативного гидролиза

доказавших свою состоятельность при рутинном контроле подлинности аминокислотной последовательности rINF-alfa2b(Met).

Все характеристические пики, выявленные для rINF-alfa2b (Met), были идентифицированы для rINF-alfa2b (no-Met) со смещением положения покрытия последовательности на единицу, обусловленным отсутствием M₁ (Таблицы 6,8).

Таблица 8 - Верификация аминокислотной последовательности характеристических пиков образца CRS и кандидата ФСО rINF-alfa2b (no-Met)

№ пика ⁵ CRS/ Время удерживания	№ пика ФСО rINF- alfa2b/ Время удерживания	Аминокислотная последовательность пептида	Положение в молекуле (номер аминокислотного остатка)
3 (1) /19,19	3 (1) /19,04	AEIMR	145-149
6 (2) / 20,64	6 (2) /20,48	CDLPQTH	1-7
23 (3) /30,01	25 (3) /29,90	YSPCAW	135-140
29 (4) /33,43	31 (4) /33,24	DSSAAWDETLLDK	71-83
32 (5) /34,79	34 (5) /34,60	DRHDFGFPEEFGNQFQK	32-49
33 (6) /35,11	35 (6) /34,92	HDFGFPEEFGNQFQK	34-49
50 (7) /48,59	52 (7) /48,36	AETIPVLHEMIQQIF	50-64
54 (8) /54,35	56 (8) /54,11	FYTELYQQLNDLEACVIQGVGVT ETPLMK	84-112

Смещение номеров пиков между образцом CRS и кандидатом ФСО rINF-alfa2b (no-Met) обусловлено наличием на пептидной карте последнего более интенсивных минорных пиков, что позволило идентифицировать их как значимые. 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 (Таблица 9).

Анализ данных, приведенных в таблице 9, показал, что максимальное значение расхождения времен удерживания характеристических пиков образца CRS и ФСО rINF-alfa2b (no-Met), выраженное как RSD, 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%.

⁵В скобках, красным цветом указаны номера пиков, соответствующие пептидной карте rINF-alfa2b (Met) (Таблица 6, Рисунок 8).

Таблица 9 - Результаты аттестации ФСО rINF-alfa2b (no-Met)

№	Образец	Пик 1		Пик 2		Пик 3		Пик 4		Пик 5		Пик 6		Пик 7		Пик 8	
		RT, мин	RRT (по пику 4)														
1	CRS	18,433	0,56	19,879	0,60	29,424	0,89	33,071	1,00	34,505	1,04	34,784	1,05	48,656	1,47	54,439	1,65
	Кандидат в СО	18,511	0,56	19,93	0,60	29,452	0,89	33,122	1,00	34,566	1,04	34,842	1,05	48,639	1,47	54,449	1,64
	RSD (RT), %	0,30	-	0,18	-	0,07	-	0,11	-	0,12	-	0,12	-	0,02	-	0,01	-
2	CRS	18,508	0,56	19,916	0,60	29,447	0,89	33,11	1,00	34,557	1,04	34,833	1,05	48,679	1,47	54,465	1,64
	Кандидат в СО	18,664	0,56	19,955	0,60	29,423	0,89	33,113	1,00	34,548	1,04	34,823	1,05	48,704	1,47	54,45	1,64
	RSD (RT), %	0,59	-	0,14	-	0,06	-	0,01	-	0,02	-	0,02	-	0,04	-	0,02	-
3	CRS	18,679	0,57	19,979	0,60	29,385	0,89	33,045	1,00	34,458	1,04	34,749	1,05	48,786	1,48	54,756	1,66
	Кандидат в СО	18,673	0,57	19,972	0,60	29,346	0,89	33,031	1,00	34,456	1,04	34,747	1,05	48,617	1,47	54,41	1,65
	RSD (RT), %	0,02	-	0,02	-	0,09	-	0,03	-	0,00	-	0,00	-	0,25	-	0,45	-
4	CRS	18,714	0,56	19,99	0,61	29,352	0,89	33,017	1,00	34,451	1,04	34,744	1,05	48,676	1,47	54,724	1,66
	Кандидат в СО	18,665	0,56	19,975	0,60	29,403	0,89	33,066	1,00	34,458	1,04	34,743	1,05	48,563	1,47	54,459	1,65
	RSD (RT), %	0,19	-	0,05		0,12		0,10		0,01		0,00		0,16		0,34	
5	CRS	20,394	0,56	21,447	0,63	30,593	0,90	33,852	1,00	35,115	1,04	35,406	1,05	48,682	1,44	54,301	1,60
	Кандидат в СО	20,344	0,56	21,393	0,63	30,548	0,91	33,754	1,00	35,041	1,04	35,33	1,05	48,62	1,44	54,229	1,61
	RSD (RT), %	0,17	-	0,18		0,10		0,21		0,15		0,15		0,09		0,09	
6	CRS	20,337	0,56	21,389	0,63	30,516	0,90	33,753	1,00	35,015	1,04	35,311	1,05	48,558	1,44	54,166	1,60
	Кандидат в СО	20,325	0,56	21,369	0,63	30,517	0,91	33,705	1,00	34,994	1,04	35,282	1,05	48,546	1,44	54,158	1,61
	RSD (RT), %	0,04	-	0,07		0,00		0,10		0,04		0,06		0,02		0,01	
7	CRS	18,688	0,56	19,996	0,60	29,51	0,89	33,133	1,00	34,563	1,04	34,837	1,05	48,633	1,47	54,468	1,64
	Кандидат в СО	18,691	0,56	20,013	0,60	29,507	0,89	33,16	1,00	34,594	1,04	34,871	1,05	48,656	1,47	54,47	1,64
	RSD (RT), %	0,01	-	0,06		0,01		0,06		0,06		0,07		0,03		0,00	

Окончание таблицы 9																	
8	CRS	18,651	0,56	19,974	0,60	29,521	0,89	33,13	1,00	34,559	1,04	34,835	1,05	48,665	1,47	54,479	1,64
	Кандидат в СО	18,678	0,56	20,011	0,60	29,498	0,89	33,113	1,00	34,551	1,04	34,831	1,05	48,655	1,47	54,475	1,65
	RSD (RT), %	0,10	-	0,13	-	0,06	-	0,04	-	0,02	-	0,01	-	0,01	-	0,01	-
9	CRS	19,46	0,56	20,637	0,62	30,017	0,90	33,437	1,00	34,797	1,04	35,117	1,05	48,59	1,45	54,35	1,63
	Кандидат в СО	19,327	0,56	20,483	0,62	29,813	0,90	33,243	1,00	34,603	1,04	34,917	1,05	48,357	1,45	54,11	1,63
	RSD (RT), %	0,48	-	0,53		0,48		0,41		0,40		0,40		0,34		0,31	
10	CRS	19,7	0,56	21,05	0,63	29,717	0,89	33,317	1,00	34,583	1,04	35,8	1,07	48,333	1,45	53,633	1,61
	Кандидат в СО	19,683	0,56	21,05	0,63	29,733	0,89	33,35	1,00	34,6	1,04	35,817	1,07	48,35	1,45	53,633	1,61
	RSD (RT), %	0,06	-	0,00		0,04		0,07		0,03		0,03		0,02		0,00	
11	CRS	19,683	0,56	21,05	0,63	29,733	0,89	33,35	1,00	34,6	1,04	35,817	1,07	48,35	1,45	53,65	1,61
	Кандидат в СО	19,684	0,56	21,05	0,63	29,733	0,89	33,35	1,00	34,6	1,04	35,817	1,07	48,35	1,45	53,633	1,61
	RSD (RT), %	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00		0,00		0,00		0,00		0,02	
12	CRS	22,31	0,56	23,21	0,65	32,81	0,92	35,69	1,00	36,7	1,03	37,04	1,04	50,33	1,41	55,83	1,56
	Кандидат в СО	22,37	0,56	23,26	0,65	32,87	0,92	35,72	1,00	36,76	1,03	37,1	1,04	50,36	1,41	55,86	1,56
	RSD (RT), %	0,19	-	0,15		0,13		0,06		0,12		0,11		0,04		0,04	

Максимально допустимый процент расхождения характеристических пиков испытуемого и стандартного образцов, выраженный как среднее значение максимальных RSD + 2СКО составил 0,61%.

Поскольку в ходе применения ФСО для пептидного картирования может быть использована методика фирмы, изменены условия гидролиза и т.д., было принято решение в качестве аттестованной характеристики принять формулировку: «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 %». Также рекомендованной величиной является возможный диапазон соотношения площадей пика 4 " $0,96 \pm 0,3$ ", полученных для стандартного и испытуемого образца при одинаковой исходной нагрузке по белку, рассчитанный как среднее значение отношений, полученных в условиях воспроизводимости ± 2 СКО (Таблица 10).

Таблица 10 - Анализ соотношения площадей пика №4, полученных для образца CRS и ФСО rINF-alfa2b (no-Met)

№ анализа	Площадь пика №4 образца CRS	Площадь пика №4 CO rINF-alfa2b (no-Met)	Среднее арифметическое значение отношения площадей пиков CO rINF-alfa2b (no-Met)/CRS
1	1074,6781	1281,76	0,96
2	1071,8517	1278,71	
3	1544,53	1420,927	
4	1546,123	1428,281	
5	1723,858	1337,99	
6	1749,102	1345,553	
7	1319,108	1303,928	
8	1374,665	1326,351	
9	1319,108	1362,793	
10	24,897	19,385	
11	17,09	18,385	
12	1308075	1507911	
13	1544,5299	1254,460	
14	1546,1234	1253,600	
Стандартное отклонение			0,15

При этом для основного пика 4, полученного в рекомендуемых условиях (методика ЕФ 07/2015:1110 и высокоочищенный трипсин), 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.

Разница абсолютных значений площадей пика №4 (Таблица 10), при условии одинаковой нагрузки на хроматографическую колонку, обусловлена использованием хроматографов различных моделей (на базе научно-производственных лабораторий 3-х предприятий-производителей) с различным программным обеспечением: анализы №1-№9, №13, №14 выполнены на Infinity 1260 (Agilent Technologies, США) с программным обеспечением OpenLab CDS (США); анализы №10, №11 - на оборудовании Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific, США) с программным обеспечением Dionex Chromeleon 7.2 (США); анализ № 12 - на оборудовании NexeraX2 (Shimadzu, Япония) с программным обеспечением LabSolution DB (Япония).

В результате реализации данной программы аттестован первичный фармакопейный стандартный образец rINF-alfa2b (no-Met)- ФСО.3.2.00456. Разработана сопроводительная документация - паспорт, инструкция по применению, макет упаковки.

Поскольку исходная задача предполагала разработку и аттестацию ФСО, являющегося полной заменой образца CRS, исследовали возможность применения ФСО.3.2.00456 для остальных физико-химических методов, предусмотренных в монографии ЕФ 07/2015:1110 и выполненных по соответствующим протоколам (изофокусирование, электрофорез в ПААГ и окисленные формы методом ВЭЖХ) путем сравнения вышеуказанных образцов (Рисунки 16-22).

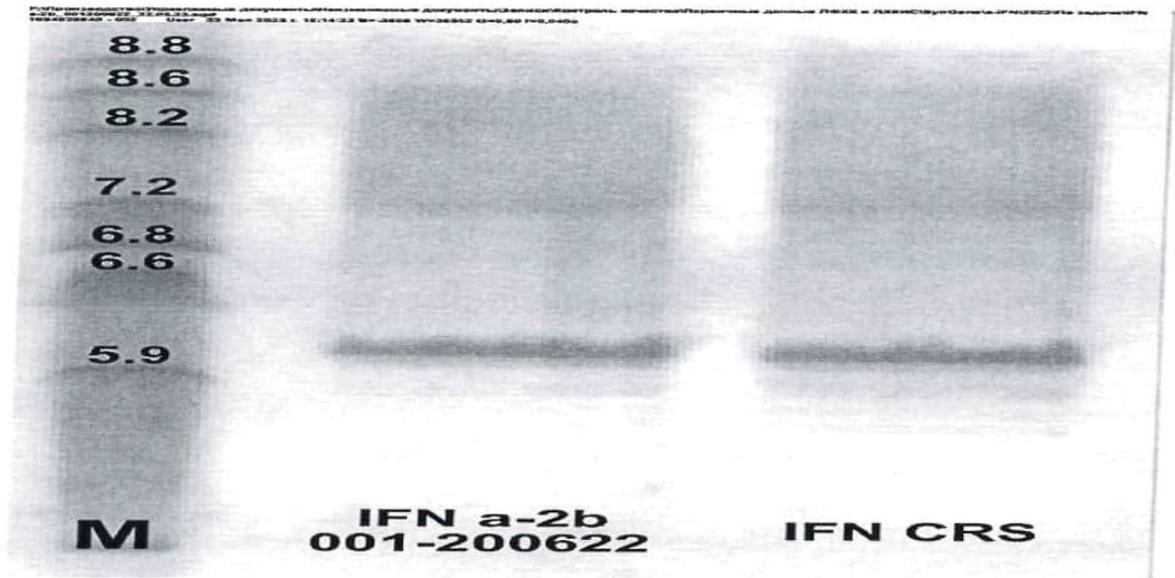


Рисунок 16 - Электрофореграмма ФСО.3.2.00456 и образца CRS (изофокусирование)

Как следует из рисунка 16, положение основной полосы на электрофореграмме ФСО.3.2.00456 соответствует положению основной полосы на электрофореграмме образца CRS - разница между положениями основных полос менее 0,2 единицы рН.

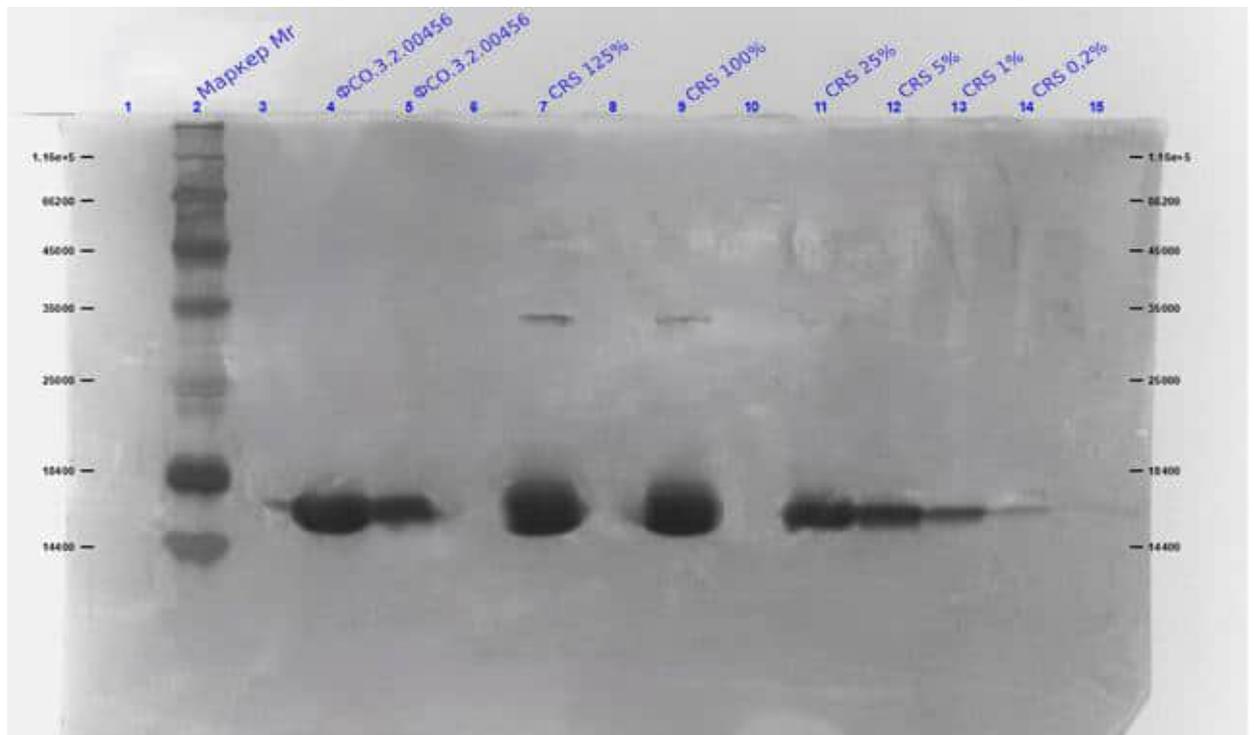


Рисунок 17 - Электрофореграмма ФСО.3.2.00456 и образца CRS (электрофорез в ПААГ восстанавливающих условиях)

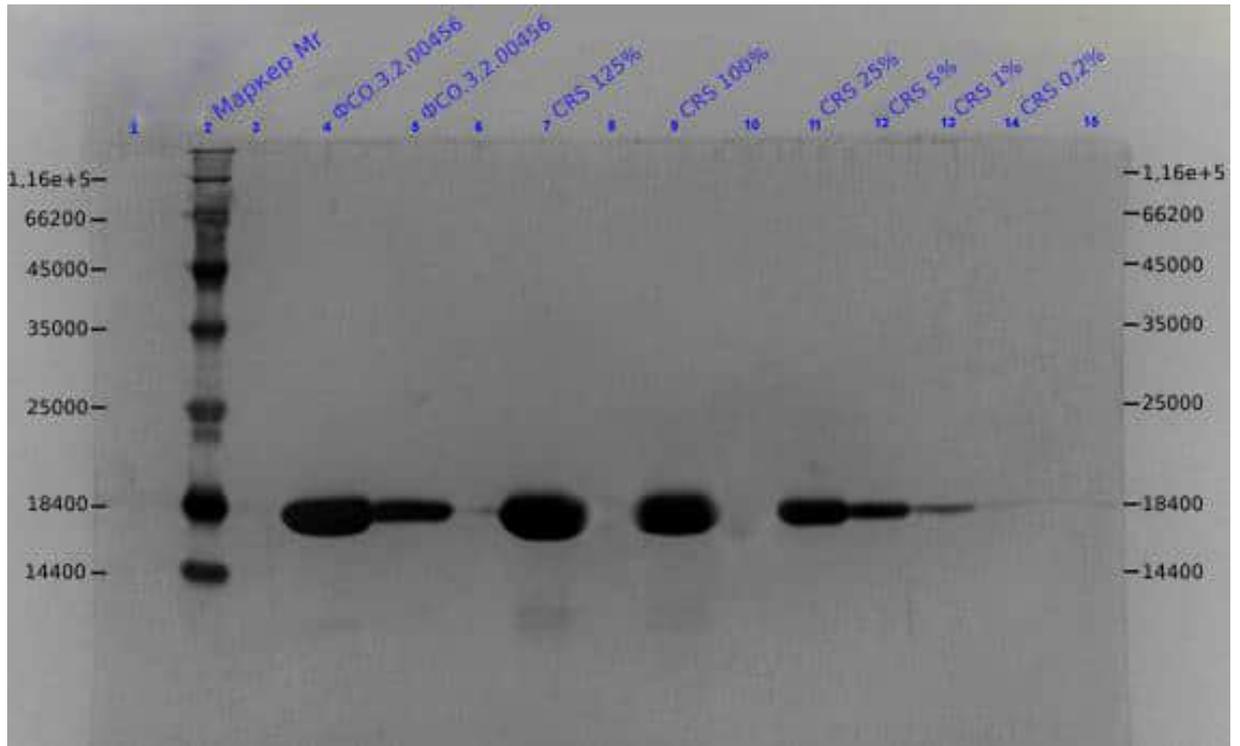


Рисунок 18 - Электрофореграмма FCO.3.2.00456 и образца CRS (электрофорез в ПААГ восстанавливающих условиях)

Как следует из рисунков 17 и 18, основная полоса FCO.3.2.00456 соответствует основной полосе CRS. В невосстанавливающих условиях дополнительных полос не выявлено. В восстанавливающих условиях выявлены дополнительные полосы с молекулярной массой менее основной полосы, по интенсивности не превышающие 0,2 %.

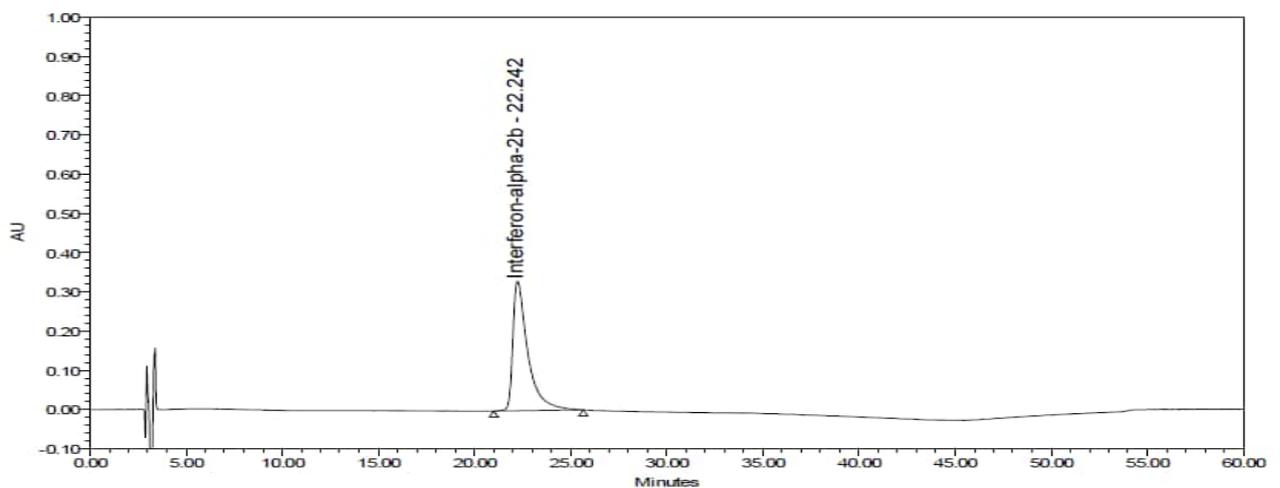


Рисунок 19 – Хроматограмма FCO.3.2.00456 до окисления

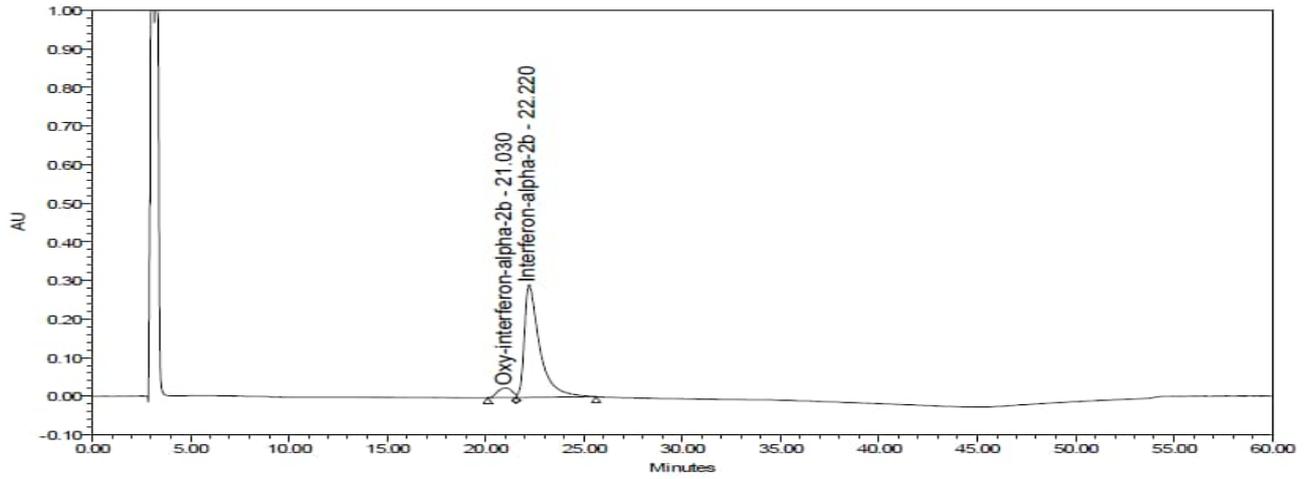


Рисунок 20 - Хроматограмма ФСО.3.2.00456 после окисления

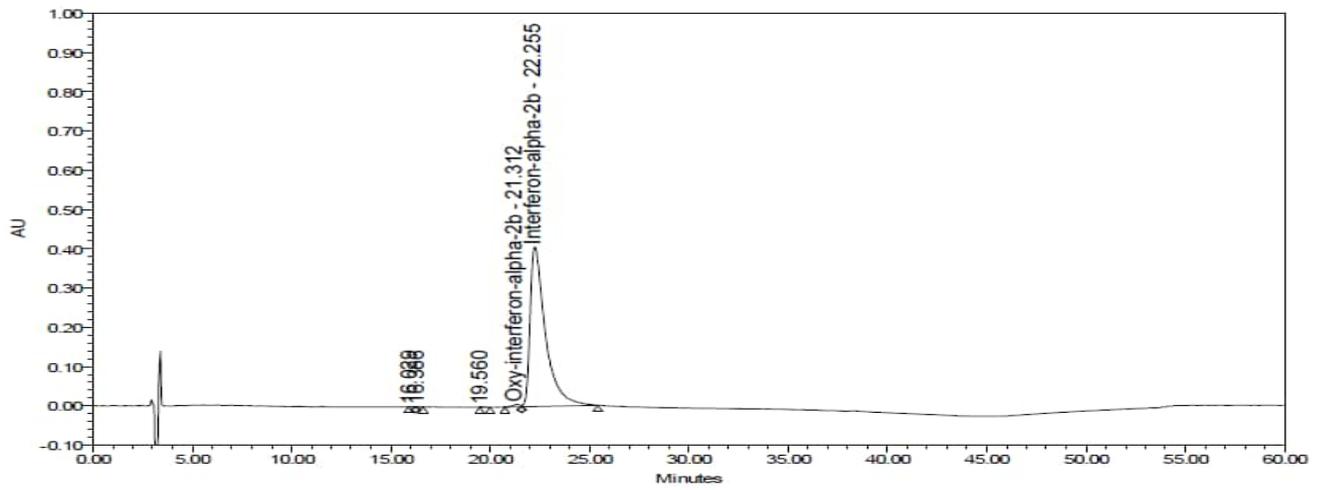


Рисунок 21 - Хроматограмма образца CRS до окисления

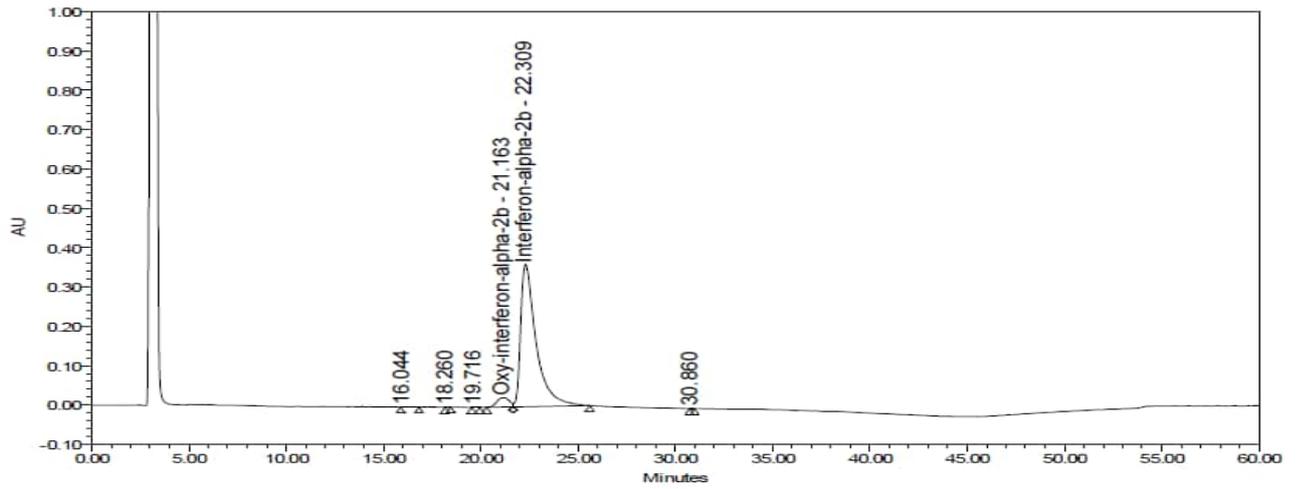


Рисунок 22 - Хроматограмма образца CRS после окисления

Как следует из рисунков 19-22, для всех образцов (до окисления и после окисления) время удерживания пика интерферона ФСО.3.2.00456 совпадает со временем удерживания пика интерферона образца CRS. При этом на хроматограмме образца CRS до окисления идентифицируется пик окисленного интерферона в процентах по отношению к основному пику 0,77, а после окисления - 5,0%. Для ФСО.3.2.00456 до окисления пик, соответствующий окисленному интерферону, не выявляется, после окисления идентифицируется в процентах по отношению к основному пику - 7,36%. На основании полученных данных можно достоверно утверждать, ФСО.3.2.00456 до окисления не содержит окисленных примесей и соответствует требованиям - не менее 95% основного вещества.

Таким образом разработанный и аттестованный для метода пептидного картирования ФСО.3.2.00456, пригоден для применения в отношении остальных физико-химических показателей качества, требующих наличия образца сравнения, и является полноценной заменой европейскому образцу CRS. Данная информация внесена в инструкцию по его применению.

3.1.2 Стандартизация оценки аминокислотной последовательности интерферона бета-1b

Оптимизация оценки качества препаратов на основе rIFN-beta1b заключалась в разработке СО, предназначенного для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности молекулы интерферона методом пептидного картирования на уровне субстанции. При этом была очевидна необходимость разработки самой методики пептидного картирования: существенные отличия структуры и, как следствие, свойств rIFN-beta1b от rIFN-beta1a (нестабильность в нейтральной и щелочной средах), не позволяли использовать методику монографии ЕФ 01/2009:1639, где ферментативное расщепление проводят при рН 9,0 с помощью эндопротеазы LysC [115]. Поскольку в отечественное биофармацевтическое производство представлено более чем одним

производителем (2 производителя), принято решение о целесообразности аттестации СО образца, имеющего статус отраслевого (фармакопейного).

Поскольку rIFN-beta1b нестабилен 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 аминокислотной последовательности методом пептидного картирования из-за наложения продуктов гидролиза обоих белков в ходе хроматографического разделения.

Таким образом был разработан кандидат в ФСО, не содержащий ЧСА: очищенный белок 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 кандидата в ФСО обеспечивали путем лиофильного высушивания в следующем режиме: замораживание (-70⁰С) в течение 8 часов, сушка 24 часа при температуре 30⁰С и вакууме 7-10 Па; сушка 4 часа до температуры 25⁰С; объем розлива 1 мл; флаконы формата 2R из стекла I гидролитического класса с бромбутиловыми пробками. Восстановление лиофилизата в 0,4 мл воды очищенной предполагает получение раствора с концентрацией белка около 0,6 мг/мл.

Для оценки качества кандидата в ФСО, на основе спецификации производителя на субстанцию, была разработана спецификация со следующими изменениями: исключен показатель «Вирусная безопасность», т.к. образец не является лекарственным средством; исключен показатель «Общий белок» и изменены требования к содержанию целевого белка; требования к показателю «Описание» заменены на лиофилизированную форму; изменены требования к показателю «pH» и к упаковке/маркировке флаконов; раздел «Подлинность» дополнен требованием к верификации аминокислотной последовательности относительно известной [50,53], включая подтверждение дисульфидной связи

C₃₀₋₁₄₀. Для расширенной оценки использовали метод масс-спектрометрии высокого разрешения ВЭЖХ/МС/МС с ионизацией электрораспылением (ESI) и вторичной ионизацией, инициируемой соударениями (CID). Образец предварительно подвергали мультиферментному гидролизу с применением ферментов эндопротеаза Asp-N, пепсин, эндопротеаза Glu-C, эндопротеаза Lys-C, иммобилизованный трипсин.

В результате, с вероятностью 95%, была верифицирована аминокислотная последовательность кандидата в ФСО rIFN-beta1b (Рисунок 23).

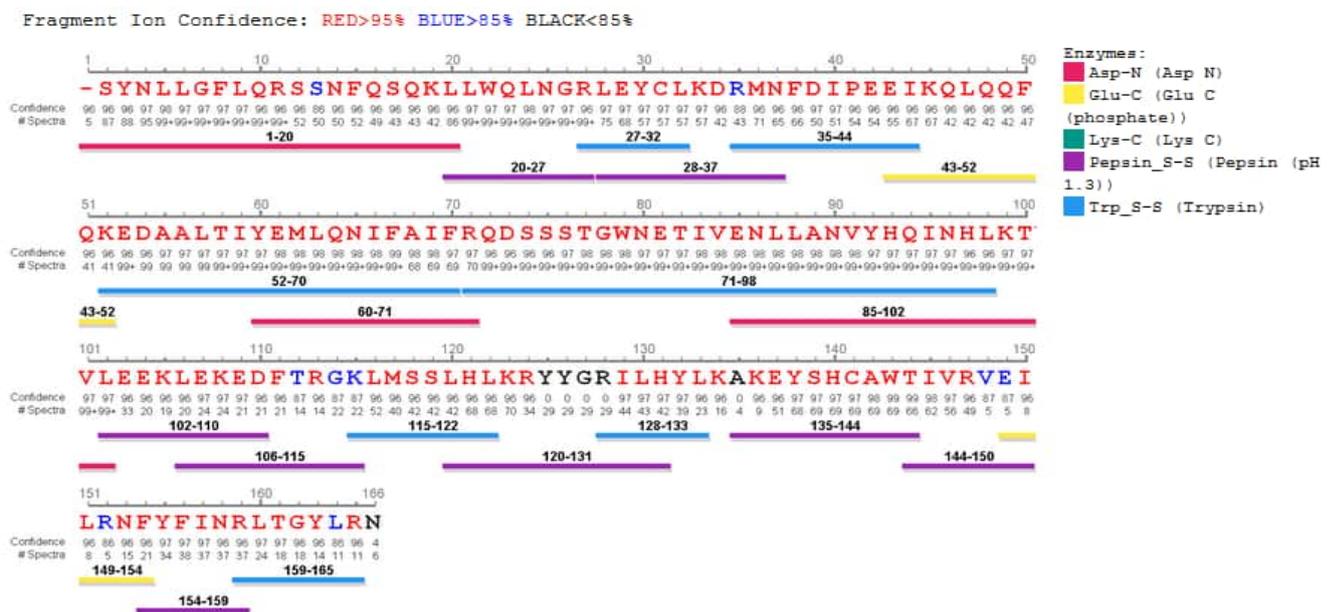


Рисунок 23 - Верификация аминокислотной последовательности кандидата СО rIFN-beta1b (мультиферментный протеолиз) методом ВЭЖХ/МС/МС

А также выявлен дисульфидный пептид [LEYCLK]-[KEYSHCAWTI], состоящий из двух пептидов 27-32 и 135-144, соединенных дисульфидной связью между 30 и 140 цистеинами белковой цепи (Рисунки 24,25).

Таким образом, реализация первого этапа аттестации ФСО rIFN-beta1b позволила получить кандидат в ФСО с верифицированной аминокислотной последовательностью, имеющий удобную для применения форму выпуска.

При разработке методики пептидного картирования руководствовались рекомендациями ЕФ по использованию пепсина и эндопротеазы Glu-C для гидролиза белков в кислых условиях (монография 01/2010:20255 «Peptide

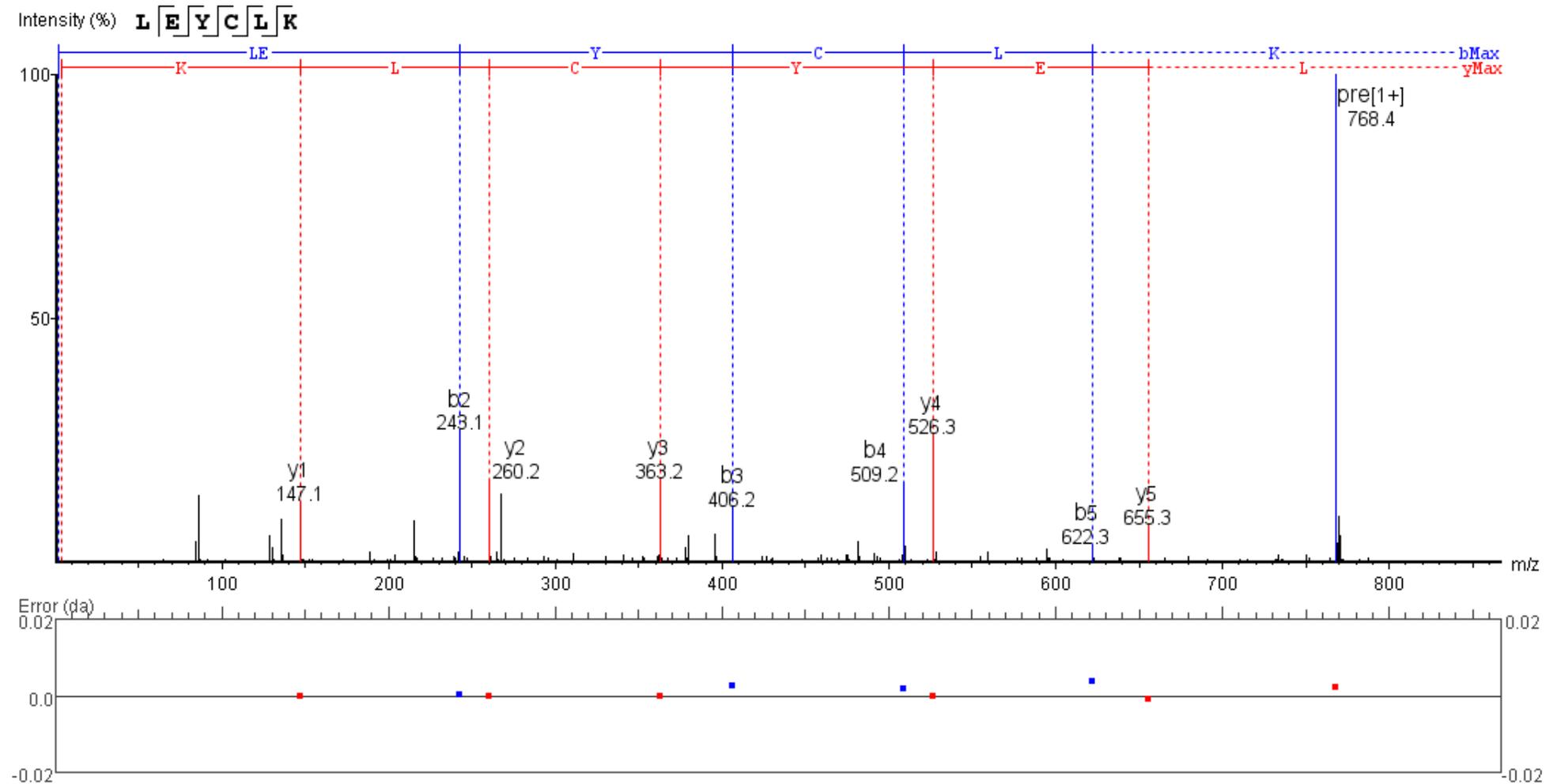


Рисунок 24 - Аннотированный тандемный масс-спектр фрагмента rINF-beta1b в положении 27-32

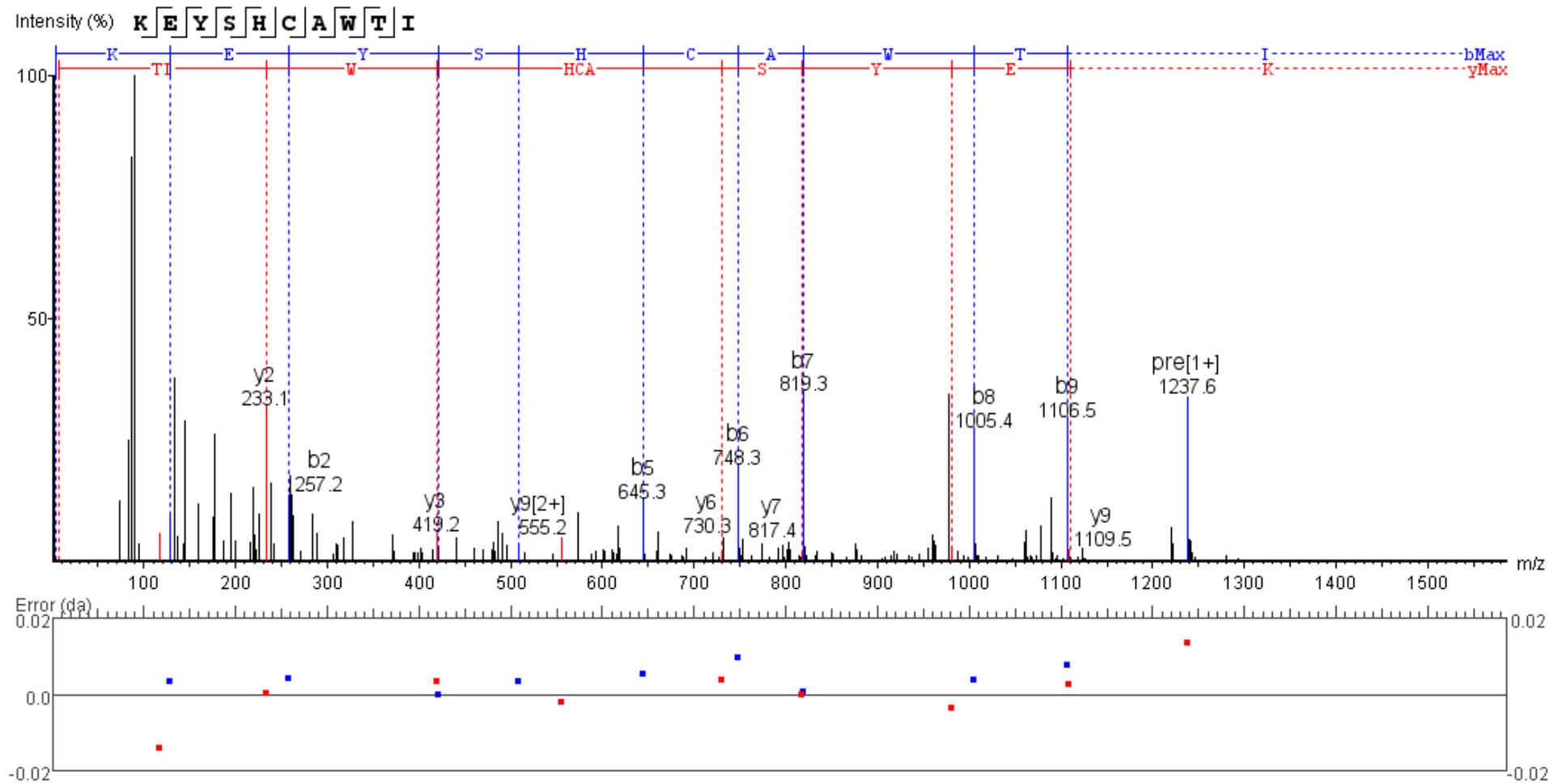


Рисунок 25- Аннотированный тандемный масс-спектр фрагмента γ INF-beta1b в положении 135-144

mapping») [116]. При выборе колонки и условий разделения использовали протокол ОФ-ВЭЖХ ЕФ 07/2015:1110 и данные научной периодики, рекомендуемые для использования для эффективного разделения смеси пептидов октадецилсилилсиликагельС18 [114-116,286].

Для получения стабильной и специфичной пептидной карты был выбран фермент эндопротеаза Glu-C, обеспечивающий расщепление пептидных связей по остаткам глутаминовой кислоты с рабочей областью рН 4,0-9,0. Разработку условий гидролиза проводили с использованием раствора кандидата ФСО rIFN-beta1b.

В ходе гидролиза исследовали влияние рН на стабильность белка и полноту гидролиза, для чего использовали ацетатный буферный раствор с рН шести концентраций в диапазоне от 4,0 до 4,57. Выбранный диапазон обусловлен нижним пределом активности выбранного фермента (4,0) и стабильностью белка - при значениях рН выше 4,57 была зафиксирована денатурация. В качестве оценки возможных продуктов аутогидролиза использовали ацетатный буферный раствор, обработанный эндопротеиназой Glu-C. В результате было подтверждено отсутствие аутогидролиза фермента в заданных условиях; непригодность гидролиза диапазоне рН 4,0 - 4,3 (недостаточность расщепления молекулы выражена в малоинтенсивных пиках и большой кластерной области в диапазоне времен удерживания 60-70 мин); показана стабильность и удовлетворительное разрешение пиков при гидролизе в диапазоне рН 4,5 - 4,57 (Рисунки 26-28).

Условия ферментативного гидролиза при рН 4,5; 4,54; 4,57 и последующего хроматографического разделения были исследованы с применением образца rIFN-beta1b другого производителя. Исходная концентрация целевого белка около 0,2 мг/мл была откорректирована путем центрифужного концентрирования до концентрации около 0,6 мг/мл, позволяющей получать пики достаточной интенсивности.

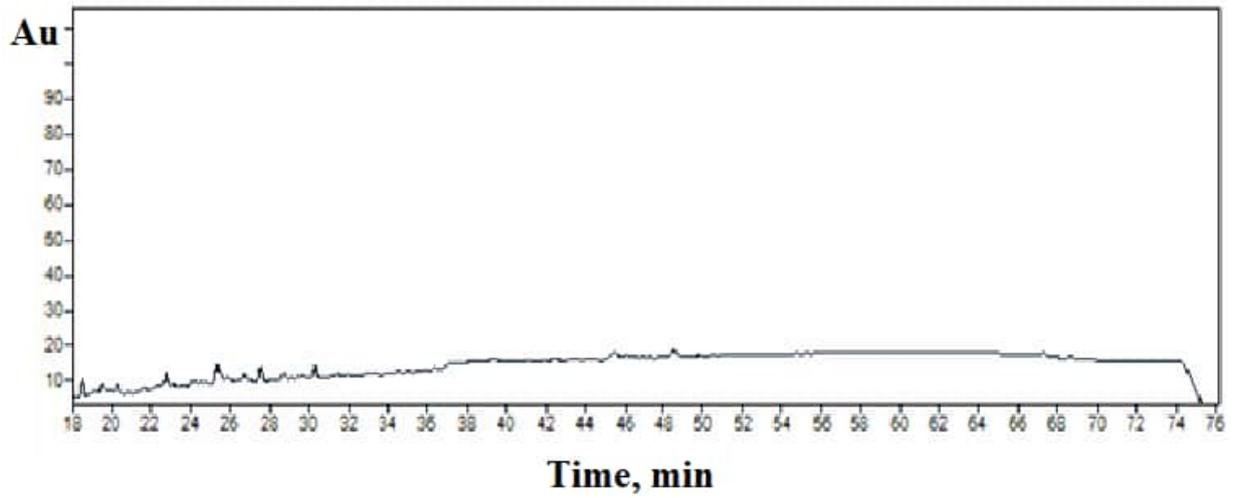


Рисунок 26 - Исследование аутогидролиза

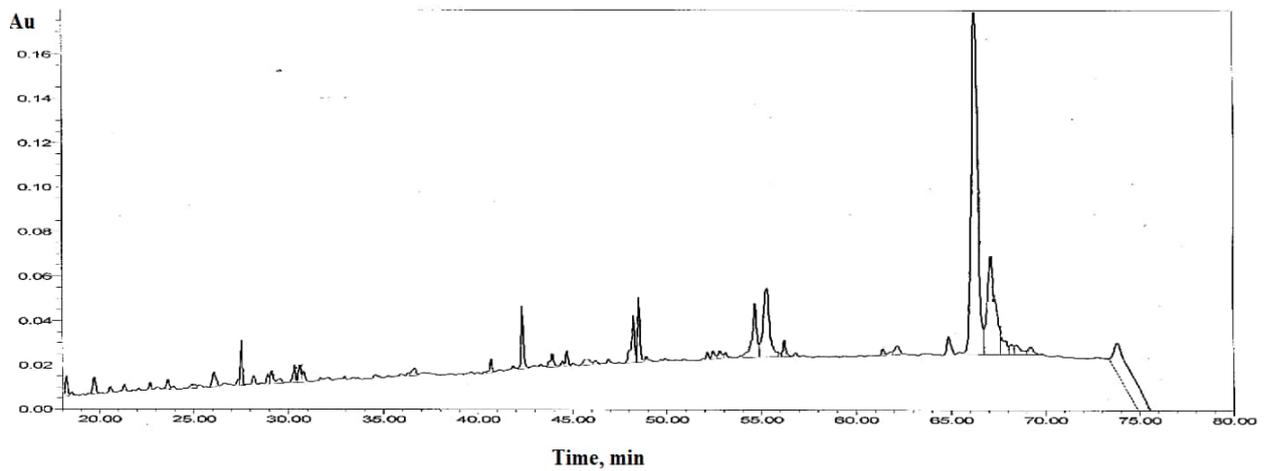


Рисунок 27 - Типичный результат гидролиза кандидата ФСО rIFN-beta1b при pH 4,0 - 4,3

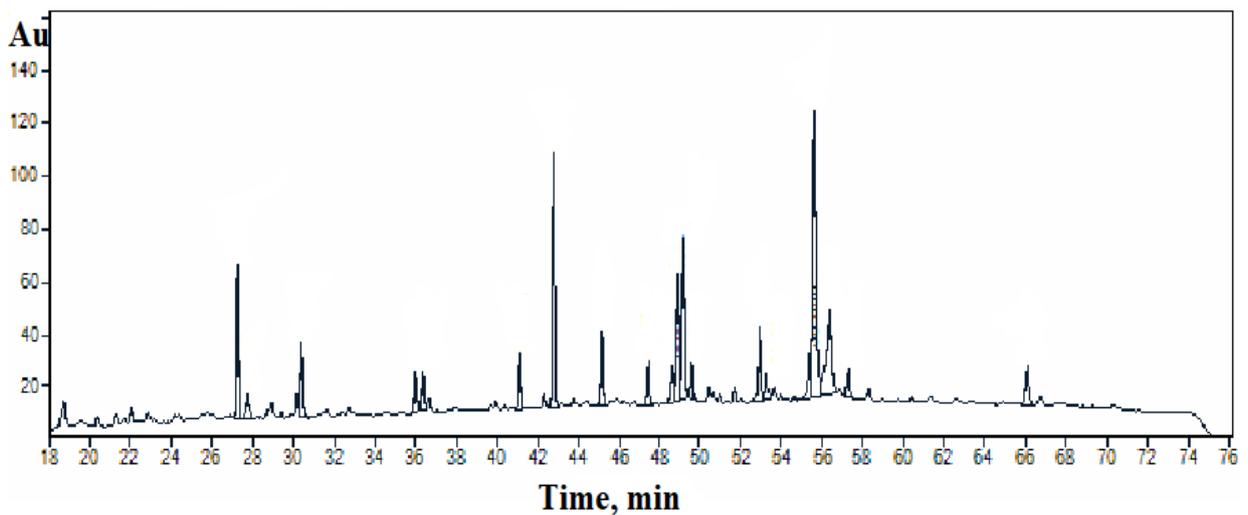


Рисунок 28 - Типичный результат гидролиза кандидата ФСО rIFN-beta1b при pH 4,5 - 4,57

Полученные результаты подтвердили стабильность пептидных профилей, получаемых в заданных условиях для субстанций rIFN-beta1b разных производителей (исходная субстанция кандидата ФСО, кандидат ФСО и субстанция другого производителя) при условии одинаковой исходной концентрации белка и идентичности состава - отсутствия вспомогательных веществ, не зависимо от значения pH от 4,5 до 4,47. Незначительные расхождения в виде минорных пиков и характера кластерных областей были отмечены в диапазоне 39-42; 47-50 и 52-54 мин удерживания.

Также, в качестве подтверждения специфичности разработанной методики, исследовали образец CRS (rIFN-beta1a), отличающийся структурно (N-гликозилирование, наличие M₁ и C₁₇). Различия пептидных карт были зафиксированы в диапазоне времен удерживания от 54 до 58 мин, а также в диапазоне времен удерживания от 65 до 70 минут наблюдали «тяжелую» кластерную область, предположительно представляющую негидролизированный белок, полученный в результате экранирования действия фермента углеводной частью молекулы (Рисунок 29).

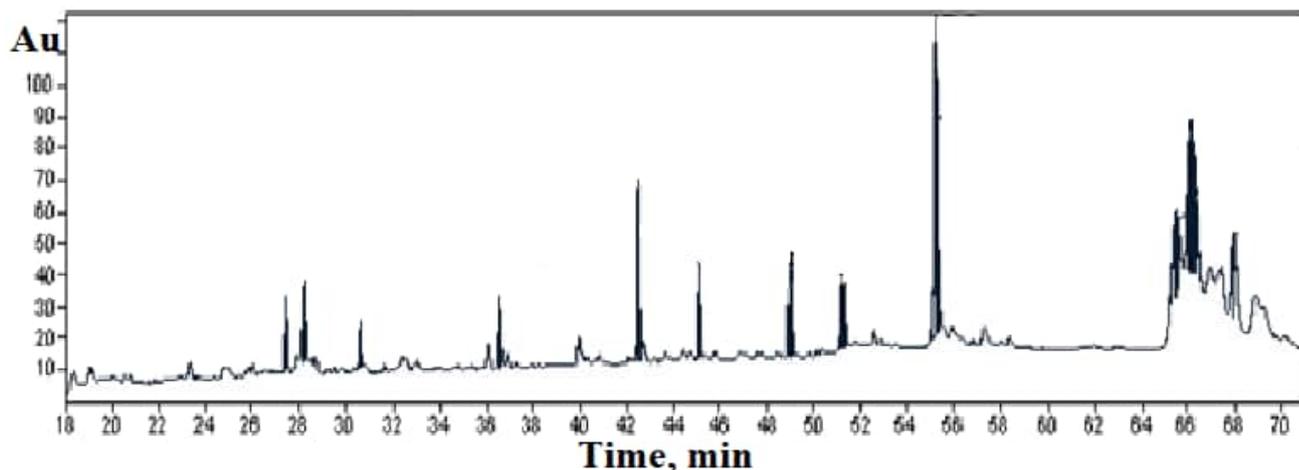


Рисунок 29 - Типичный результат гидролиза образца CRS INF бета-1a

Визуальный анализ пептидных карт субстанций rIFN-beta1b2-x производителей и кандидата ФСО rIFN-beta1b, а также результат оценки стабильности времени удерживания (n=12, RSD менее 0,3%) позволил выбрать 7 характеристических пиков (Рисунок 30, Таблица 11).

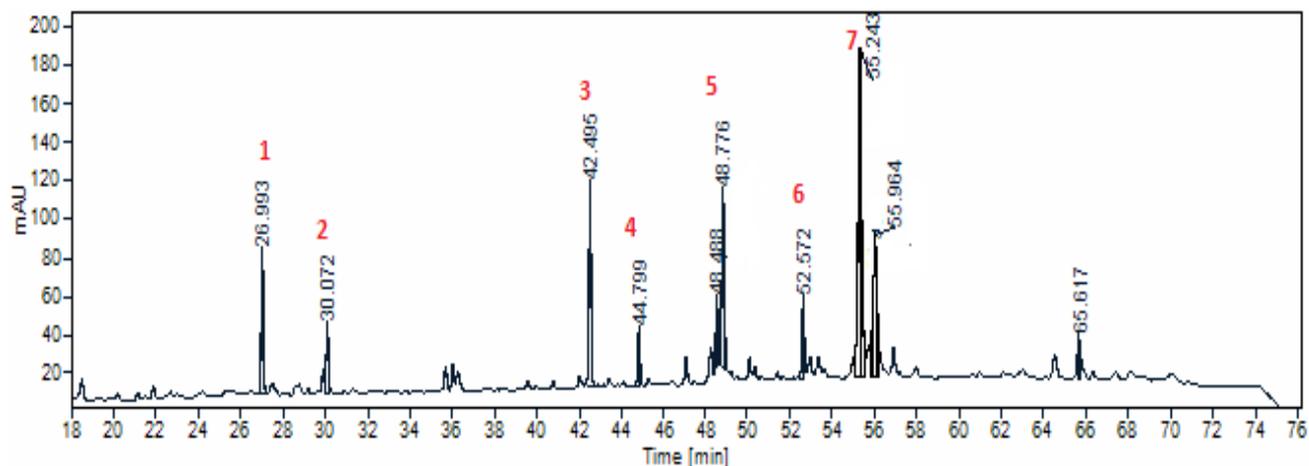


Рисунок 30 - Типичная пептидная карта rIFN-beta1b, полученная в результате ОФ-ВЭЖХ разделения и УФ-детектирования продуктов ферментативного гидролиза с применением эндопротеазаGlu-C при pH 4,5 - 4,57.

Таблица 11 - Параметры характеристических пиков (n=12)

№ пика	Среднее значение абсолютного времени удерживания, мин	Стандартное отклонение абсолютного времени удерживания, мин	RSD, %
1	27,08	0,06	0,22
2	30,21	0,05	0,18
3	42,61	0,07	0,17
4	44,98	0,08	0,17
5	48,93	0,08	0,17
6	52,71	0,09	0,17
7	55,39	0,09	0,18

Далее характеристические пики были верифицированы относительно известной последовательности rIFN-beta1b с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (Таблица 12, Рисунок 31).

Таблица 12 - Результаты верификации аминокислотной последовательности основных пептидов характеристических пиков кандидата в СО rINF- beta1b

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

SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQK
 EDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEE
 KLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKELYSHCAWTIVRVEILRNFY
 FINRLTGYLRN

Рисунок 31 - Верификация пептидов характеристических пиков⁶

Таким образом, специфичность разработанной методики пептидного картирования INF бета-1b подтверждается отсутствием аутогидролиза используемого фермента, получением идентичных пептидных карт для INF бета-1b разных производителей, принципиальным различием пептидных профилей rIFN-beta1b и rIFN-beta1a и идентификацией аминокислотной последовательности пептидов характеристических пиков с демонстрацией покрытия исходной последовательности белка.

Прецизионность разработанной методики определяли по абсолютному и относительному временам удерживания характеристических пиков, полученных в условиях воспроизводимости (с применением 3-х хроматографов и 3-х аналогичных хроматографических колонок при n=20).

Для расчета относительного времен удерживания (на основании коэффициента вариации времени удерживания (0,17%), высокой интенсивности и разрешения, фактора асимметрии 1,0) в качестве основного пика был выбран пик 3. В результате было статистически достоверно показано, что средний коэффициент вариации по всем характеристическим пикам как для абсолютных, так и относительных времен удерживания был не более 2,0%, что свидетельствует об удовлетворительной прецизионности методики.

Аттестованная характеристика была представлена в виде диапазона времени удерживания каждого характеристического пика (абсолютного времени удерживания для пика 3 и относительного для остальных пиков), рассчитанного

⁶Зеленый цвет - пептиды, формирующие характеристические пики

как среднее значение $\pm 2S$ (n=20), на основании пептидных карт кандидата ФСО rIFN-beta1b, полученных методикой ЕФ 07/2015:1110 с применением эндопротеазы Glu-C при pH 4,5 - 4,57 (Таблица 13) [33,34,104].

Таблица 13 – Аттестованная характеристика ФСО rIFN-beta1b

№ Пика	1	2	3	4	5	6	7
Диапазон времени удерживания	0,61-0,66	0,68-0,73	1,04-1,06	42,0-43,2 мин	1,13-1,15	1,22-1,24	1,29-1,30

В результате реализации данной программы аттестован первичный фармакопейный стандартный образец rIFN-beta1b - ФСО 3.2.00447. Разработана сопроводительная документация - паспорт, инструкция по применению, макет упаковки.

Стабильность ФСО 3.2.00447 исследовали в режиме реального времени по результатам пептидных карт, полученных по разработанной методике. Профиль пептидной карты утратил стабильность через 3 года хранения: наблюдалось отсутствие пиков в диапазоне 51,5-53,5 мин, при этом появлялся пик со временем удерживания 25,42 мин и наблюдалось изменение интенсивности и формы пиков (Рисунок 32). Таким образом, был установлен срок годности ФСО 3.2.00447 - 2 года.

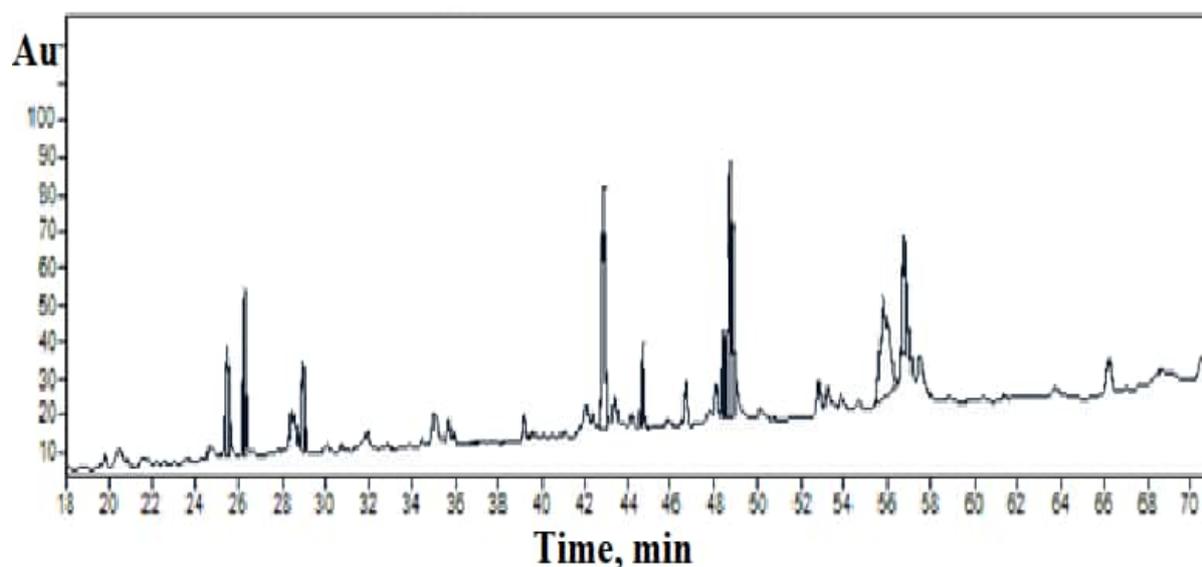


Рисунок 32 - Хроматографический профиль ФСО rIFN-beta1b 3-го года хранения

3.2 Оптимизация оценки подлинности структуры рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa

Оптимизация оценки качества препаратов на основе rFVIIa заключалась в разработке СО, предназначенного для оценки подлинности структуры данного белка. rFVIIa - сложный гликозилированный белок, состоящий из тяжелой и легкой цепей. Согласно монографии ЕФ 01/2015:2534 качество препаратов rFVIIa по показателю «Подлинность» должно быть подтверждено методом пептидного картирования (подлинность аминокислотной последовательности) и методом ионообменной ВЭЖХ (гликановый профиль). В качестве образца сравнения предусмотрено использование образца CRS (EDQM, кат. № Y0001663) [112,120].

В Российской Федерации зарегистрировано 2 препарата rFVIIa: оригинальный препарат «НовоСэвен» производства компании «Ново Нордиск А/С», Дания и отечественный препарат «Коагил-VII» производства АО «Генериум», имеющий статус биоподобного. Данные БЛП были зарегистрированы до 2015 года (год включения монографии 01/2015:2534 в очередное издание ЕФ), в связи с чем оценка качества, согласно утвержденным спецификациям, включала пептидное картирование и не содержала оценку гликанового профиля, требования к которому впервые были указаны в данной монографии.

Таким образом, на момент выполнения работы, производители для оценки аминокислотной последовательности использовали образец CRS, а профиль гликозилирования не был изучен. При этом известно, что профиль гликозилирования биоподобного препарата, формирующийся в процессе биосинтеза технологического процесса другого производителя, может иметь отличия от оригинального препарата или международного стандартного образца, которым является образец CRS [68,73-75,139,145].

Целесообразность разработки и аттестации СО для оценки подлинности структуры rFVIIa продиктована необходимостью обеспечения технологической независимости отечественного производства этого жизненно важного БЛП.

Поскольку отечественное биофармацевтическое производство представлено одним производителем, было принято решение о целесообразности аттестации СО, имеющего статус стандартного образца предприятия. Данный статус предполагает использование СОпр только на одном предприятии в стандартизованных условиях для оценки качества белка, полученного в тех же технологических условиях.

3.2.1 Стандартизация оценки аминокислотной последовательности рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa

Готовая форма препарата rFVIIa не содержит мешающих веществ, в связи с чем оценка подлинности аминокислотной последовательности может быть проведена на стадии готового фасованного продукта - лекарственного препарата. В качестве кандидата СОпр выбрана серия лекарственного препарата rFVIIa с дозировкой 1,2 мг. Качество кандидата СОпр подтверждено согласно спецификации нормативной документации производителя. Поскольку форма выпуска и состав кандидата СОпр rFVIIa полностью соответствовала исходному продукту, существенных изменений спецификации не потребовалось. Исключение составило внесение требования расширенной оценки в виде дополнительной характеристики - верификации аминокислотной последовательности легкой и тяжелой цепей молекулы. Для расширенной оценки использовали метод масс-спектрометрии высокого разрешения ВЭЖХ/МС/МС с ионизацией электрораспылением (ESI) и вторичной ионизацией, инициируемой соударениями (CID).

Легкая цепь rFVIIa содержит семь внутрицепочечных дисульфидных связей, что является сильным структурирующим фактором и, предположительно, может создавать препятствие при ферментативном гидролизе. Для выбора формата гидролитического расщепления молекулы проверили данное предположение путем обработки кандидата СОпр rFVIIa высокоочищенным трипсином согласно протоколу ЕФ01/2015:2534 для пептидного картирования. В качестве

референсной была взята аминокислотная последовательность rFVII, также приведенная в ЕФ [112]. В результате ВЭЖХ-МС-МС анализа была практически полностью верифицирована АК-последовательность тяжелой цепи и около 25% легкой цепи (Рисунок 33).

		A: LC	Monoisotopic mass: 19807.3528	Average mass: 19820.2859	
1	N-term	ANAFLEELRPGSLER EC K EE QCSF EE AREIFKDA ERT KLFWISYSDGDQ C ASS P CQNGGS CKD QLQS	67		
68	YI CF CLPAFEGRN C ETHKDDQLI C VNENGG C EQY C SDHTG T KRS C R C HEGY S LLADGV S CTPT V EY P CGK I P I LE K R	144			
145	N ASK P Q G R	C-term	152		
		B: HC	Monoisotopic mass: 30396.0131	Average mass: 30415.6403	
1	N-term	I V GGK V CPKG E CPWQ V LLLV N GAQ L CG G TL I NT I W V SA A HC F DK I KN W R N L I AV L GE H DL S EH D GD	67		
68	E Q SR R V A Q V I I P S T Y V P GT T N H D I AL L RL H Q P V V LD H V V PL C LP E RT F S E RT L A F V R F S L V SG W Q L LD R G A T A L E	144			
145	L M V L N V PR L MT Q D C L Q SR K V G DS P N I T E Y M F C AG Y SD G SK D SK G DS G PH A TH Y R G T W Y L T G I V SW G Q C AT V GH	221			
222	F G V Y TR V S Q Y I E W L Q LM R SE P RP G V L LR A FP P	C-term	254		

Рисунок 33 - Верификация аминокислотной последовательности пептидов, полученных прямым трипсинолизом кандидата СОпр rFVIIa⁷

Прямой ферментативный гидролиз не позволил верифицировать аминокислотную последовательность всей молекулы. Схема усиленного гидролиза с предварительным дегликозилированием путем ферментативного расщепления N-гликанов пептид-N-гликозидазой F по протоколу ЕФ01/2015:2534 [112] для определения гликанов, а также предварительное восстановление дисульфидных связей и использование высокоочищенного трипсина, позволила верифицировать аминокислотную последовательность кандидата СОпр rFVII со степенью покрытия 99% (Рисунок 34).

		A:LC	Monoisotopic mass: 17911.7888	Average mass: 17923.6223	
1	N-term	ANAFLEELRPGSLER EC K EE QCSF EE AREIFKDA ERT KLFWISYSDGDQ C ASS P CQNGGS CKD QLQ S Y I CF L PA F EG R NC	81		
82	E THKDDQL I C V NENGG C EQY C SDHTG T KRS C R C HEGY S LLADGV S CTPT V EY P CGK I P I LE K R N ASK P Q G R	C-term	152		
		B: HC	Monoisotopic mass: 28054.2294	Average mass: 28072.5251	
1	N-term	I V GGK V CPKG E CPWQ V LLLV N GAQ L CG G TL I NT I W V SA A HC F DK I KN W R N L I AV L GE H DL S EH D GD E Q S RR V A Q V I I P S T	81		
82	Y V P GT T N H D I AL L RL H Q P V V LD H V V PL C LP E RT F S E RT L A F V R F S L V SG W Q L LD R G A T A L E LM V L N V P RL M T Q D C L Q SR K V G DS P N I T	172			
173	E Y M F C AG Y SD G SK D SK G DS G PH A TH Y R G T W Y L T G I V SW G Q C AT V GH F G V Y T R V S Q Y I E W L Q LM R SE P RP G V L LR A FP P	254			

Рисунок 34 - Верификация ак-последовательности пептидов, полученных с помощью усиленного гидролиза кандидата СОпр rFVIIa⁸

⁷Зеленый цвет - подтвержденные участки. Красный цвет - модифицированные АК-остатки легкой цепи

⁸Зеленым цветом выделены подтвержденные участки.

Таким образом, реализация первого этапа аттестации СОпр rFVIIa позволила получить кандидат в СОпр с верифицированной аминокислотной последовательностью.

В качестве методики аттестации использовали методику ЕФ 01/2015:2534, включенную в НД производителя [112]. В качестве предполагаемой аттестованной характеристики рассматривали получение характерной для СОпр пептидной карты с установленными характеристическими пиками. Для получения данной карты провели испытания кандидата СОпр rFVIIa в выбранных условиях в сравнении с образцом CRS и образцом оригинального препарата (Рисунок 35).

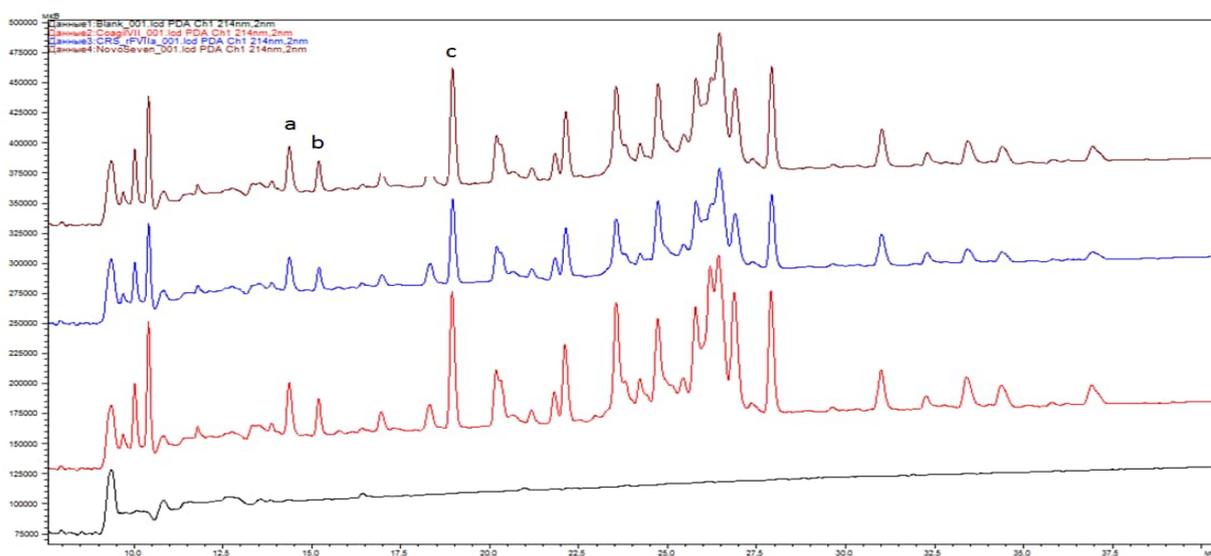


Рисунок 35- Сводная хроматограмма типичных профилей пептидного картирования кандидата СОпр rFVIIa (красный цвет), образца CRS (синий цвет), оригинального ЛП (коричневый цвет), плацебо (черный цвет)

Визуальная оценка профилей всех образцов позволяет сделать вывод об их совпадении вплоть до минорных пиков. В качестве характеристических рассматривались пики в интервале наиболее разрешенной области с временами удерживания от около 12,5 мин до около 20,0 мин. Стабильность времени удерживания ($n=3$, RSD менее 0,5%) и разрешение более 2,0 позволили обозначить три пика (a, b и c).

Далее, методом ВЭЖХ-МС-МС была установлена аминокислотная последовательность пептидов, соответствующая основному пептиду каждого пика:

- пик "a" (время удерживания около 15 мин) верифицированы два пептида: [IPLEK] (цепь А, положение 138-143) и [SEPRPGVLLR] (цепь В, положение 241-250);

- пик "b" (время удерживания около 16 мин) верифицирован пептид [TLAFVR] (цепь В, положение 120-125);

- пик "c" (время удерживания около 20 мин) - пептид [VSQYIEWLQK] (цепь В, положение 228-237).

Далее, стабильность получаемого профиля кандидата СОпр rFVIIa была подтверждена в результате трех независимых испытаний методикой ЕФ01/2015:2534 в условиях воспроизводимости (Рисунок 36).

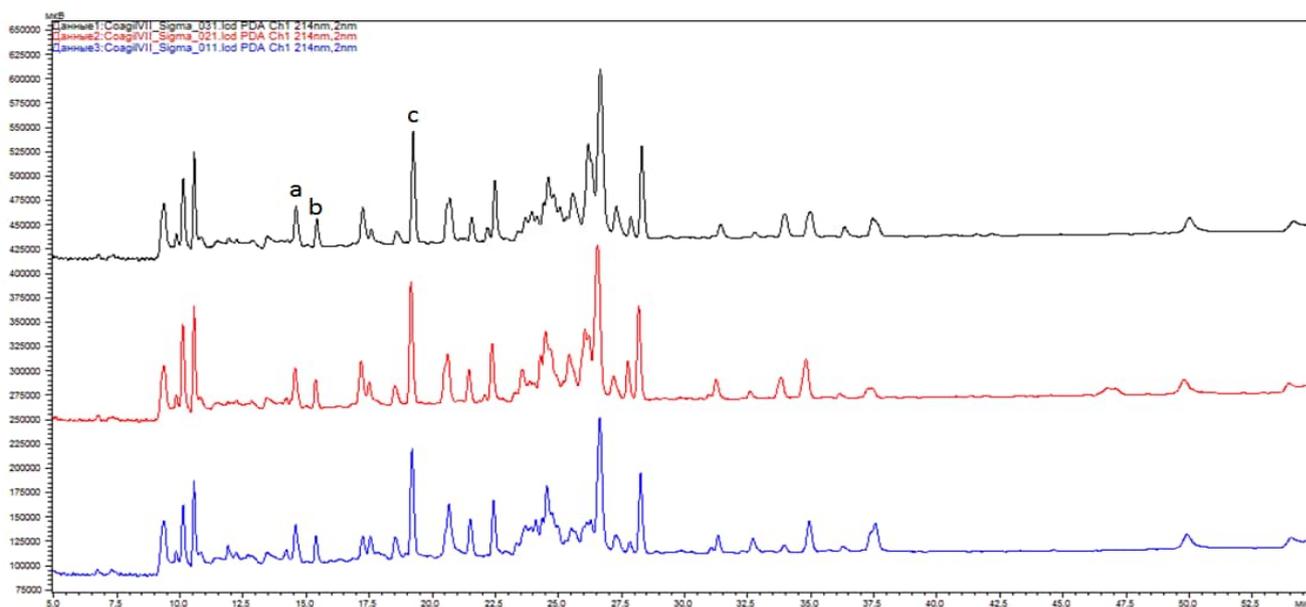


Рисунок 36 - Исследование стабильности профиля пептидной карты кандидата СОпр rFVIIa⁹

В результате проведенных исследований был разработан СОпр rFVIIa для подтверждения подлинности методом пептидного картирования. Аттестованная

⁹Черный, красный и синий цвета - хроматографические профили кандидата в СОпрrFVIIa, полученные в разные дни

характеристика была представлена в виде требования принципиального совпадения профилей пептидных карт образца лекарственного препарата и СОпр rFVIIa, аттестованного в прослеживаемости к международному образцу CRS, а также наличия трех установленных характеристических пиков с ориентировочными временами удерживания около 15,16 и 20 минут соответственно.

3.2.2 Стандартизация оценки гликанового профиля рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa

Характер профиля N-гликозилирования rFVIIa, а именно наличие в составе олигосахаридов фосфатных остатков и N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты является одним из факторов, определяющих его коагуляционную активность [279,406].

В монографии ЕФ 01/2015:2534 изложены следующие требования к профилю гликозилирования rFVIIa: обозначены 12 олигосахаридов (5 незаряженных форм и 7 заряженных - содержащих остаток N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты; приведен способ расчета процентного соотношения заряженных и незаряженных гликанов на основании значений площадей пиков; приведено положение, что величина процентного соотношения должна быть установлена (утверждена) соответствующим регуляторным органом (при регистрации), т.е может быть индивидуальной для каждого белка при условии ее стабильности при посерийном производстве и доказанной активности продукта. Оценку профиля рекомендовано проводить методом анионообменной ВЭЖХ в сравнении с образцом CRS, (EDQM, Y0001663) [120].

На основании этих сведений были разработаны условия оценки гликанового профиля rFVIIa. Ферментативное отщепление N-гликанов проводили с помощью пептид-N-гликозидазы F. Дальнейшую дериватизацию, предусматривающую флуоресцентное детектирование, проводили 2-аминобензамидом (набора GLYKOrper). Принцип разделения полученной реакционной смеси с помощью

анионообменной ВЭЖХ в данном случае состоит в использовании натрия гидроксида для ионизации гидроксильных групп гликанов до оксианионов. Таким образом, модифицированный сахарид удерживается как анион на сорбенте CarboPac, сильном анионообменнике. Ацетат-ион является более сильным элюентом, чем гидроксид-ион и используется для элюирования связанного сахара. Таким образом был выбран состав подвижных фаз для элюирования в градиентном режиме: фаза А – 0,15 М раствор натрия гидроксида; фаза В – 0,15 М раствор натрия гидроксида + 0,5 М раствор натрия ацетата.

В результате воспроизведения данной методики были получены хроматограммы кандидата СОпр rFVIIa, образца CRSи образца оригинального препарата (Рисунок 37).

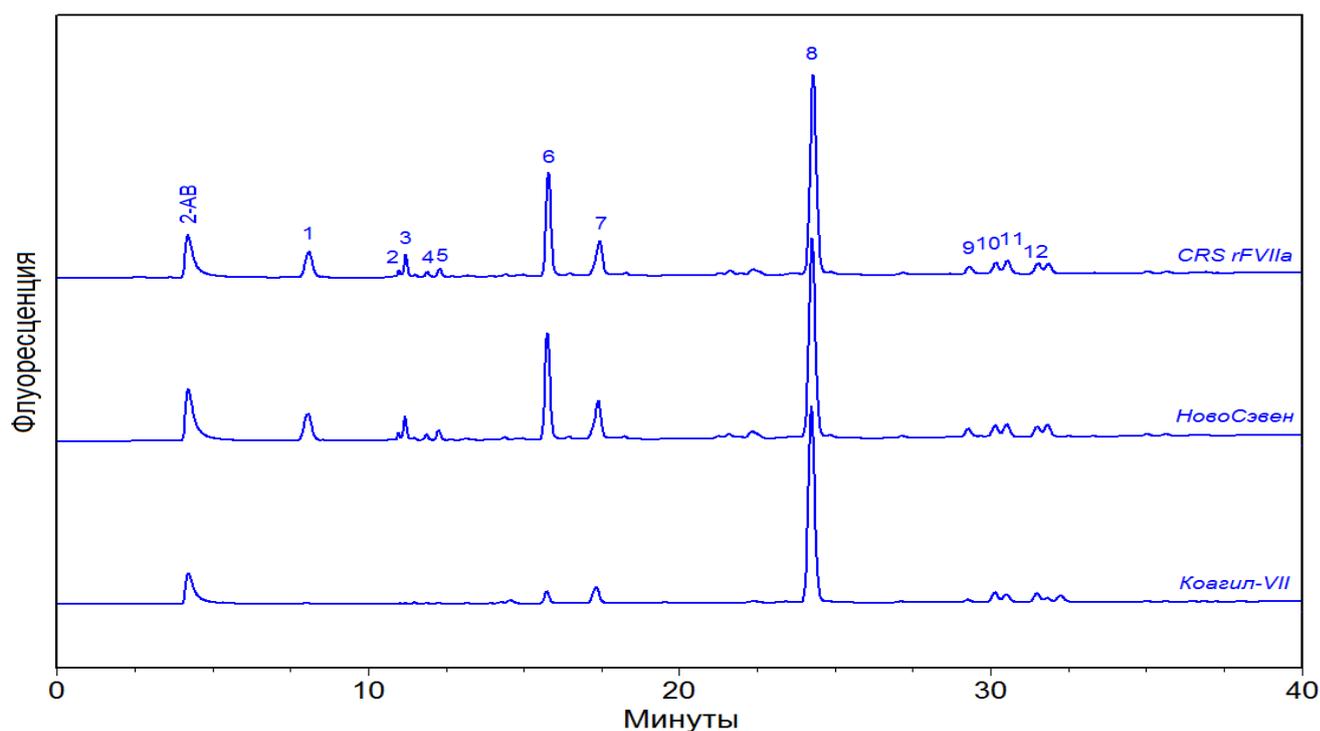


Рисунок 37 – Типичные хроматограммы гликановых профилей образцов CRS (CRS rFVIIa), оригинального препарата (НовоСэвен), кандидата СОпр rFVIIa (Коагил-VII) анионообменной ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием

На всех хроматограммах зарегистрированы двенадцать пиков референтных гликанов, предусмотренные методикой ЕФ 01/2015:2534 (Таблица 14).

Таблица 14 - Процентное содержание референтных гликанов по данным анионообменной ВЭЖХ

Пик	Заряд (наличие карбоксильной группы и/или фосфата)	Структура олигосахарида ¹⁰	Время удерживания пика, мин			Площадь пика, %		
			CRS	Ново Сэвен	СОпр rFVII	CRS	Ново Сэвен	СОпр rFVII
1	нет		8,1	8,1	8,0	7,5	7,0	0,3
2	нет		11,2	11,2	11,2	3,2	3,1	0,1
3	нет	не установлена	11,5	11,5	11,5	0,4	0,4	0,3
4	нет		11,9	11,9	11,9	0,9	0,9	0,2
5	нет		12,3	12,3	12,3	1,5	1,3	0,2
6	есть		15,8	15,8	15,7	20,1	19,9	3,5
7	есть		17,4	17,4	17,3	9,4	9,2	6,1
8	есть		24,3	24,3	24,2	48,9	50,0	73,6
9	есть		29,3	29,3	29,3	2,1	1,8	1,0
10	есть		30,2	30,2	30,1	2,9	2,7	3,7
11	есть		30,5	30,5	30,5	3,1	3,3	3,0
12	есть	не установлена	31,5	31,5	31,5	2,5	2,7	3,2

Времена удерживания 12 референтных пиков всех образцов совпадали, что соответствовало требованию «общий вид хроматограмм исследуемого и стандартного образцов должен совпадать» [116]. Соотношение заряженных и незаряженных форм, рассчитанное по формуле (8) составило для кандидата СОпр rFVIIa 96,1 %; для образца CRS 86, %; для оригинального препарата 89,6%. При этом площади пиков, являющиеся количественной характеристикой гликанов, кандидата СОпр rFVIIa отличалась от оригинального препарата и образца CRS.

Таким образом, в качестве образца сравнения при рутинном подтверждении подлинности гликанового профиля предпочтительно использовать СОпр, для которого необходимо установить структурные особенности, являющиеся причиной данных различий, а также подтвердить должную экспрессию N-

¹⁰Графические обозначения структур олигосахаридов представлены в соответствии с правилами номенклатуры CFG (консорциум функциональной гликомики) [109].

ацетилнейраминовой кислоты (определить степень сиалирования), как основной характеристики гликанового профиля биоподобного препарата.

Для идентификации структуры углеводных фрагментов был выбран метод ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия, предполагающий использование подвижной фазы, совместимой с детектированием в режимах флуоресценции и масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией. Условия отщепления и мечения гликанов соответствовали ранее изложенным и использованным при анионообменном разделении смеси гликанов. Далее проводили разделение на полярной стационарной фазе (силикагеле) с использованием мобильной фазы с высоким содержанием органических растворителей: фаза А - 60 мМ формиат аммония + ацетонитрил (75%); фаза В - 115 мМ формиат аммония + ацетонитрил (54%).

В результате воспроизведения данной методики были получены хроматограммы гликановых профилей в режиме флуоресцентного детектирования и результаты идентификации пиков методом масс-спектрометрического анализа. Далее были изучены временные зависимости масс-спектров и спектров флуоресценции, регистрируемые при хроматографическом разделении смеси N-гликанов - идентифицированные пики были соотнесены с профилем интенсивности излучения флуоресценции образцов кандидата СОпр rFVIIa, образца CRS и оригинального препарата (Рисунки 38-40).

Результаты хроматографического разделения отщепленных гликанов кандидата СОпр rFVIIa и образца CRS, полученные методикой ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия, так же как и профили, полученные методикой ионообменной ВЭЖХ, имеют принципиально похожий профиль. Вместе с тем, хроматограмма кандидата СОпр rFVIIa видимо отличалась по интенсивности наблюдаемых пиков. Подобно представленному на рисунке 37, профиль гликанов этого образца демонстрировал один основной пик, составляющий более 70% от общего содержания.

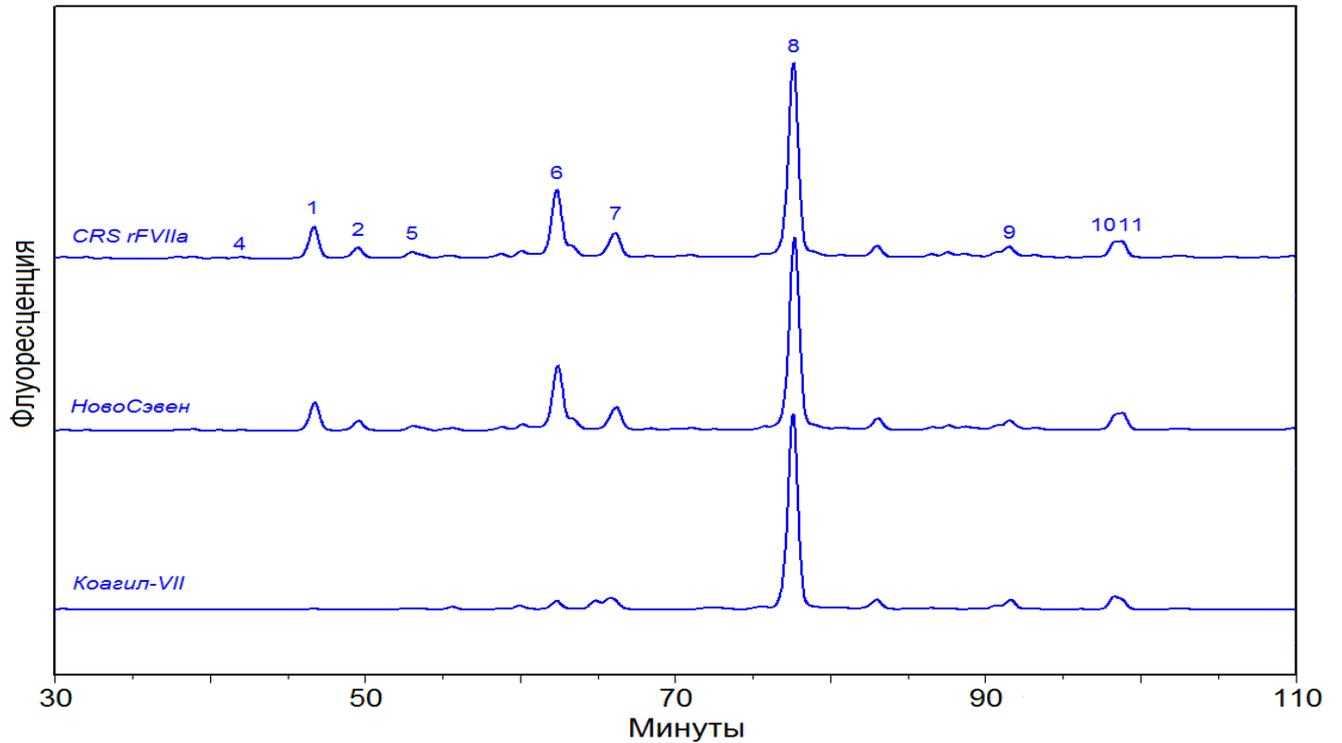


Рисунок 38 – Типичные хроматограммы гликановых профилей образцов CRS (CRS rFVIIa), оригинального препарата (НовоСэвен), кандидата СОпр rFVIIa (Коагил-VII) методом гидрофильной ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием

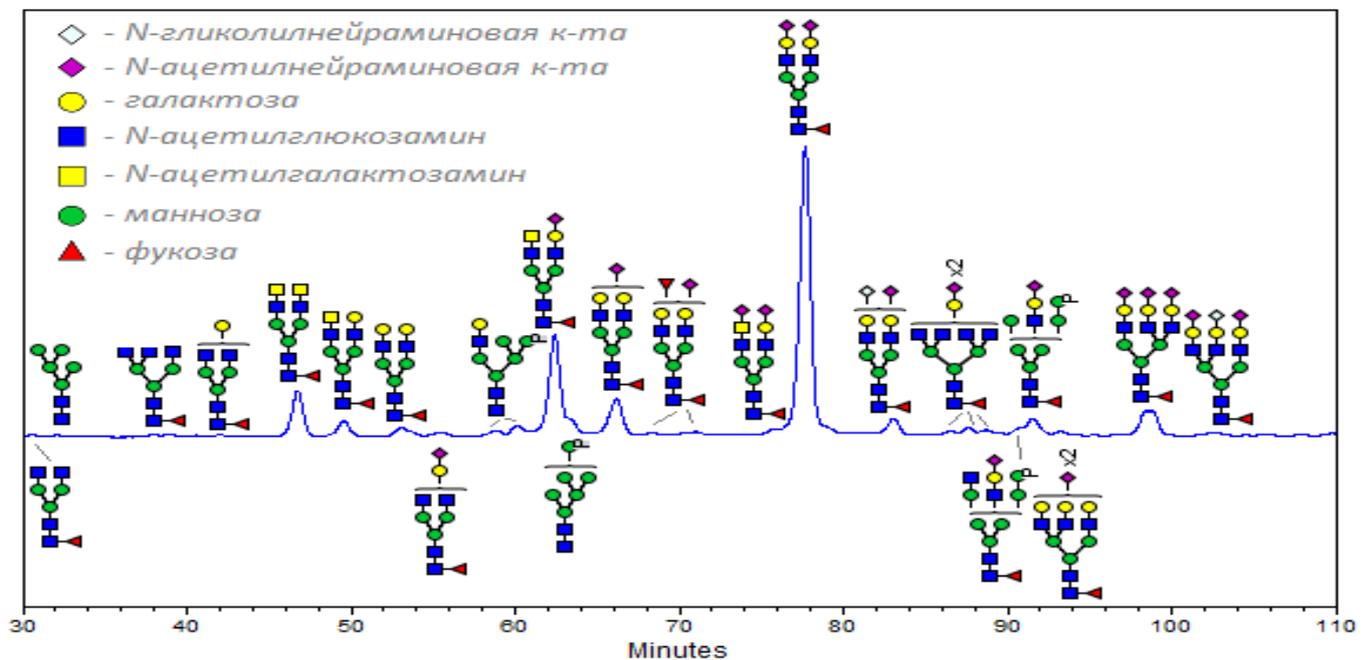


Рисунок 39 – Соотношение результатов разделения смеси гликанов методом ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия и идентифицированных МС-детектированием структур гликанов образца CRS

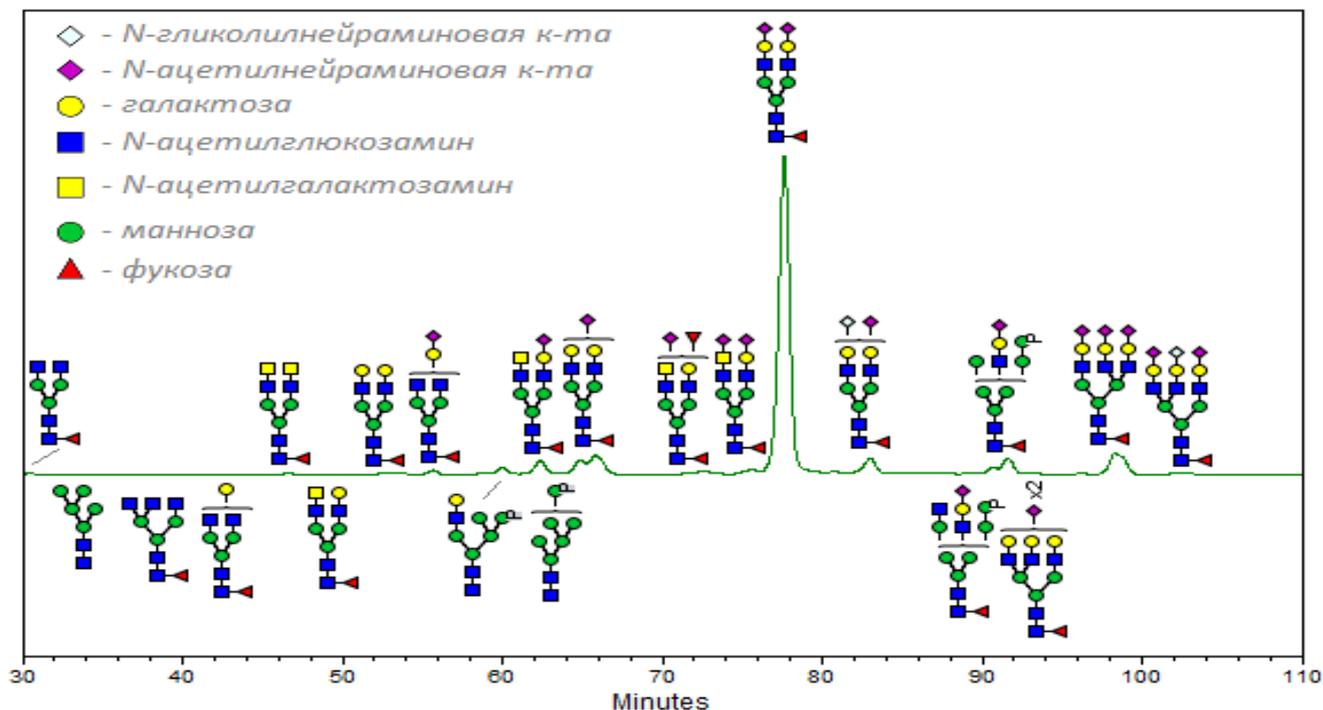


Рисунок 40 – Соотношение результатов разделения смеси гликанов методом ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия и идентифицированных МС-детектированием структур гликанов СОпр rFVIIa

Как следует из рисунков 39 и 40 в профиле кандидата в СОпр rFVIIa обнаружена и идентифицирована 21 олигоформа гликанов. Состав установленных форм был аналогичен составу образца CRS. Последовательности выхода нейтральных (пики до 54 минуты) и заряженных гликанов, содержащих в структуре сиаловую кислоту и фосфат, идентичны. Образцы демонстрируют одинаковые времена удерживания пиков. Профиль содержит 12 гликоформ, идентификация которых рекомендована Европейской фармакопеей (Таблица 14). Таким образом, можно утверждать, что подлинность гликанового профиля кандидата в СОпр rFVIIa подтверждена на соответствие структурам, изложенным в монографии ЕФ 01/2015:2534. При этом масс-спектрометрическое детектирование продуктов хроматографического разделения кандидата СОпр rFVIIa и образца CRS позволило выявить различие в составе углеводных остатков при совпадении структур остатков, выявляемых в обоих препаратах.

Основной набор модификаций гликанов обоих образцов представляет собой

биантенные олигосахариды. Триантенные олигосахариды присутствуют в незначительном количестве. Данные результаты соответствуют данным научной литературы [199,296]. К особенностям кандидата СОпр rFVIIa можно отнести характерную дисиалированную олигоформу, состоящую из 4-х остатков N-ацетилглюкозамина, 3-х маннозных и 2-х галактозных остатков, существенно превосходящую количественно остальные гликаны. Данное отличие является основной причиной различия профилей биоподобного образца (кандидата в СО) и образца CRS полученных анионообменной и гидрофильной ВЭЖХ.

В целом, большая часть гликанов обоих образцов обладает зарядом в виде остатков α 2,3-связанной N-ацетилнейраминовой кислоты. Характерным структурным элементом является фукоза ((α 1,6)-фукозилирование) и β -галактоза. Согласно данным научной литературы [243], в связи с возможным иммуногенным действием и риском индукции ингибирующих антител, к нежелательным структурным элементам относятся остатки N-гликолилнейраминовой кислоты и антигена углеводной природы Gal(α 1,3)-Gal, характерные для гликопрофилей рекомбинантных белков, полученных с использованием клеток ВНК. В исследуемых образцах данные элементы представлены в количестве менее 1,0% от общего числа идентифицированных остатков. Стабильность профиля гликанов rFVIIa отечественного производителя, а также стабильность профиля кандидата СОпр rFVIIa исследовали в условиях воспроизводимости (2 испытания в 2-х лабораториях) с использованием новой серии rFVIIa по методике, соответствующей ЕФ01/2015:2534 - анионообменной ВЭЖХ (Рисунки 41,42).

Для оценки стабильности полученных результатов был проведен анализ хроматографических параметров (времени удерживания и площади пика), подтвердивший стабильность профилей, получаемых на разных сериях rFVIIa в условиях воспроизводимости - RSD времени удерживания не превышало 1%; RSD площадей пиков не превышало 0,6% (Таблица 15).

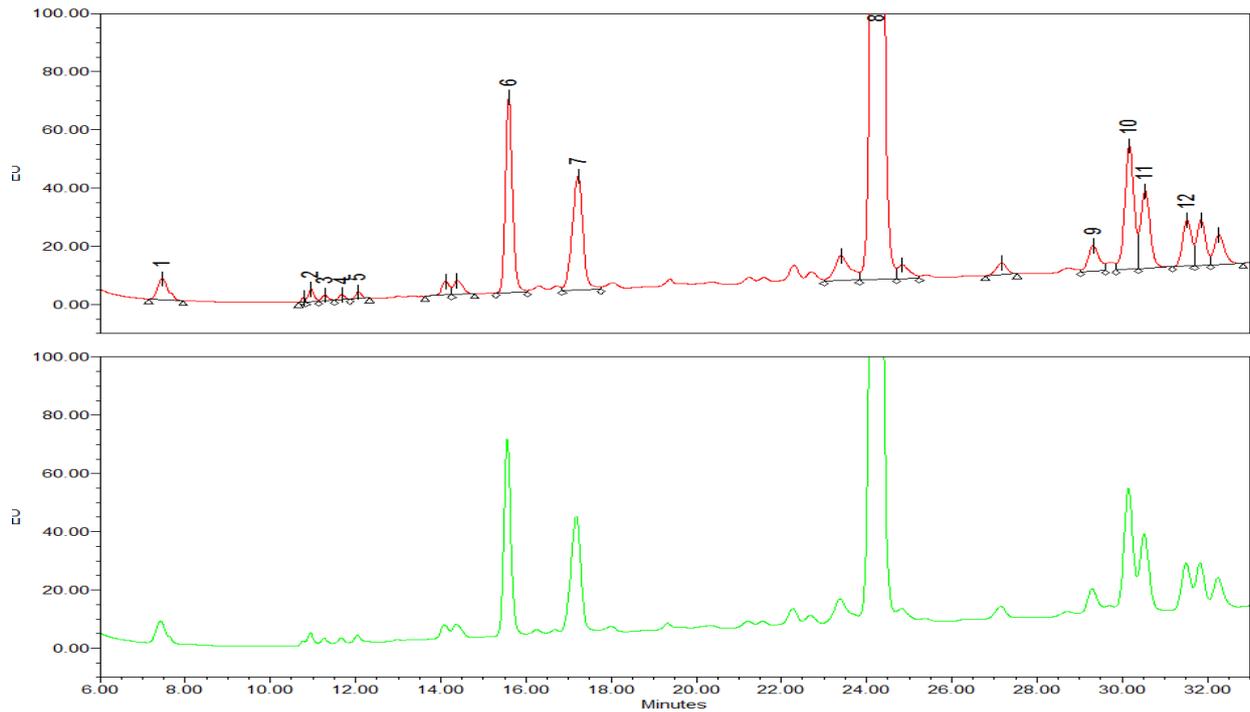


Рисунок 41 – Хроматографические профили кандидата СОпр гFVIIa (красная линия) и серия гFVIIa (зеленая линия) полученные методикой анионообменной ВЭЖХ в лаборатории 1

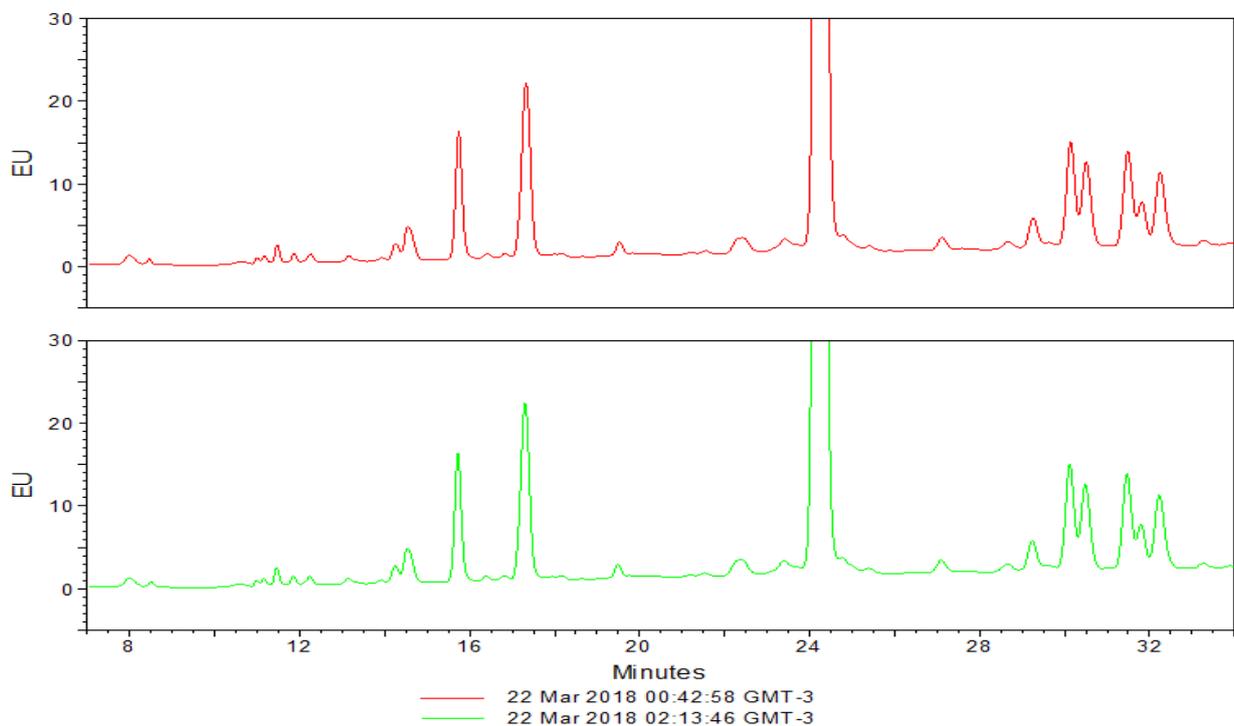


Рисунок 42 – Хроматографические профили кандидата СОпр гFVIIa (красная линия) и серия гFVIIa (зеленая линия) полученные методикой анионообменной ВЭЖХ в лаборатории 2

Таблица 15- Оценка стабильности результатов оценки гликанового профиля гFVIIa методом анионообменной ВЭЖХ

№ Пика	Лаборатория 1				Лаборатория 2				RSD времени удерживания, %	RSD площади пика, %
	серия гFVIIa		СОпр		серия гFVIIa		СОпр			
	Время удерживания, мин.	Площадь пика, %								
1	8,0	0,3	8,1	0,3	7,8	0,3	7,9	0,3	0,13	0
2	11,2	0,1	11,2	0,1	11,04	0,2	11,03	0,2	0,86	0,38
3	11,5	0,3	11,5	0,4	11,3	0,3	11,3	0,3	1,01	0,15
4	11,9	0,2	11,9	0,3	11,7	0,1	11,7	0,1	0,98	0,55
5	12,3	0,2	12,3	0,2	12,3	0,1	12,2	0,1	0,41	0,38
6	15,7	3,5	15,8	3,6	15,7	4,2	15,7	4,2	0,32	0,1
7	17,3	6,1	17,4	6,1	17,3	5,8	17,4	5,8	0,33	0,03
8	24,2	73,6	24,2	73,7	24,2	73,5	24,2	73,5	0	0,001
9	29,3	1,0	29,3	1,1	29,3	1,2	29,3	1,2	0	0,08
10	30,1	3,7	30,2	3,7	30,1	3,7	30,2	3,7	0,19	0
11	30,5	3,0	30,5	3,0	30,5	2,9	30,5	2,9	0	0,02
12	31,5	3,2	31,5	3,2	31,5	3,4	31,5	3,4	0	0,03

В результате был разработан СОпр rFVIIa для подтверждения подлинности препарата Коагил VIIa методом пептидного картирования и методом карбогидратного картирования. Установление срока годности было оставлено на усмотрение производителя. Рекомендованные параметры - мониторинг стабильности пептидной карты и гликанового профиля в режиме реального времени.

Резюме

В результате исследований по практическому применению требований к разработке и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков была оптимизирована оценка качества субстанций rINF-alfa2b, rINF-beta1b и rFVIIa по показателю «Подлинность» методом пептидного картирования.

Оптимизация заключалась в разработке и реализации индивидуальных программ аттестации вышеуказанных стандартных образцов. Все индивидуальные программы были основаны на разработанном ранее алгоритме и включали этапы выбора и/или разработки кандидата в СО, определения его статуса, составления спецификации на кандидат СО, верификации структуры молекулы белка, выбора/разработки методики аттестации, собственно аттестации, установления срока годности, разработки сопроводительной документации.

Особенности аттестации ФСО 3.2.00433rINF-alfa2b (Met) были обусловлены отсутствием международного СО и наличием всего 2-х отечественных производителей (потенциально заинтересованных потребителей ФСО). В связи с этим в инструкцию по применению ФСО 3.2.00433 включено описание метода пептидного картирования с указанием активности трипсина, типичной пептидной карты и диапазонов относительных времен удерживания характеристических пиков. В результате ФСО 3.2.00433 аттестован как первичный, предназначен для оценки качества субстанций rINF-alfa2b (Met) 2-х производителей и внедрен на

данных предприятиях (Приложение 1, акты внедрения ООО «Фармаклон» от 30.12.2021 и ООО «Фармапарк» от 20.09.2021).

Особенности аттестации ФСО 3.2.00456 rINF-alfa2b (no-Met) заключались в обеспечении прослеживаемости к образцу CRS (EDQM, I0320301) и возможности его использования на 5-ти отечественных предприятиях, производящих данную субстанцию. В связи с этим, аттестованная характеристика имеет вид рекомендованных параметров оценки пептидной карты испытываемого образца по относительным временам удерживания характеристических пиков и диапазона соотношения площадей основного характеристического пика, полученного для стандартного и испытываемого образца при одинаковой исходной нагрузке по белку. Также инструкция по применению содержит информацию о возможности использования ФСО при оценке качества соответствующей субстанции методами изофокусирования, электрофореза в ПААГ и ВЭЖХ в соответствии с методиками ЕФ 07/2015:1110 (Приложение 2, акт внедрения ООО «Ферон» от 22.01.2024).

Особенности аттестации ФСО 3.2.00447 rINF-beta-1b, так же, как и rINF-alfa2b (Met), заключались в отсутствии международного СО, наличии всего 2-х отечественных производителей и отсутствии методики пептидного картирования. ФСО 3.2.00447 аттестован как первичный СО с аттестованной характеристикой, представленной диапазонами относительных времен удерживания характеристических пиков (Приложение 3, акт внедрения АО «ГЕНЕРИУМ» от 15.09.2021).

Особенности аттестации СОпр для подтверждения подлинности структуры rFVIIa заключались в наличии одного отечественного производителя и обусловленного этим обстоятельством выбранного статуса СО, а также в обеспечении прослеживаемости с образцом CRS (EDQM, Y0001663). Кроме того, необходимо было установить для воспроизведенного препарата, которым является отечественный rFVIIa, характерный профиль гликозилирования. В результате был разработан СОпр для подтверждения подлинности препарата

Коагил VIIa методом пептидного картирования и методом карбогидратного картирования (акт внедрения ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» от 25.04.2019).

Таким образом, на основании алгоритма аттестации, были разработаны и реализованы индивидуальные программы аттестации стандартных образцов различного статуса, предназначенные для оценки качества рекомбинантных терапевтических белков, имеющих различные структурные особенности.

ГЛАВА 4. Оптимизация оценки вспомогательных веществ. Разработка унифицированных методик

Обязательная количественная оценка вспомогательных веществ, входящих в состав БЛП, ввиду разнообразия данных веществ, а также методик их анализа, является регулярным источником проблемных вопросов лабораторной фармацевтической экспертизы, связанных с техническими аспектами воспроизведения индивидуальных методик фирм. Исключения 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, ряд фармакопейных методик, предназначенных для оценки вспомогательных веществ, например, количественного определения ионов алюминия, фенола, тиомерсала и т.д. 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 отдает предпочтение использованию высокотехнологичного оборудования - газовой и жидкостной высокоэффективной хроматографии, атомно-абсорбционной спектрометрии, масс-спектрометрического анализа.

В ходе экспертизы в рамках регистрации прослеживалась устойчивая тенденция отказа ряда ведущих производителей от традиционных фармакопейных методик в пользу методик на основе методов ВЭЖХ, ГЖХ и ААС. Ввиду наличия на рынке нескольких крупных производителей оборудования, большого разнообразия моделей, их комплектации и технического оснащения, а также регулярного совершенствования парка лабораторной техники, существенно усложняется проведение лабораторной фармацевтической экспертизы на

лабораторной базе регуляторного органа, поскольку задача экспертизы - оценить адекватность и воспроизводимость методики, изложенной в проекте нормативной документации, в точном соответствии с ее описанием. И, в дальнейшем, при введении БЛП в Гражданский оборот, данные технические сложности проявляются в ходе обязательной процедуры подтверждения соответствия качества образцов в аккредитованных лабораториях.

В связи с этим, решение задачи по разработке высокотехнологичных унифицированных методик оценки вспомогательных веществ является актуальным направлением совершенствования методологии оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов.

4.1 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. Одним из условий унифицированной методики было прямое детектирование полисорбата 80, без предварительной дериватизации до олеиновой кислоты или ее производных, с целью исключения зависимости выбора реагента для калибровочной характеристики от реагента, используемого при производстве препарата [262].

В качестве объектов исследования были выбраны препараты разных групп БЛП: рекомбинантный фактор свертывания крови (образцы 1-4), вакцины (образцы 5-7), препарат интерферона (образец 8), препарат моноклонального антитела (образец 9) и иммуноглобулин человека нормальный (образец 10)¹¹.

Особенностями данных препаратов, потенциально значимыми для эффективности хроматографического разделения, являются:

-отличие молекулярных масс действующих веществ (от около 19 кДа до 280 кДа) от молекулярной массы полисорбата 80 (около 26 кДа);

¹¹ Здесь и далее в разделе 4.1 смотреть разделы «Материалы исследования» и «Методы исследования», «К ГЛАВЕ 4, разделу 4.1».

- различия в концентрациях белка (от 0,04 до 220 мг/мл) и концентрации полисорбата 80 (от 0,05 до 1,5 мг/мл);

- наличие в составе веществ, влияющих на разделение и/или УФ-детектирование.

На основании того, что молекулярные массы действующих веществ большинства препаратов и полисорбата 80 отличаются существенно, за основу был выбран метод эксклюзионной ВЭЖХ, предназначенный для разделения смеси компонентов в зависимости от их молекулярных масс. Исследовали возможности хроматографических колонок TSKgel SW на основе стационарной фазы в виде диоксида кремния (силикагеля) дериватизированного лигандами с диольными функциональными группами. Данные колонки имеют длительную практику применения в эксклюзионном хроматографическом анализе нуклеиновых кислот, белков и пептидов. Основные характеристики колонок приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Характеристики хроматографических колонок

Наименование	Размер частиц, μm	Размер пор, Å	Рекомендуемый диапазон молекулярных масс компонентов разделения, кДа
G2000SW _{XL}	5	125	5-150
G3000SW _{XL}	5	250	10-500
G4000SW _{XL}	8	450	20-10000

В качестве подвижной фазы был выбран 0,1М фосфатный буферный раствор рН 6,7 (рекомендации производителей хроматографических колонок). В качестве рабочей длины волны детектирования выбрана $\lambda_{234\text{нм}}$. Этот выбор основан на двух основных максимумах 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.

Для отработки условий эксклюзионного хроматографического анализа использовали раствор полисорбата 80 с концентрацией 2 мг/мл - образец 12, а

также образцы препаратов разных групп БЛП и разных молекулярных масс действующих веществ:

- Образец 1: мороктоког альфа около 170 kDa, содержание белка от 14,4 до 332,0 мкг/флакон в зависимости от дозировки, содержание полисорбата 80 от 0,2 до 0,6 мг/флакон;

- Образец 6: вакцина пневмококковая 13-ти валентная адсорбированная, белок CRM₁₉₇ около 60 kDa, возможное содержание свободного белка (не более 30% от общего белка) от 12,9 до 25,8 мкг/мл, содержание полисорбата 80 от 0,14 до 0,24 мг/мл.

Образец 1, представляющий лиофилизат, восстанавливали в 5 мл воды очищенной. Образец 6, содержащий конъюгаты 13 серотипов пневмококковых полисахаридов, конъюгированных с рекомбинантным дифтерийным анатоксином (CRM₁₉₇) и адсорбированных на геле гидроксида алюминия, предварительно центрифугировали при 8000 об/мин для осаждения адсорбированных конъюгатов, используя для хроматографического анализа супернатант.

Далее экспериментальным путем, на основании эффективности разделения и рекомендаций производителя, были подобраны объем пробы 20 мкл, скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин, температура колонки - 25⁰С.

Предварительные результаты разделения, оцениваемые по фактору асимметрии пика полисорбата 80 (образец 15 - 0,1 мг/мл) и фактору разрешения пиков полисорбата 80 и ближайших пиков компонентов образцов 1 и 6, показали, что предпочтительно использование колонки TSKgel G2000S WXL. При этом разрешение между пиком полисорбата 80 и ближайшим пиком компонентов образца составило 4,5 (образец 1) и 3,9 (образец 6), что соответствует международным и отечественным фармакопейным требованиям «фактор разрешения не менее 1,5», а фактор асимметрии пика полисорбата 80 «более 2» не соответствовал вышеуказанным требованиям «0,8 - 1,5» (Рисунок 43) [41,44].

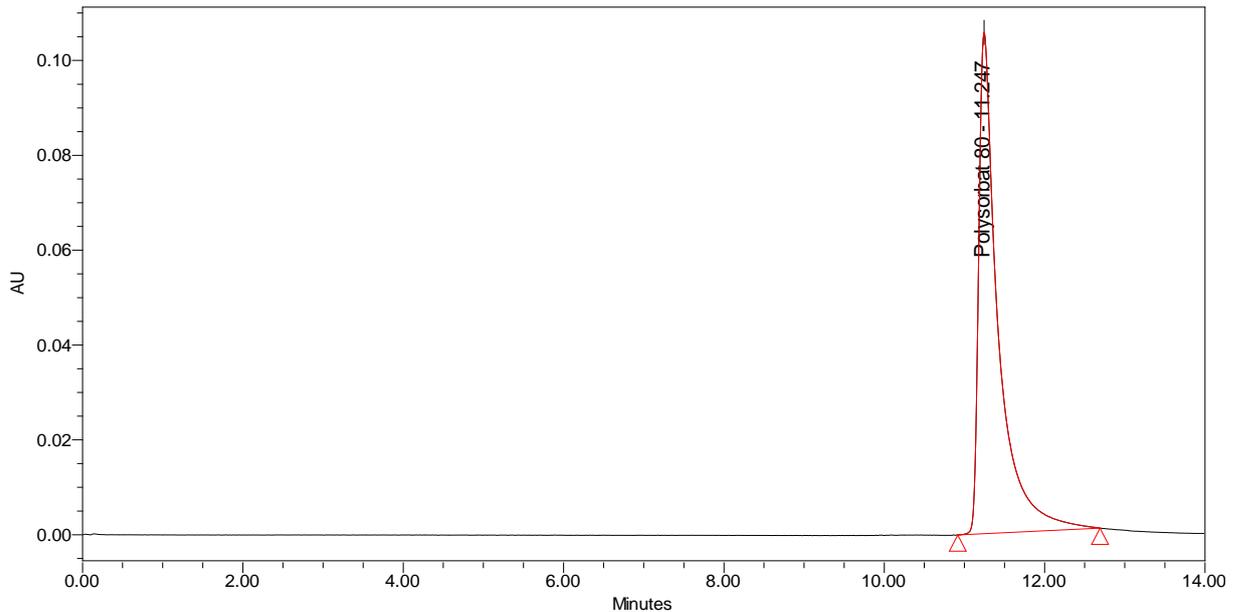


Рисунок 43 - Типичная хроматограмма стандартного раствора полисорбата 80 (образец 15) с концентрацией 0,1 мг/мл. Фактор асимметрии 2,7

Поскольку в качестве подвижной фазы использовали типичный для БЛП состав - фосфатный буферный раствор с добавкой натрия хлорида или натрия сульфата со значением рН около 7,0, предположили, что несимметричность пика может быть обусловлена низкой критической концентрацией мицеллообразования полисорбата 80 в водных растворах [205]. Добавление в состав подвижной фазы 0,1% раствора натрия додецилсульфата позволило получить пики с достаточной симметричностью - не более 1,5 (Рисунки 44,45).

Выбор аналитического диапазона методики зависит от чувствительности конкретного оборудования и диапазона содержания анализируемого вещества в исходных образцах.

В связи с этим была исследована линейность зависимости площади пика от концентрации полисорбата 80 (образец 13) в диапазоне от 0,02 мг/мл до 0,2 мг/мл ($n=3$, RSD менее 2%), охватывающим нижние значения диапазона содержания полисорбата 80 в БЛП (0,05 - 1,5 мг/мл). В результате было показано, что зависимость площади пика от концентрации полисорбата 80 имеет

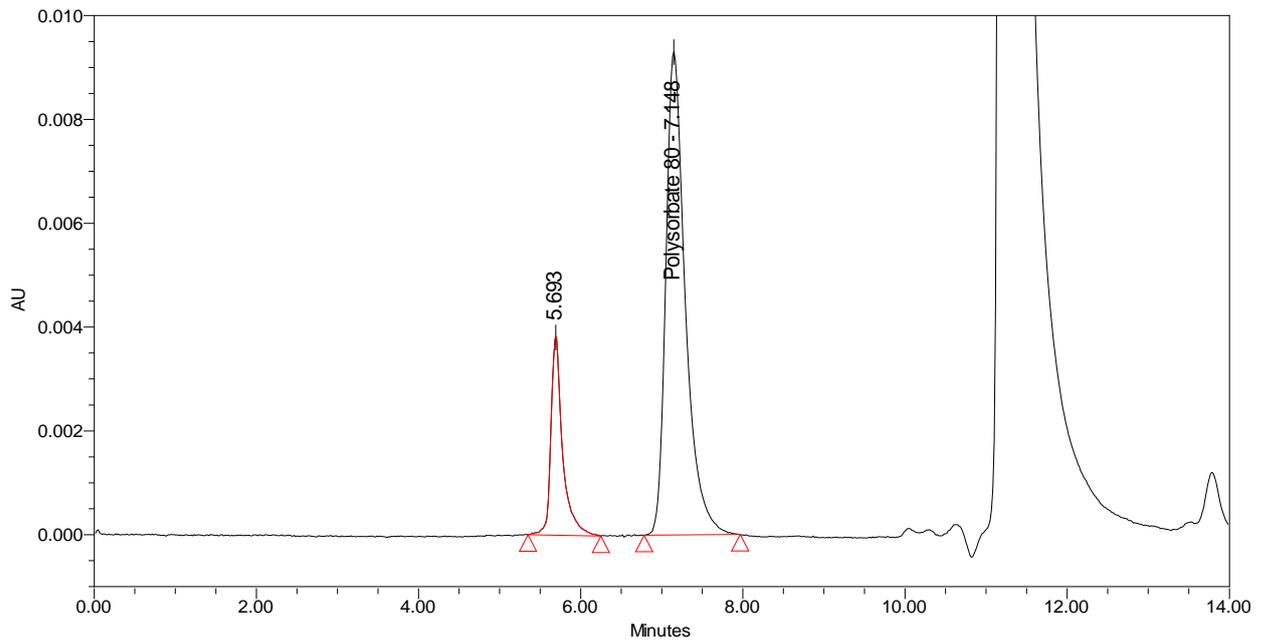


Рисунок 44 - Типичная хроматограмма образца 1 с использованием подвижной фазы, содержащей 0,1 % раствор натрия додецилсульфата: фактор асимметрии пика полисорбата 80 - 1,5

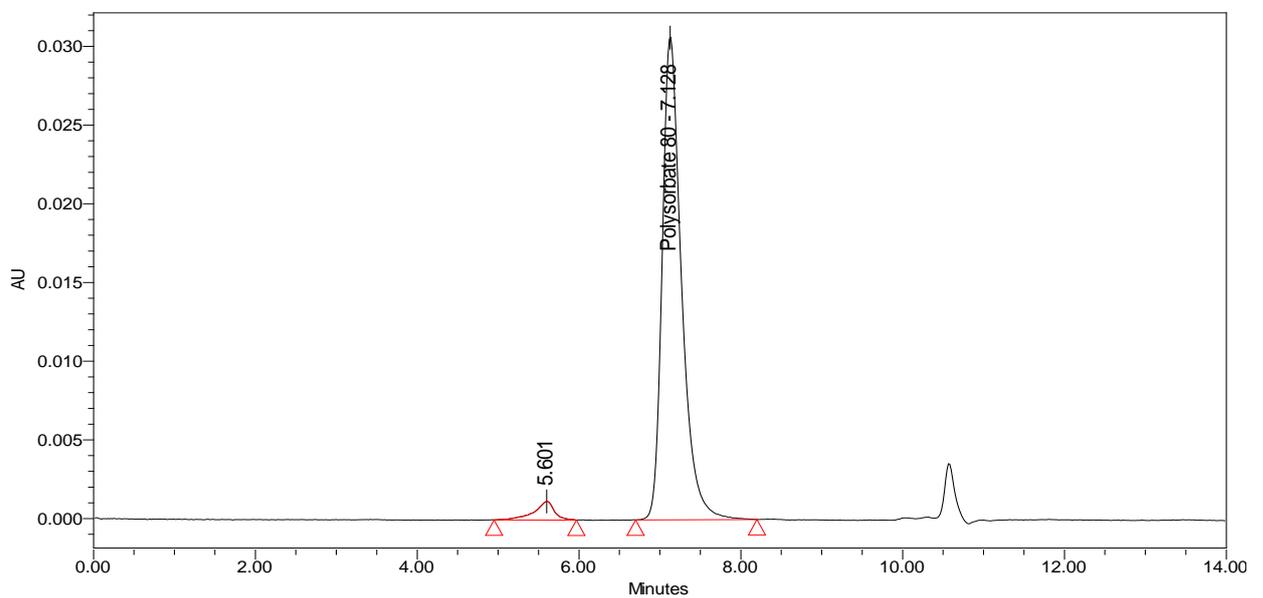


Рисунок 45 - Типичная хроматограмма образца 6 с использованием подвижной фазы, содержащей 0,1 % раствор натрия додецилсульфата: фактор асимметрии пика полисорбата 80 - 1,4

линейный характер (коэффициент детерминации $R^2=1$) (Рисунок 46). Далее данный диапазон использовали в качестве калибровочного.



Рисунок 46 - Оценка линейности аналитического диапазона

Таким образом, лучшие результаты были получены в следующих условиях: Колонка TSKgel G2000SWXL; скорость потока 1,0 мл/мин; длина волны 234 нм; температура термостата колонки 25 °С; объем пробы 20 мкл; состав подвижной фазы: фосфатный буферный раствор 0,1М (рН6,7) с добавлением 0,1% раствора натрия додецилсульфата.

Для предварительной оценки пригодности разработанных условий методики, помимо установления основных валидационных характеристик методики описанных далее, был проведен сравнительный анализ результатов количественного определения полисорбата 80 в образцах 1 и 6 двумя способами: разрабатываемой методикой эксклюзионной ВЭЖХ и валидированными методиками фирм, указанными в НД на данные препараты. Для образца 1 – это методика, основанная на спектрофотометрическом определении окрашенного комплекса полисорбата 80 с кобальт тиоционатом аммония, после экстракции дихлорметаном, при $A_{620\text{нм}}$; для образца 6 - методика ОФ-ВЭЖХ с

предварительной дериватизацией моноолеата путем щелочного гидролиза в олеиновую кислоту (Таблица 17).

Таблица 17 - Сравнительный анализ результатов количественного определения полисорбата 80 методиками фирм и методикой эксклюзивной ВЭЖХ

Образец	Содержание полисорбата 80 в соответствии с требованиями НД	Содержание полисорбата 80, определенное методикой фирмы	Содержание полисорбата 80, определенное методикой эксклюзивной ВЭЖХ
Образец 1, 250 МЕ	0,2-0,6 мг/флакон	0,4 мг/флакон	0,4 мг/флакон
Образец 1, 500 МЕ		0,3 мг/флакон	0,3 мг/флакон
Образец 1, 1500 МЕ		0,3 мг/флакон	0,3 мг/флакон
Образец 1, 2000 МЕ		0,3 мг/флакон	0,4 мг/флакон
Образец 6	0,14 - 0,24 мг/мл	0,18 мг/мл	0,21 мг/мл

Результаты, полученные методикой эксклюзивной ВЭЖХ, соответствуют требованиям НД и согласуются с результатами, полученными с применением методик фирм. На основании этих данных, а также симметричности пика полисорбата 80, достаточного разрешения с пиками сопутствующих компонентов, линейности аналитической области методики (калибровочной характеристики) была показана пригодность разработанных условий прямого хроматографического разделения и детектирования полисорбата 80 для образцов 1 и 6, в которых белок и полисорбат 80 обладают различием молекулярных масс (в 6,5 и 2,3 раза). При этом содержание полисорбата 80 выше содержания белка в ~1,8 раз или в ~14 раз (в зависимости от дозировки и типа образца) не оказывало влияния на разделение.

Далее, для изучения возможности применения разработанных условий количественной оценки содержания полисорбата 80, были использованы БЛП разных групп (Таблица 18).

Таблица 18 - Характеристика образцов БЛП (по величине молекулярной массы белкового компонента, количеству белкового компонента и полисорбата 80) и результаты определения полисорбата 80 методикой эксклюзионной ВЭЖХ

Образец/ молекулярная масса	Требования НД к содержанию белка	Содержание полисорбата 80	Методика определения полисорбата 80, указанная в нормативной документации производителя	Результат определения полисорбата 80 методикой эксклюзионной ВЭЖХ
Образец 2/ около 50 кДа	1,0 - 1,3 мг/флакон	Около 0,07 мг/мл (заявлено в составе, не контролируется)	Отсутствует	0,095 мг/мл
Образец 3/ около 166 кДа	0,025 - 0,035 мг/флакон	Около 0,4 мг/флакон (заявлено в составе, не контролируется)	Отсутствует	0,36 мг/флакон
Образец 4/ около 280 кДа	Не менее 0,04 мг/флакон	0,5-1,5 мг/флакон	Спектрофотометрическое определение комплекса полисорбата 80 с аммоний- кобальта тиоционатом	1,0 мг/флакон
Образец 5/ нет данных	Не более 30 мкг/0,5 мл	Не более 500 мкг/0,5 мл	ОФ-ВЭЖХ	210 мкг/0,5 мл
Образец 7/ нет данных	Не более 50 мкг/0,5 мл	Около 250 мкг/0,5 мл(заявлено в составе, не контролируется)	Отсутствует	300 мкг/0,5 мл
Образец 8/ около 19,3 кДа	Не контролируется. Дозировке 3 млн МЕ соответствует около 0,04 мг/мл белка	Около 0,1 мг/мл (заявлено в составе, не контролируется)	Отсутствует	Приемлемое разрешение между пиками «Белок» и «Полисорбат 80» отсутствует
Образец 9/ около 148 кДа	90-110 мг/мл	0,5-1,5 мг/мл	ОФ-ВЭЖХ продуктов щелочного гидролиза	Приемлемое разрешение между пиками «Белок» и «Полисорбат 80» отсутствует

Окончание таблицы 18				
Образец 10/ около 150-170 кДа	180-220 мг/мл	8,0-30,0 мкг/мл	Спектрофотометрическое определение оптической плотности фазы дихлорметана после осаждения белка аммония ацетатом	Приемлемое разрешение между пиками «Белок» и «Полисорбат 80» отсутствует

Анализ результатов, представленных в таблице 18 и на типичных хроматограммах препаратов различных групп БЛП (Рисунки 47-51), позволил сделать следующее обобщение: эффективное разделение пиков белка и полисорбата 80 наблюдалось для образцов 2-7, где молекулярная масса белкового компонента выше молекулярной массы полисорбата 80 более чем в 2 раза (при наличии данных), а содержание белка примерно на порядок ниже содержания полисорбата 80.

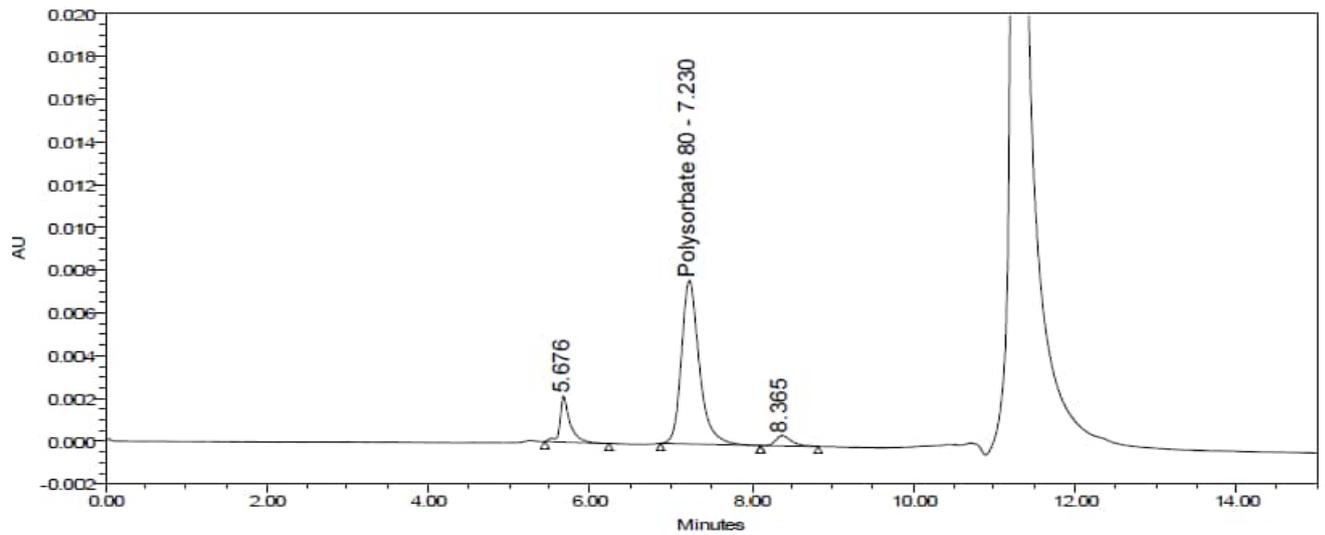


Рисунок 47 -Определение полисорбата 80 в образце 3 (rFVIII, турокторог альфа)

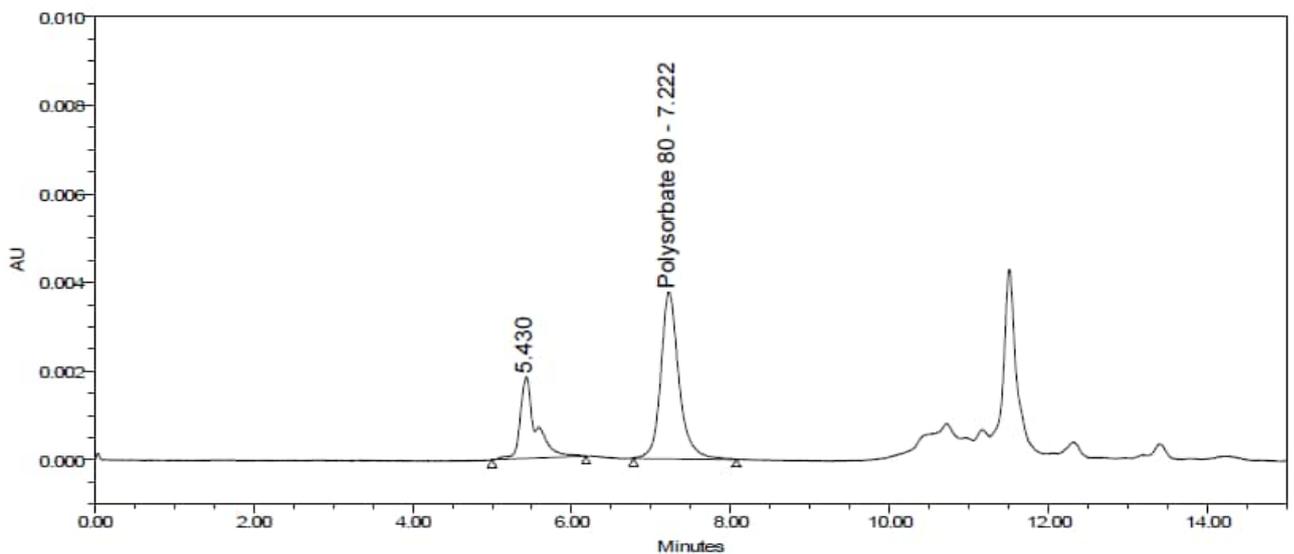


Рисунок 48 - Определение полисорбата 80 в образце 5 (вакцина полиомиелитная)

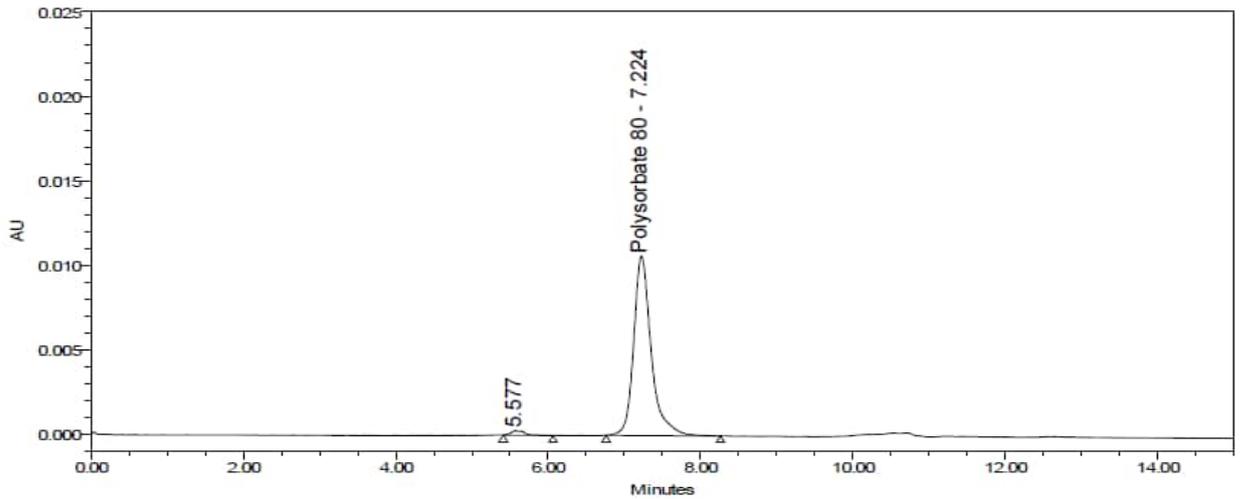


Рисунок 49 - Определение полисорбата 80 в образце 7 (вакцина для профилактики коронавирусной инфекции)

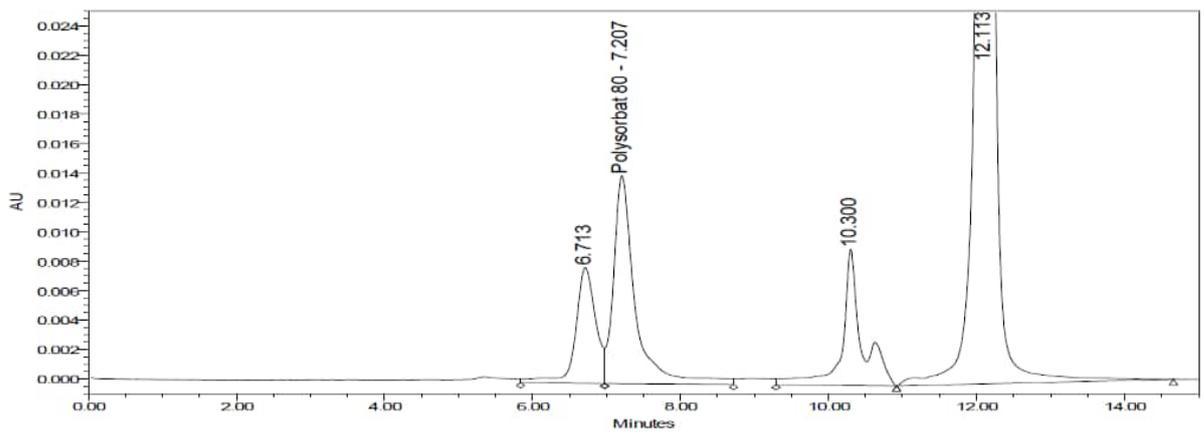


Рисунок 50 - Определение полисорбата 80 в образце 8 (интерферон альфа-2b)

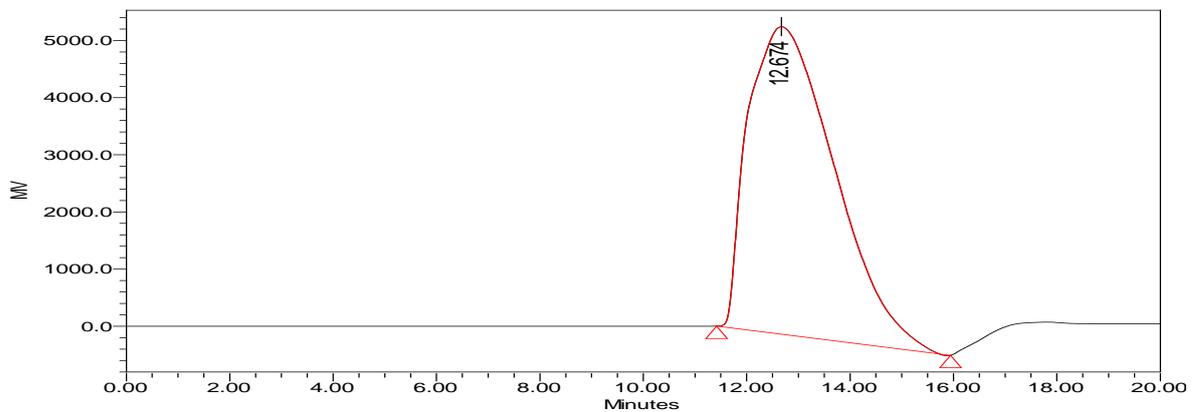


Рисунок 51 - Определение полисорбата 80 в образце 10 (иммуноглобулин человека нормальный)

Образец 8 не выдерживал условия по разнице значений молекулярных масс белкового компонента и полисорбата 80, а образцы 9 и 10 по количеству белка, на несколько порядков превышающее количество полисорбата 80. Возможным решением данной проблемы может быть введение стадии депротеинизации.

Исследование супернатантов образцов 8 и 9 методикой эксклюзионной ВЭЖХ после осаждения белка различными органическими растворителями (0,1М раствором аммония ацетата в этаноле, ацетонитрилом и этанолом) выявило уменьшение площади пика полисорбата 80 вместе с площадью пика белка, что позволило сделать вывод о непригодности данного подхода к элиминации белка в связи с существенными потерями аналита.

Далее остановились на методе твердофазной экстракции с применением картриджей Oasis фирмы Waters: Oasis HLB, Oasis MCX и Oasis MAX. В качестве образцов использовали образец 15 с концентрацией полисорбата 80 0,04 мг/мл и образец 11 (субстанция интерферона альфа-2b) с концентрацией белка 0,04 мг/мл с добавкой полисорбата 80 до концентрации 0,04 мг/мл.

Процесс проведения твердофазной экстракции состоит из нескольких этапов - подготовка (кондиционирование, уравнивание), нанесение пробы, промывка (удаление примесей), элюирование целевого компонента. В ходе поиска оптимальных условий экстракции был проведен анализ элюирующей способности органических растворителей (метанол, этилацетат, ацетонитрил) и лучшие результаты (воспроизводимость, степень извлечения) получены при использовании ацетонитрила. На этапе промывки, после нанесения образца, использовали воду в сравнении с 4 М раствор гуанидина гидрохлорида, рекомендованным к использованию на данной стадии экстракции для разрыва гидрофобных взаимодействий аминокислотных остатков полипептидной цепи [289]. Приемлемая степень извлечения была получена с применением картриджей Oasis HLB (85,7 %) и Oasis MAX (82,4%). Далее оптимизацию твердофазной экстракции проводили с использованием картриджа Oasis HLB. Перед

использованием пробы ацетонитрил упаривали на вакуумном концентраторе и восстанавливали пробу в 1 мл подвижной фазы.

Поэтапно были выбраны 3 наиболее эффективных протокола кондиционирования твердофазного картриджа Oasis HLB, уравнивания, нанесения пробы, промывки твердофазного картриджа для удаления примесей, элюирование целевого компонента. Лучший результат - конечный процент извлечения полисорбата 80 – 96,3%, был получен по протоколу 3 и далее использовали данный протокол (Таблица 19).

Таблица 19 -Сравнение степени извлечения полисорбата 80 при использовании различных протоколов экстракции

№ Протокола	Подготовка	Нанесение образца	Элюирование	Степень извлечения полисорбата 80, %	Остаточное содержание белкового компонента, %
1	Ацетонитрил 2 × 1 мл, вода, 1 мл	Образец, 1 мл 4 М гуанидин гидрохлорид – 2 мл 10 % метанол 3 × 1 мл	Ацетонитрил 2 × 0,75 мл	84,1	18,7
2	Ацетонитрил, 2 × 1 мл, вода, 1 мл	Образец, 1 мл 8 М гуанидин гидрохлорид – 2 мл 10 % метанол 3 × 1 мл	Ацетонитрил 2 × 0,75 мл	93,7	37,8
3	Ацетонитрил, 2 × 1 мл, вода, 1 мл	Образец, 1 мл, вода 2 × 1 мл	Ацетонитрил 2 × 0,75 мл	96,1	0,7

Разработанные условия депротенизации были исследованы на образцах 8-10. В ходе хроматографического анализа образцов 9 и 10, после твердофазной экстракции исходных растворов образцов, было выявлено снижение концентрации полисорбата 80. Предположение о необходимости предварительного разведения данных образцов с исходно высоким содержанием белка было реализовано путем разведения образца 9 до концентрации белка 1 мг/мл, образца 10 до 4 мг/мл. Дальнейшее разведение образца 10 было не

целесообразно из-за исходно низкой концентрации полисорбата 80 (Таблица 18, Рисунки 52-54).

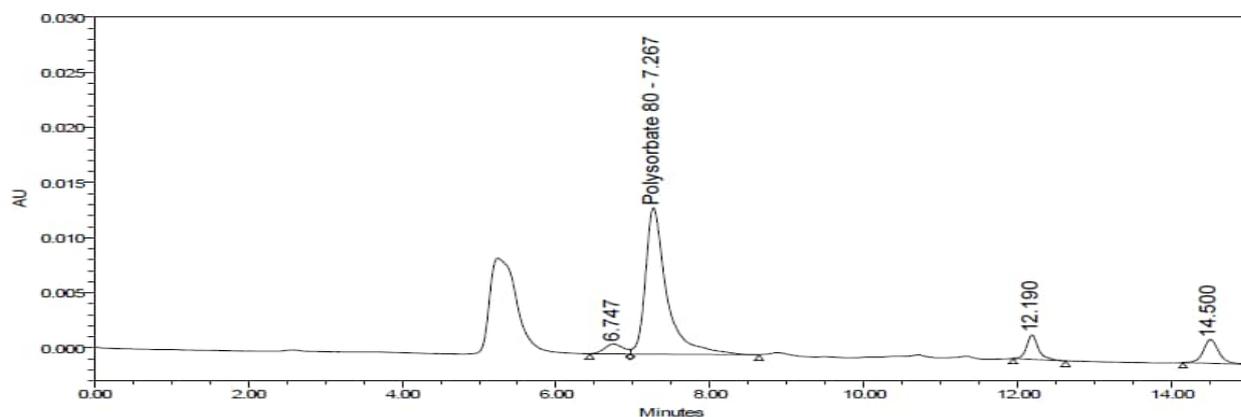


Рисунок 52 – Типичная хроматограмма образца 8 после удаления белка путем твердофазной экстракции

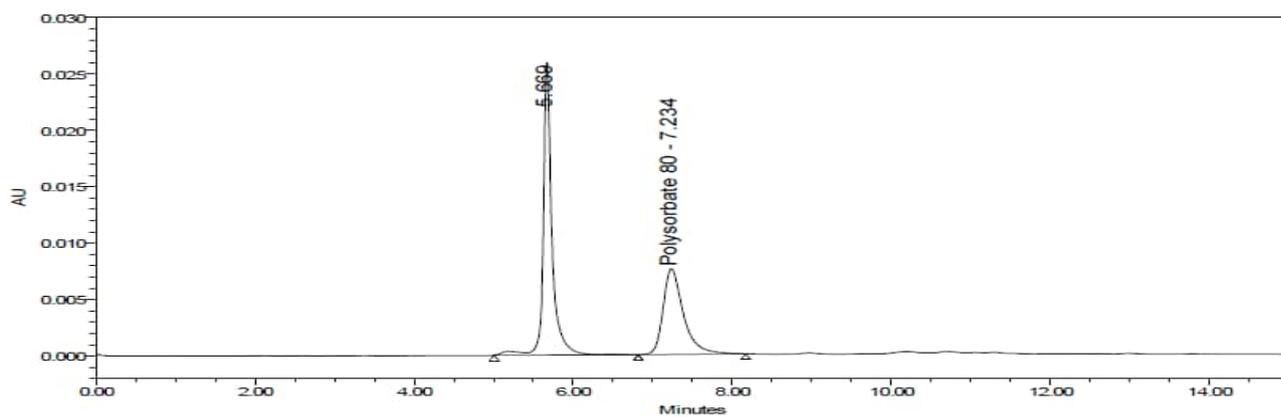


Рисунок 53 – Типичная хроматограмма образца 9 после разведения до концентрации белка ~ 1 мг/мл и удаления белка путем твердофазной экстракции

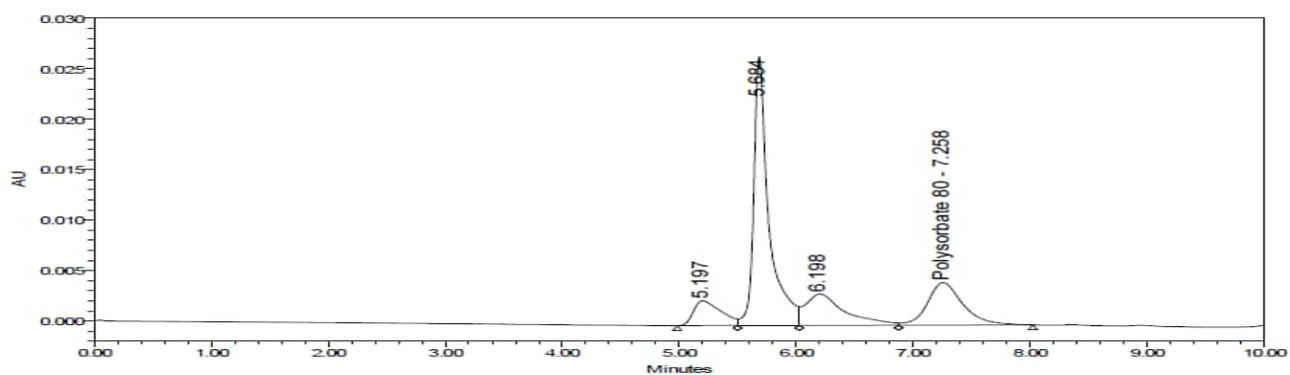


Рисунок 54 – Типичная хроматограмма образца 10 после разведения до концентрации белка ~ 4 мг/мл и удаления белка путем твердофазной экстракции

Изучение возможного влияния этапа твердофазной экстракции на степень извлечения полисорбата 80 (оценку возможных потерь аналита) проводили с применением образца 15 в диапазоне концентраций 0,02 - 0,2 мг/мл при $n=3$ (RSD менее 2%) (Рисунок 55).

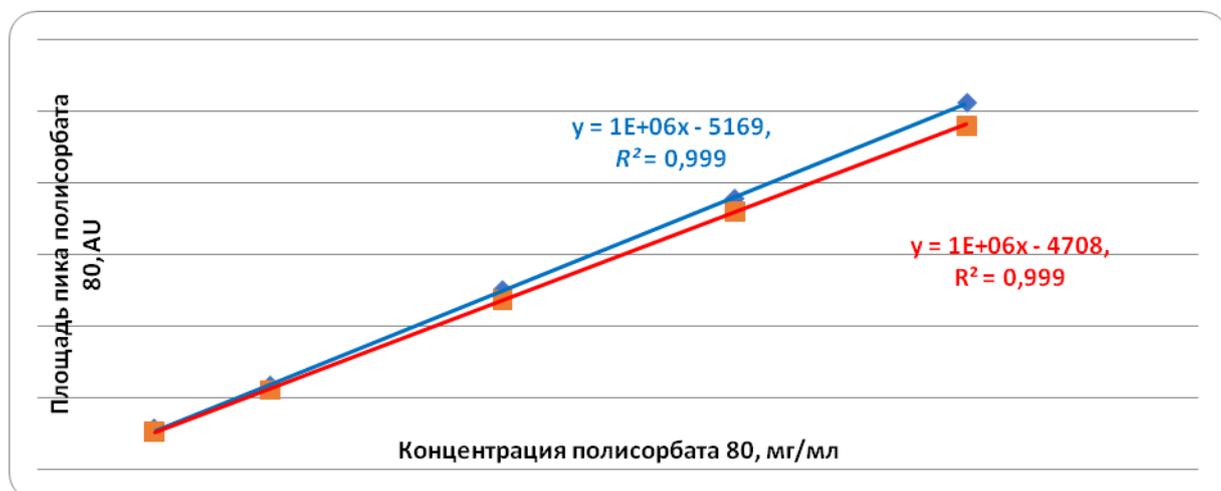


Рисунок 55 - Регрессионная зависимость площади пика полисорбата 80 от концентрации: синяя линия – до твердофазной экстракции, красная линия - после твердофазной экстракции

Процент извлечения полисорбата 80 относительно условно истинного значения, вычисленный для каждой концентрации ($n=3$) в среднем по 5-ти концентрациям составил 94,2%, что соответствует требованиям к проценту извлечения для аналитических методик от 90 до 110% [133].

В результате для образцов 8-10 были получены результаты количественного определения полисорбата 80, соответствующие требованиям нормативных документов производителей (Таблица 20).

Таблица 20 - Содержание полисорбата 80, определенное разработанной методикой на основе эксклюзионной ВЭЖХ

Образец	Содержание полисорбата 80 согласно нормативным документам производителя	Содержание полисорбата 80, определенное методикой эксклюзионной ВЭЖХ
Образец 8	Около 0,1 мг/мл (заявлено в составе, не контролируется)	0,07 мг/мл
Образец 9	0,5-1,5 мг/мл	1,2 мг/мл
Образец 10	8,0-30,0 мкг/мл	7,9 мкг/мл

Валидацию разработанной методики проводили с применением образца 11 согласно требованиям ГФ РФ, руководств ЕМА, ИСН, FDA и ГОСТ Р ИСО [21,34,65,133,162] по следующим параметрам: специфичность, линейность, точность (правильность; прецизионность как повторяемость и внутрилабораторная прецизионность, n=10), предел количественного определения (Таблица 21).

Таблица 21 - Валидационные характеристики методики определения полисорбата 80

Параметр	Мера	Критерий приемлемости	Результат
Специфичность	Пики растворителя и плацебо не должны мешать определению полисорбата 80	Отсутствие сигналов от компонентов матрицы	Пики растворителя и плацебо не мешают определению полисорбата 80
Линейность	Визуальная оценка графика	Линейная регрессия	Регрессионная зависимость визуально линейна
	Коэффициент детерминации	$R^2 \geq 0,99$	0,999
Повторяемость	Относительное стандартное отклонение	$\leq 2,0 \%$	0,4
Внутрилабораторная воспроизводимость	Относительное стандартное отклонение	$\leq 5,0 \%$	3,7
Правильность	Среднее значение выявления полисорбата 80	90 -110 %	95,7 % - 99,1 %
Предел количественного определения	Минимальная концентрация полисорбата 80 при которой достигается соотношение сигнал/шум ≥ 10	соотношение сигнал/шум 12,3	0,004 мг/мл

Специфичность анализируемой методики оценивали путем сравнительного анализа хроматограмм (n=3), полученных с применением раствора образца 11, раствора образца 11 с добавлением полисорбата 80 до концентрации 0,04 мг/мл и фильтрата раствора образца 11 с добавлением полисорбата 80 до концентрации 0,04 мг/мл, полученного путем твердофазной экстракции (Рисунки 56-59).

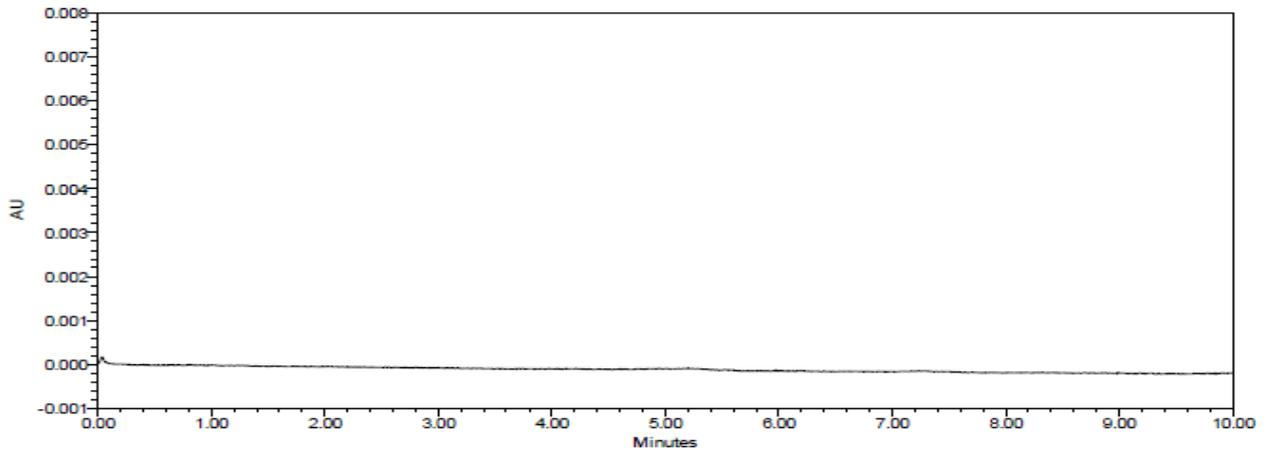


Рисунок 56 - Типичная хроматограмма подвижной фазы

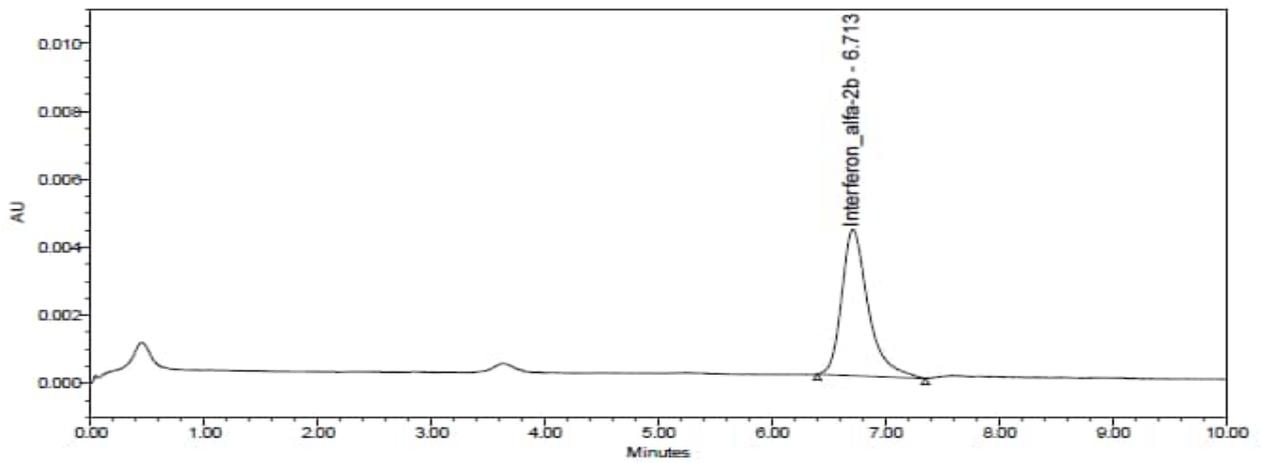


Рисунок 57 - Типичная хроматограмма раствора образца 11

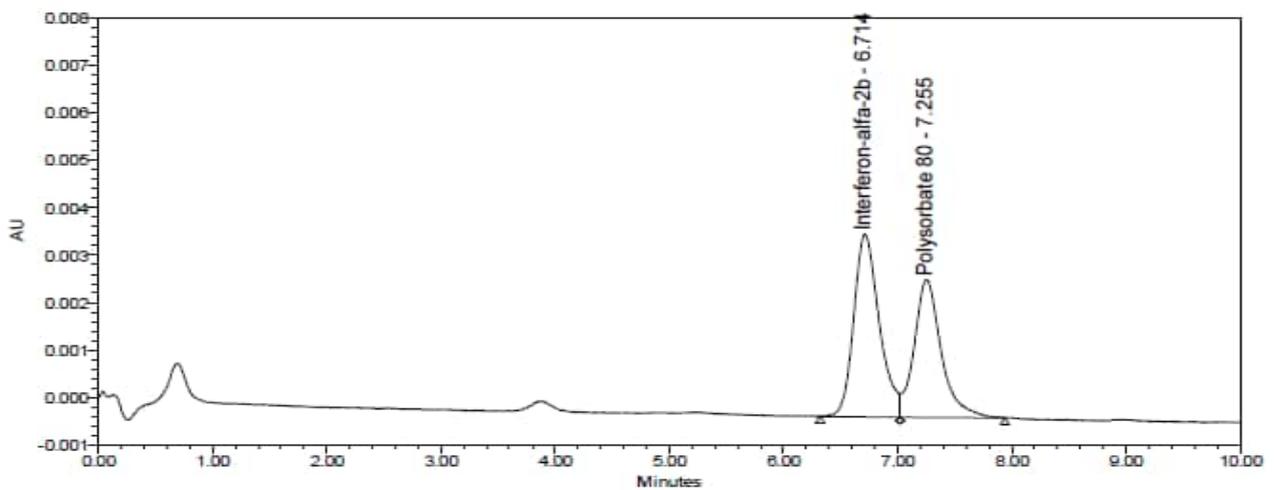


Рисунок 58 - Типичная хроматограмма образца 11, содержащего полисорбат 80 (0,04 мг/мл), до удаления белка путем твердофазной экстракции

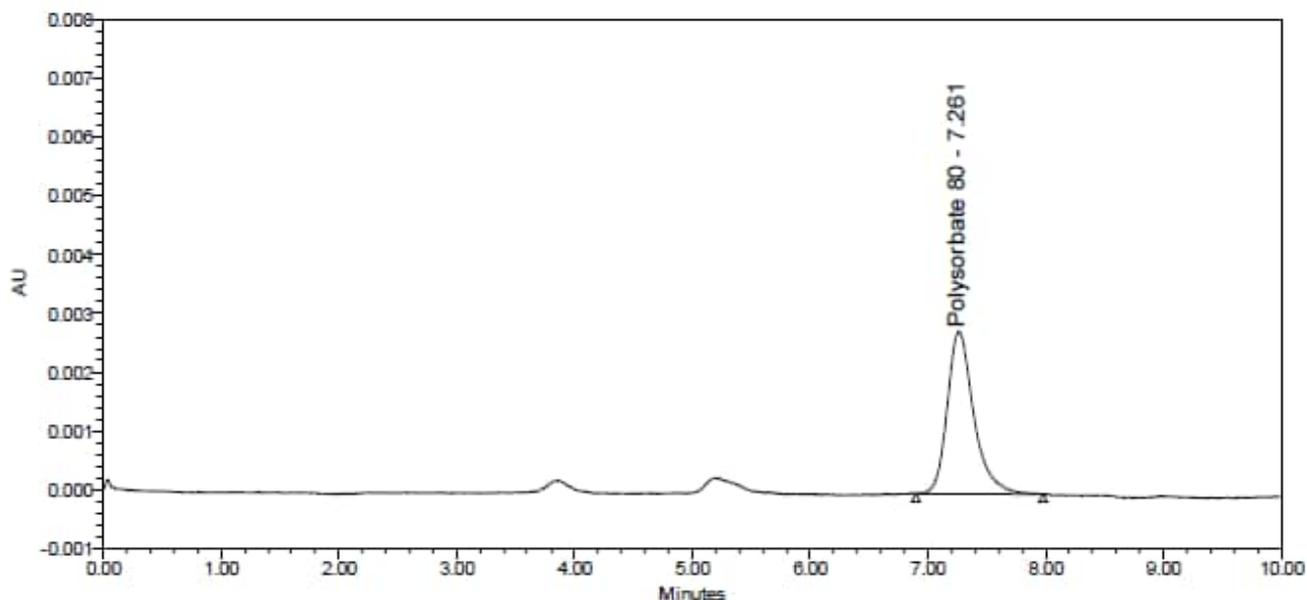


Рисунок 59 - Типичная хроматограмма образца 11, содержащего полисорбат 80 (0,04 мг/мл), после удаления белка путем твердофазной экстракции

Подтверждением специфичности методики является то, что системные пики на хроматограмме подвижной фазы (холостого раствора) отсутствуют, времена удерживания пика интерферона альфа-2b (образец 11 без добавления полисорбата 80 и образец 11 с добавлением полисорбата 80 0,04 мг/мг) совпадали - 6,713 и 6,714 соответственно; времена удерживания пика полисорбата 80 (образец 11 с добавлением полисорбата 80 0,04 мг/мг и образец 11 с добавлением полисорбата 80 0,04 мг/мг после твердофазной экстракции) совпадали - 7,255 и 7,261 (незначительное смещение пика полисорбата 80 связано с хорошим разделением и большей симметричностью пика); на хроматограммах растворов, полученных после твердофазной экстракции, пик полисорбата 80 хорошо отделялся от системных пиков, пик интерферона отсутствовал.

Аналитический диапазон методики выбирали в процессе исследования линейной области зависимости аналитического сигнала от концентрации, с учетом требований к содержанию полисорбата 80 в препаратах (Рисунок 55) - коэффициент корреляции $R^2=0,999$.

Прецизионность методики оценивалась на двух уровнях: повторяемости и внутрिलाбораторной прецизионности [21,133,162]. Полученные значения относительного стандартного отклонения для повторяемости и внутрिलाбораторной прецизионности свидетельствует о высокой прецизионности методики.

Правильность методики подтверждена методом добавок. Полученные значения процента выявления полисорбата 80 от добавленного количества для модельных растворов находятся в границах не более 10% [65].

Здесь следует отметить, что точностные характеристики методики (правильность и прецизионность) оценивали на модельных образцах - субстанции интерферона альфа-2b (образец 11) с добавлением полисорбата 80.

Данные величины являются справедливыми исключительно для использованного образца. В связи с этим, для каждого конкретного препарата будет необходима верификация данной методики: подтверждение специфичности с учетом вспомогательных веществ, а также установление индивидуальных точностных характеристик, включая робастность (устойчивость) методики, а также критериев пригодности системы для конкретного БЛП.

За предел количественного определения методики принималась минимальная концентрация полисорбата 80, для которой возможно количественное определение полисорбата 80 со значениями RSD не превышающем 20% и выдерживающими требования не менее 1:10 по соотношению сигнал/шум [41,42,44].

Оценка пригодности хроматографической системы является обязательной для всех хроматографических методик контроля качества лекарственных препаратов [41,42,44,162]. Для разработанной методики количественного определения полисорбата 80 были подтверждены критерии, принятые для хроматографических методик анализа (n=3) (Таблица 22).

Таблица 22 - Критерии пригодности хроматографической системы при определении полисорбата 80

Критерий приемлемости	Норма	Результат
Критерий 1 - Разрешение между пиком полисорбата 80 и ближайшим пиком	$\geq 2,0$	$\geq 4,0$
Критерий 2 - Число теоретических тарелок пика полисорбата 80	≥ 2000	≥ 4500
Критерий 3 - Фактор асимметрии пика полисорбата 80	0,8 -1,5	1,3 - 1,5
Критерий 4 - Относительное стандартное отклонение площади пика полисорбата 80	$\leq 2,0\%$	$\leq 1,0$
Критерий 5 - Относительное стандартное отклонение времени удерживания пика полисорбата 80	$\leq 2,0\%$	$\leq 1,0$

Оценку критерия 1 проводили с использованием образцов 1,5-9. Оценку критериев 2-5 проводили с использованием образца 15 с концентрацией полисорбата 80 - 0,08 мг/мл.

Таким образом, на основе метода эксклюзионной ВЭЖХ разработана унифицированная методика, позволяющая проводить определение полисорбата 80 в БЛП с различным типом белка и различным соотношением белка и полисорбата 80. Подтверждены нормы критериев эффективности хроматографической системы и установлены валидационные характеристики методики.

4.2 Оптимизация количественной оценки аминокислот в составе биологических лекарственных препаратов

Оптимизация количественной оценки аминокислот в составе БЛП заключалась в разработке унифицированной методики количественного селективного определения аминокислот путем прямого детектирования, без предварительной дериватизации.

В качестве объектов исследования были выбраны препараты разных групп БЛП: препараты иммуноглобулинов человека (образцы 1-4), рекомбинантный и плазменный факторы свертывания крови (образцы 5-8)¹².

¹² Здесь и далее в разделе 4.2 смотреть разделы «Материалы исследования» и «Методы исследования» «К ГЛАВЕ 4, разделу 4.2».

Для разработки унифицированной методики был выбран метод HILIC-хроматографии, предназначенный для разделения полярных соединений и позволяющий проводить прямое определение без предварительной химической модификации аминокислоты. Данный способ сочетает особенности обращенно-фазового и нормально-фазового режимов, используя водно-органический элюент и полярную стационарную фазу [89,367,401,409].

Исходно, для разработки условий количественного определения аминокислот в составе БЛП, рассматривали наиболее часто используемую аминокислоту - глицин. Основная сложность количественного определения аминокислот в составе ИЛП связана с возможной интерференцией со стороны белкового компонента матрицы, а также с необходимостью количественной оценки каждой из аминокислот в случае использования композиции стабилизаторов на их основе.

Несмотря на то, что целевые белки не конкурируют с глицином в ходе хроматографического разделения, их высокая концентрация создает фоновый шум, маскирует сигнал глицина, влияет на форму пика. Для удаления белковой фракции использовали способ твердофазной экстракции, обладающий высокой эффективностью и селективностью [271]. В ходе работы сравнивали два вида картриджей для фильтрационного центрифугирования: AmiconUltra®, Millipore 10K и Vivaspin®, Sartorius 10K, обладающих аналогичным пределом молекулярной массы, но отличающихся химическим составом мембран - ультрагель на основе регенерированной целлюлозы и полиэфирсульфон соответственно.

При выборе хроматографической колонки и состава подвижной фазы руководствовались коммерческой информацией производителей. Известно, что колонки HILIC содержат обогащённый водой слой на поверхности силикагеля. Разделение достигается путем распределения полярного растворённого вещества между высококонцентрированной водорастворимой органической подвижной фазой и гидрофильным окружением поверхности. Поскольку водный слой

облегчает перенос аминокислоты на стационарную фазу и увеличивает удерживание, при работе с HILIC сорбентами важно соотношение органического и неорганического компонентов подвижной фазы, при этом рекомендуется, чтобы раствор исследуемого образца содержал не менее 50% органического растворителя [259,273,382].

Для анализа глицина была выбрана колонка Merck ZIC-HILIC. Неподвижной фазой в этой колонке является цвиттерионная фаза на основе силикагеля с привитыми бетаинами. Цвиттерионные сорбенты, как правило, содержат равное количество сильнокислотных групп сульфоновой кислоты и сильноосновных групп четвертичного аммониевого основания, разделенных коротким алкильным мостиком. Сульфоалкилбетаиновая фаза сильно адсорбирует воду за счет водородных связей, а объемный слой воды, который составляет часть неподвижной фазы, в значительной степени контролирует механизм удерживания. Такая неподвижная фаза имеет слабое электростатическое взаимодействие с глицином по сравнению с другими фазами, например, с диольными (-OH) или аминными (-NH₂) привитыми сорбентами [326].

При выборе pH подвижной фазы учитывали, что константа кислотной диссоциации (pK_a) карбоксильной группы глицина увеличивается с увеличением концентрации органического растворителя. При возрастании pH от 3,0 до 6,4 молекула глицина становится отрицательно ионизированной и более гидрофильной, чем нейтральная форма, что приводит к увеличению адсорбции глицина на колонке. Известно, что pH 4,5 является достаточным для удерживания глицина. При этом было показано, что изменение температуры колонки от 25°C до 35°C и скорости потока от 0,7 до 0,9 мл/мин не оказывало существенного влияния на селективность удерживания [256,277,304].

Влияние буферных растворов на основе ацетата и формиата аммония с pH 4,5, рекомендованных к использованию в HILIC хроматографии [250,251], было исследовано с применением образца 11 с концентрацией 2,4 мг/мл. В качестве

органического растворителя был выбран ацетонитрил в трех соотношениях 65, 70 и 75 объемных долей к буферному раствору. Поскольку глицин является нейтральным соединением, при pH 4,5 не было выявлено существенных различий во времени удерживания глицина при разном соотношении ацетатных или формиатных солей в составе буферного раствора. Вместе с тем было показано, что содержание ацетонитрила влияет на время удерживания и симметричность пика глицина (Таблица 23).

Таблица 23 - Влияние состава подвижной фазы на хроматографический профиль глицина

20 мМ аммония формиат:ацетонитрил (об/об)	Время выхода (мин)	Фактор асимметрии	Число теоретических тарелок
25:75	15,93 ± 0,15	1,2	11932
30:70	10,92 ± 0,09	1,0	13481
35:65	8,31 ± 0,18	0,8	13963

На основании результатов, представленных в таблице 23, в качестве подвижной фазы и растворителя для фильтрата образца после твердофазной экстракции был выбран состав смеси 20 мМ раствора формиата аммония - ацетонитрила в соотношении 30:70.

Для детекции пика глицина была выбрана длина волны 210 нм, близкая к максимуму поглощения глицина - 196 нм. Детекция при длине волны 196 нм снижала чувствительность методики вследствие возрастания уровня шума за счет фонового поглощения элюента (максимум поглощения 20 мМ раствора формиата аммония - 205 нм).

При определении аналитической области методики учитывали характерный для большинства БЛП разброс содержания глицина - от около 2,0 мг/мл до около 30,0 мг/мл; симметричность пиков глицина и линейность зависимости площади пика от концентрации глицина. В результате, с применением образца 11, была подтверждена линейность в диапазоне концентраций от 1,2 до 3,6 мг/мл (n=3, RSD менее 2%) (Рисунок 60).

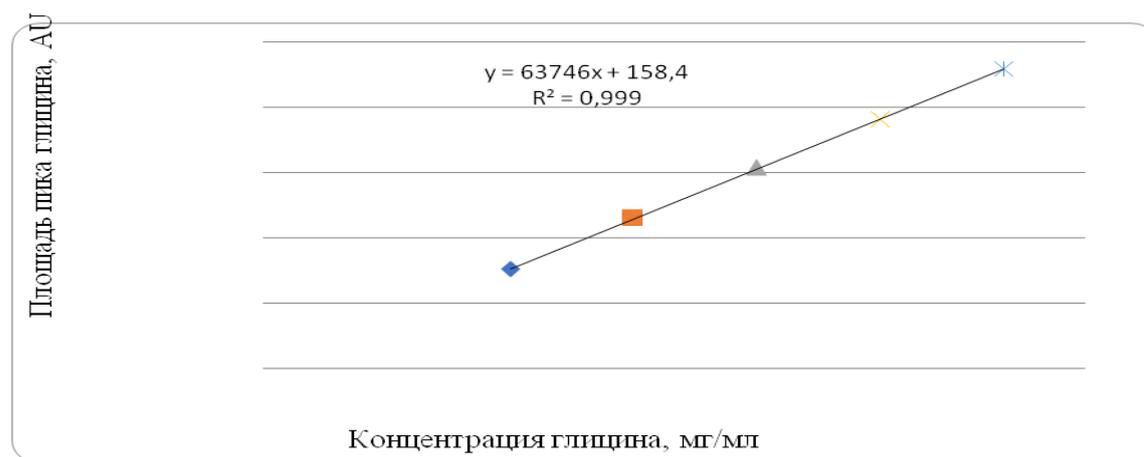


Рисунок 60 - Оценка линейности аналитического диапазона

Таким образом, лучшие результаты были получены в следующих условиях: твердофазная экстракция с применением AmiconUltra®, Millipore 10K; колонка SeQuant ZIC-HILIC (Merck, США); температура термостата колонки 30°C; скорость потока 0,8 мл/мин; объем пробы 10 мкл; длина волны 210 нм; подвижная фаза: формиат аммония (20 мМ):ацетонитрил (30:70, об/об) pH 4,5.

В данных условиях, для оценки специфичности методики были проанализированы подвижная фаза, образец 9 (не содержащий глицин), образец 9 с добавлением глицина в конечной концентрации 2,4 мг/мл и образец 1 (содержащий глицин в качестве стабилизатора) (Рисунок 61-А,В,С,Д).

Как следует из рисунка 61, в выбранных условиях удается получить единственный, симметричный пик глицина, при этом уровень фонового шума не мешает определению. Пики, потенциально мешающие определению, включая пик белка, отсутствуют, что свидетельствует об эффективности стадии депротеинизации.

Для предварительной оценки пригодности разработанных условий методики, помимо установления основных валидационных характеристик методики описанных далее, был проведен сравнительный анализ результатов количественного определения глицина в образцах 1-4 двумя способами: разрабатываемой методикой HILIC-хроматографии и валидированными методиками фирм, указанными в НД на данные препараты.

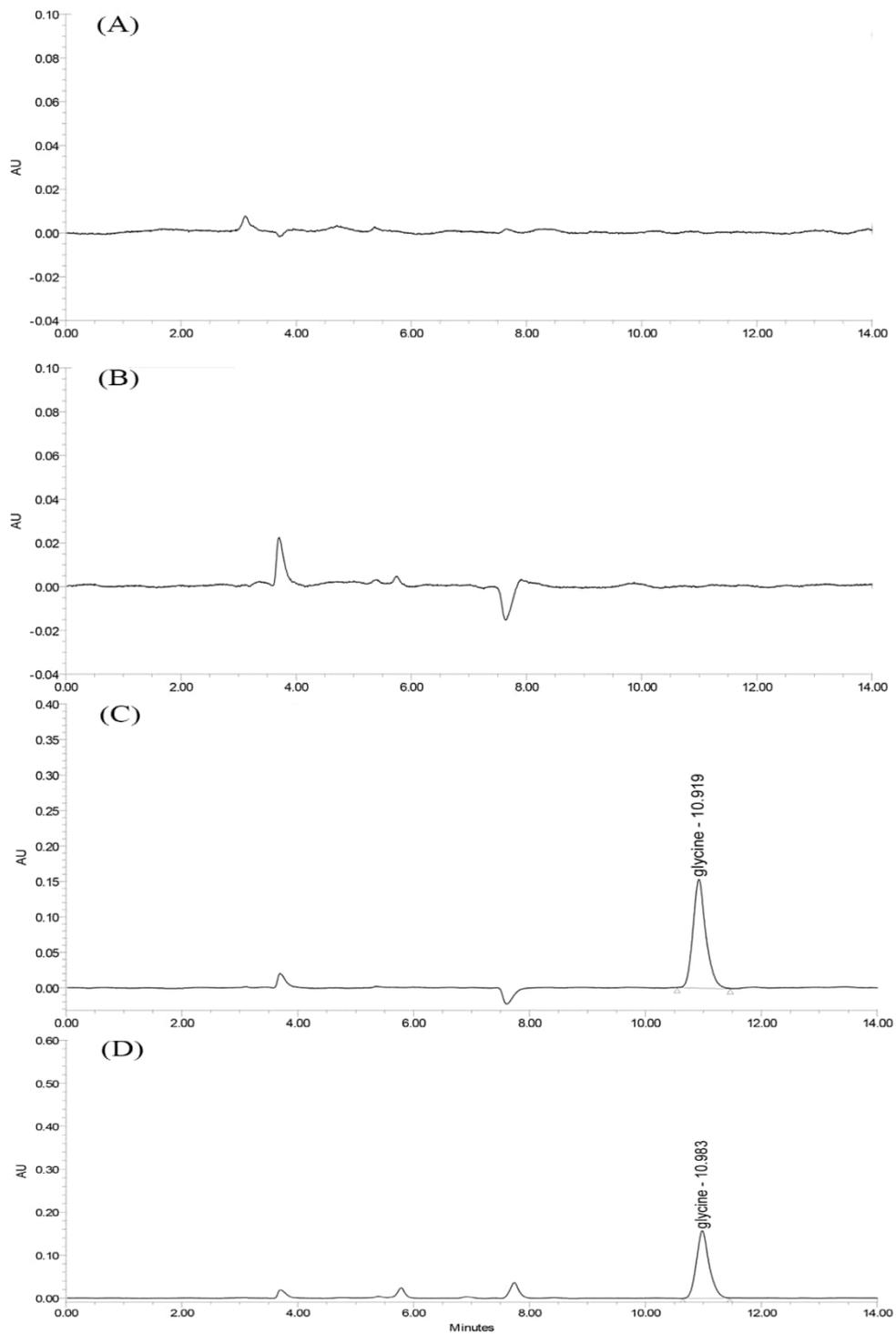


Рисунок 61 - Типичные хроматограммы HPLC-определения глицина: (A)-подвижная фаза; (B)-образец 9, не содержащий глицин; (C)-образец 9 с добавлением глицина в конечной концентрации 2,4 мг/мл; (D)- образец 1, содержащий глицин в качестве стабилизатора

Для образцов 1,3 – это методика ОФ ВЭЖХ, основанная на флуориметрическом детектировании производной глицина, полученной путем дериватизации ортофталевым альдегидом; для образца 2 - методика формольного титрования; для образца 4 - методика ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием (Таблица 24).

Таблица 24 - Определение глицина методом HPLC-хроматографии в препаратах крови (иммуноглобулинах)

Образец	Содержание глицина в соответствии с требованиями НД, мг/мл	Содержание глицина, определенное методикой фирмы, мг/мл	Содержание глицина, определенное методикой HPLC-хроматографии, мг/мл
Образец 1	17,0 - 23,0	20,7	22,4
Образец 2	3,0 - 7,0	6,1	5,8
Образец 3	15,0 - 30,0	21,8	22,3
Образец 4	7,4 - 10,0	9,4	8,1

Результаты, полученные методикой HPLC-хроматографии, соответствуют требованиям НД и согласуются с результатами, полученными с применением методик фирм.

Валидацию разработанной методики проводили с применением образцов 9 и 11 согласно требованиям ГФ РФ, руководств ЕМА, ИСН, FDA и ГОСТ Р ИСО [21,34,65,133,162] по следующим параметрам: специфичность, линейность, точность (повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность, n= 10), предел количественного определения (Таблица 25).

Подтверждением специфичности методики, является отсутствие сопутствующих пиков на хроматограмме определения глицина, а также совпадением времен удерживания пиков глицина в образце 9 (добавленное количество глицина) - 10,919 и образце 1 (глицин - вспомогательное вещество) - 10,983 (RSD 0,4%) (Рисунок 61).

Таблица 25 - Валидационные характеристики методики определения глицина

Параметр	Мера	Критерии приемлемости	Результат
Специфичность	Пики растворителя и плацебо не должны мешать определению глицина	Отсутствие сигналов от компонентов матрицы.	Пикирастворителя и плацебо не мешают определению глицина
Линейность	Визуальная оценка графика	Линейная регрессия	Регрессионная зависимость визуально линейна
	Коэффициент детерминации	$R^2 \geq 0,99$	0,999
Повторяемость	Относительное стандартное отклонение	$\leq 2,0\%$	0,36%
Внутрилабораторная прецизионность	Относительное стандартное отклонение	$\leq 5,0\%$	0,63%
Правильность	Среднее значение выявления глицина	90-110 %	100,32%
Предел количественного определения	Минимальная концентрация глицина, при которой достигается соотношение сигнал/шум ≥ 10	соотношение сигнал/шум 10,9	0,1 мг/мл

Аналитический диапазон методики выбирали в процессе исследования линейной области зависимости аналитического сигнала от концентрации, с учетом требований к содержанию глицина в препаратах иммуноглобулинов (Рисунок 60) - коэффициент корреляции $R^2=0,999$. Прецизионность методики оценивалась на двух уровнях: повторяемости и внутрилабораторной прецизионности [21,133,162]. Полученные значения относительного стандартного отклонения для повторяемости и внутрилабораторной прецизионности свидетельствует о приемлемой прецизионности методики. Правильность

методики подтверждена методом добавок. Полученные значения процента выявления глицина от добавленного количества для модельных растворов находятся в границах 10% [65].

Точностные характеристики методики (правильность и прецизионность) оценивали на модельных образцах - международном стандартном образце иммуноглобулина человека нормального (образец 9) с добавлением глицина. Данные величины являются справедливыми исключительно для использованного образца. В связи с этим, для каждого конкретного препарата будет необходима верификация данной методики: подтверждение специфичности с учетом вспомогательных веществ, а также установление соответствующих точностных характеристик, включая робастность (устойчивость) методики. За предел количественного определения методики принималась минимальная концентрация глицина, для которой возможно количественное определение со значениями RSD не превышающем 20% и выдерживающими требования не менее 1:10 по соотношению сигнал/шум [41,42,44].

Оценка пригодности (эффективности) хроматографической системы является обязательной для всех хроматографических методик контроля качества лекарственных препаратов [34,41,42,44,162]. Для разработанной методики количественного определения глицина, с использованием образцов 9 и 11 с концентрацией глицина 2,4 мг/мл, были подтверждены критерии, принятые для хроматографических методик анализа (n=3) (Таблица 26).

Таблица 26 - Критерии пригодности хроматографической системы определения глицина

Критерий приемлемости	Норма	Результат
Критерий 1 - Число теоретических тарелок пика глицина	≥ 2000	≥ 10000
Критерий 2 - Фактор асимметрии пика глицина	0,8 -1,5	1,2-1,5
Критерий 3 - Относительное стандартное отклонение площади пика глицина (n=3)	$\leq 2,0\%$	$\leq 2,0\%$
Критерий 4 - Относительное стандартное отклонение времени удерживания пика глицина (n=3)	$\leq 2,0\%$	$\leq 1,0\%$

Таким образом, на основе метода HILIC ВЭЖХ разработана унифицированная методика, позволяющая проводить определение глицина в препаратах иммуноглобулинов. Подтверждены нормы критериев пригодности хроматографической системы и установлены валидационные характеристики методики.

Далее была исследована возможность применения разработанной методики для количественного определения аминокислот, входящих в состав БЛП: метионина, пролина, гистидина, аргинина и лизина. HILIC-хроматография, основой которой является использование сорбентов, содержащих биполярные ионы (цвиттер-ионы), предоставляет возможность варьирования сил электростатического взаимодействия и, соответственно, повышения селективности удерживания целевых компонентов (аналитов), переносимых подвижной фазой [326]. Данное свойство является определяющим при разделении смеси веществ, обладающих различной полярностью и зарядом, например смеси аминокислот глицин, метионин, пролин, лизин, гистидин и аргинин.

Исследование возможности применения разработанной для глицина методики HILIC-хроматографии для разделения модельной смеси аминокислот (образец 12) 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) (Рисунок 62), 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 pH подвижной фазы.

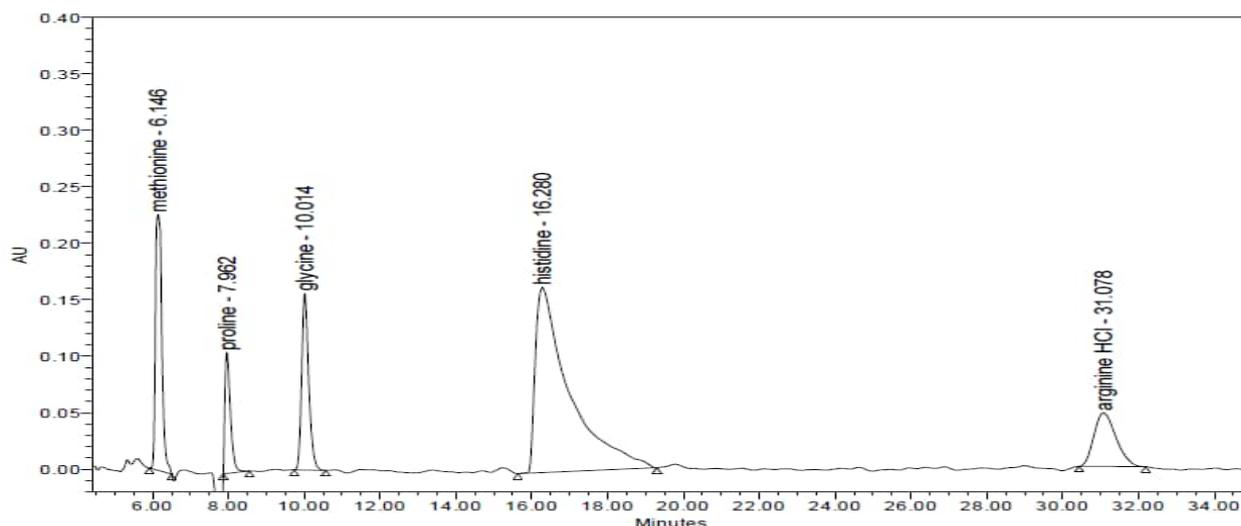


Рисунок 62 – Типичный хроматографический профиль разделения модельной смеси аминокислот в условиях, разработанных для определения глицина

Было установлено, что наиболее значимыми параметрами для заряженных аминокислот являются рН и соотношение 20 мМ формиата аммония и ацетонитрила в составе подвижной фазы, влияющих на ионизацию силикагеля.

Длина волны детектирования - 198 нм была выбрана на основании оценки максимумов поглощения каждой аминокислоты, полученных экспериментально в заданных хроматографических условиях: метионин - 199,3 нм, пролин - 195,7 нм, глицин - 196 нм, гистидин - 213,3 нм, аргинин - 195,7 нм, лизин - 195,7 нм. Изменение температуры колонки и скорости потока не оказывало существенного влияния на результаты разделения. В результате лучшие условия анализа были получены при следующих оптимизированных параметрах: формиат аммония (20мМ):ацетонитрил (35:65, об/об); рН 3,3; длина волны детектирования - 198 нм (n=3) (Таблица 27, Рисунок 63).

Таблица 27 - Анализ эффективности хроматографической системы при разделении модельной смеси аминокислот

Критерии эффективности	Метионин	Пролин	Глицин	Гистидин	Аргинин	Лизин
Число теоретических тарелок	10773	9405	12668	9877	11261	7161
Разрешение	-	5,1	4,2	15,6	2,2	1,6
Фактор асимметрии	1,3	1,2	1,3	1,6	1,4	1,6

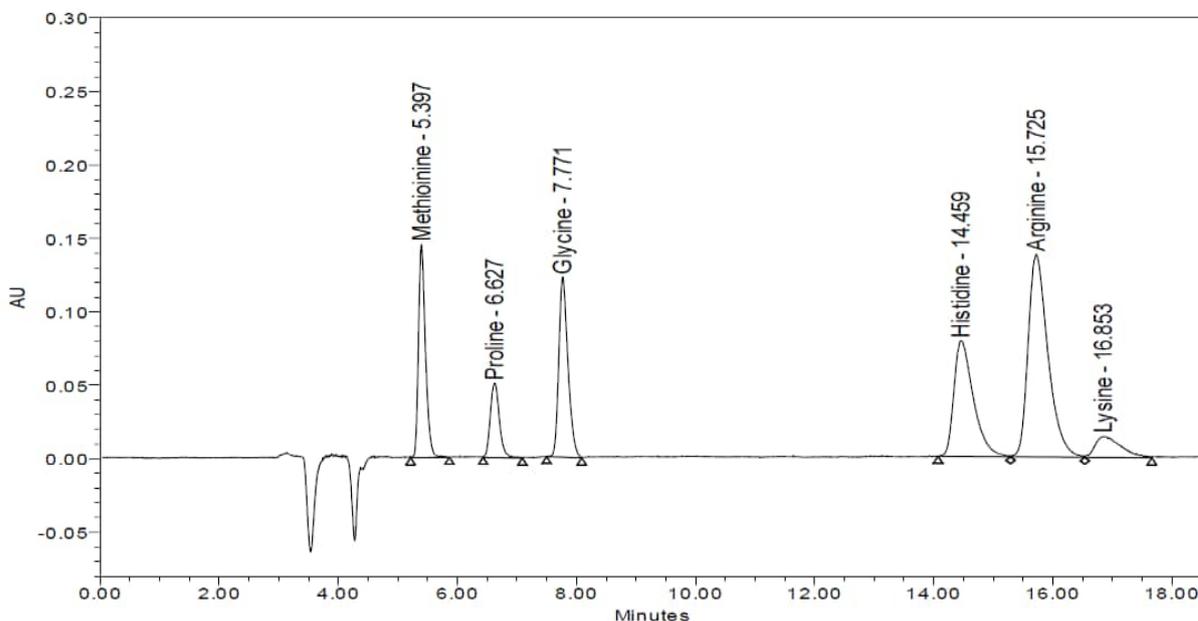


Рисунок 63 - Типичный хроматографический профиль модельной смеси аминокислот при оптимизированных параметрах разделения

В установленных хроматографических условиях проводили определение аминокислот в образцах 4-8. Все образцы использовались после удаления высокомолекулярного белкового компонента путем фильтрационного центрифугирования с применением картриджей AmiconUltra® 10кДа (Таблица 28).

Таблица 28 - Результаты определения аминокислот в образцах БЛП

Наименование образца	Аминокислоты, входящие в состав образца	Допустимый диапазон номинальной концентрации, мг/мл	Найденная концентрация, мг/мл
Образец 4	Глицин	7,4 –10,0	8,0
Образец 5	Метионин	0,05 –0,07	0,05
	Гистидин	1,2 – 1,8	1,44
Образец 6	Глицин	Не более 2,5	около 1,0
	Гистидин	2,33 –5,43	4,0
	Аргинин	10,5 – 24,4	21,6
Образец 7	Гистидин	1,04 –1,36	1,14
Образец 8	Гистидин	0,84 – 1,24	0,92

Валидацию разработанной методики проводили с применением образцов 1-8,12,13 согласно требованиям ГФ РФ, руководств ЕМА, ICH, FDA и ГОСТ Р ИСО [21,34,65,133,162] по следующим параметрам: специфичность, линейность, точность (повторяемость, внутрिलाбораторная прецизионность, правильность), предел количественного определения (Таблица 29).

Таблица 29 - Валидационные характеристики методики определения аминокислот

Параметр	Мера	Критерий приемлемости	Результат
Специфичность	Пики растворителя и плацебо не должны мешать определению аминокислот	Отсутствие сигналов от компонентов матрицы	Пики растворителя и плацебо не мешают определению аминокислот
Линейность	Визуальная оценка графика	Линейная регрессия	Метионин: 0,9999 Пролин: 0,9999 Глицин: 0,9997
	Коэффициент детерминации	$R \geq 0,99$	Гистидин: 0,9999 Аргинин: 0,9998 Лизин: 0,9992
Повторяемость	Относительное стандартное отклонение	$\leq 2,0 \%$	0,8%
Внутрिलाбораторная прецизионность	Относительное стандартное отклонение	$\leq 5,0 \%$	0,63%
Правильность	Среднее значение выявления	90,0 -110,0 %	99,5%
Предел количественного определения	Минимальная концентрация аминокислоты с отношением сигнал/шум ≥ 10	Отношение сигнал/шум: от 10,9 до 11,3	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

Специфичность методики оценивали по отсутствию мешающих пиков матрицы образцов 1-8. Аналитический диапазон метода был выбран для каждой из аминокислот, в зависимости от их типичного содержания в биологических

лекарственных препаратах и на основании оценки линейности. Для оценки использовали образец 13. Для аминокислот метионин, аргинин и гистидин аналитический диапазон составил от 0,05 мг/мл до 0,2 мг/мл. Для аминокислот пролин, глицин и лизин аналитический диапазон составил от 0,5 мг/мл до 1,5 мг/мл. Линейность оценивали для каждой аминокислоты по пяти концентрациям в указанных диапазонах.

Прецизионность методики оценивалась на двух уровнях: повторяемости и внутрилабораторной прецизионности [21,133,162]. Полученные значения относительного стандартного отклонения для повторяемости и внутрилабораторной прецизионности свидетельствует о высокой прецизионности методики. Правильность методики подтверждена методом добавок. Полученные значения процента выявления глицина от добавленного количества находятся в границах 10 % [65]. Здесь следует отметить, что точностные характеристики методики (правильность и прецизионность) оценивали на образце 8 с добавлением аминокислот. Данные величины являются справедливыми исключительно для использованного образца. В связи с этим, для каждого конкретного препарата будет необходима верификация данной методики: подтверждение специфичности с учетом вспомогательных веществ, а также установление соответствующих точностных характеристик, включая робастность (устойчивость) методики.

За предел количественного определения методики принималась минимальная концентрация аминокислоты, для которой возможно количественное определение со значениями RSD не превышающем 20% и выдерживающими требования не менее 1:10 по соотношению сигнал/шум [41,42,44].

Таким образом, на основе метода HILIC ВЭЖХ разработана унифицированная методика, позволяющая проводить селективное определение аминокислот метионин, пролин, глицин, гистидин, аргинин, лизин в БЛП.

4.3 Оптимизация количественной оценки алюминия в составе биологических лекарственных препаратов

Количественная оценка содержания в БЛП адьюванта на основе алюминия, преимущественно геля гидроксида алюминия и, в некоторых случаях, фосфата алюминия с применением метода атомно-абсорбционной спектроскопии является востребованным направлением совершенствования системы контроля качества.

Достоинства метода ААС-ЭТ позволили рассматривать разработку и внедрение методики количественного определения ионов алюминия на основе этого метода в качестве инструмента, способствующего оптимизации оценки данного показателя.

Количественное определение производных 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 метода комплексометрического титрования по фармакопейной методике определения ионов алюминия в БЛП (далее – методика ГФ РФ) [38]. Таким образом, предварительный гидролиз 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 алюминия позволяют рассматривать в качестве растворителей кислоты и щелочи.

При выборе реагента для минерализации учитывали, что при атомно-абсорбционной спектроскопии нежелательно использование серной кислоты, диссоциация которой с образованием сульфат-ионов в процессе атомизации пробы создает ионизационные помехи [36]. Приемлемыми кислотами являются азотная, рекомендованная производителем оборудования и соляная, применяющаяся в методиках ААС с пламенной атомизацией. А также была рассмотрена возможность минерализации образца в щелочной среде с использованием натрия гидроксида.

В качестве объектов исследования были выбраны препараты разных групп БЛП: вакцина против гепатита В (образцы 5,6), препараты анатоксинов (образцы 7,8,13,15-18), вакцина против короновиральной инфекции (образец 9), АКДС-вакцина (образцы 10,14), вакцины поликомпонентные (образцы 11,12)¹³.

Исследование влияния состава реакционной смеси на эффективность гидролиза проводили на образце 1, который представляет собой дифтерийный анатоксин, сорбированный на геле гидроксида алюминия.

Критерием для определения степени гидролиза было снижение мутности раствора, которое оценивали по изменению оптической плотности полученных растворов при $A_{540\text{нм}}$, при этом рассчитывали степень растворения как процент снижения оптической плотности относительно контрольного раствора - образца 1 с соответствующим разведением без добавления гидролизующих агентов [40]. Данная длина волны была выбрана на основании экспериментально полученного максимума поглощения контрольного раствора в УФ-диапазоне и диапазоне видимого спектра. В результате были выбраны 2 растворителя, которые при нагревании обеспечивали существенное (более чем в 2 раза) снижение оптической плотности пробы – соляная кислота и натрия гидроксид.

Таким же образом проводили исследование влияния молярного соотношения геля гидроксида алюминия и растворителя, а также времени нагревания реакционной смеси. В результате было выявлено, что условием максимального гидролиза, при котором растворяется более 90% геля, является двадцати пяти кратный избыток натрия гидроксида при нагревании до 100⁰С (водяная баня) в течение 5 минут. Увеличение концентрации растворителя или времени термостатирования не влияло на показания оптической плотности. Для сравнения – максимальный эффект, в случае использования соляной кислоты, не превысил 60%.

¹³ Здесь и далее в разделе 4.3 смотреть разделы «Материалы исследования» и «Методы исследования», «К ГЛАВЕ 4, разделу 4.3.

Поскольку гель гидроксид 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 образец 3 (ГСО) в диапазоне от 0 до 100 мкг/л (Рисунок 64).

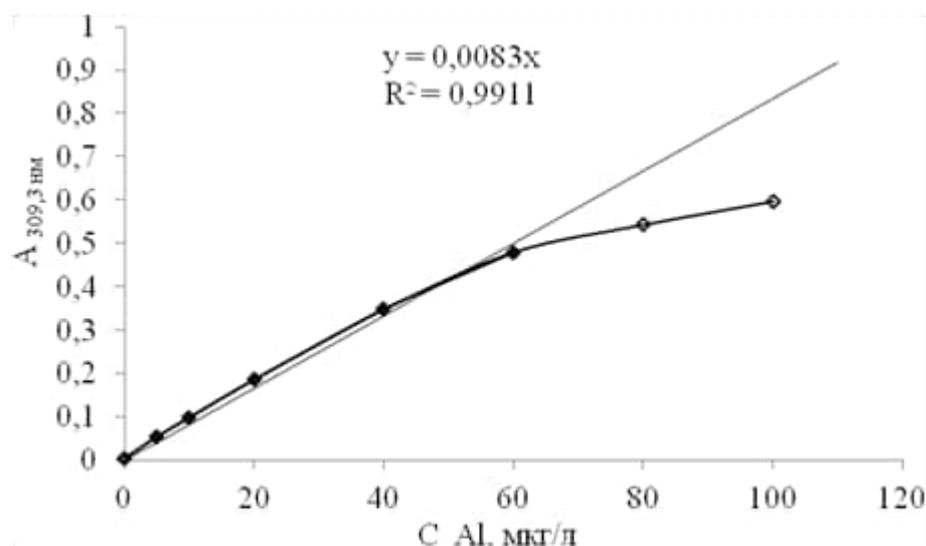


Рисунок 64 - Зависимость оптической плотности $A_{309,3 \text{ нм}}$ от концентрации ионов алюминия (С) в образце 3 в диапазоне концентраций от 0 до 100 мкг/л

На основании визуального анализа области линейности зависимости оптической плотности от концентрации ионов алюминия была выбрана аналитическая область методики от 10 мкг/л до 50 мкг/л и получена регрессионная зависимость ($n=3$, $RSD \leq 3\%$) для калибровочных растворов, приготовленных из образца 3 с шагом 10 мкг/л (Рисунок 65).

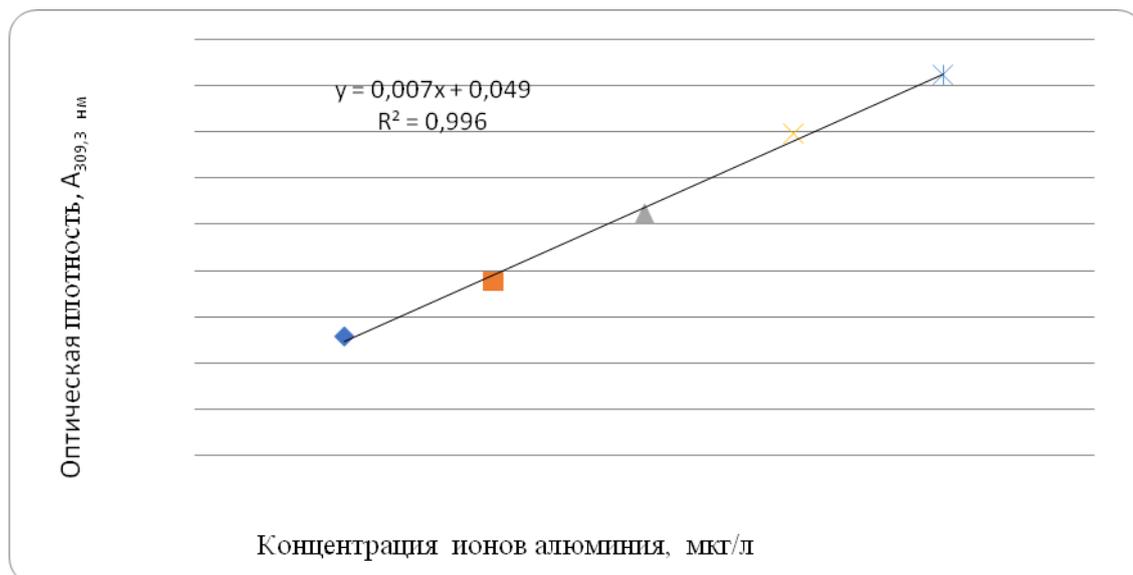


Рисунок 65 - Зависимость оптической плотности $A_{309,3 \text{ нм}}$ от концентрации ионов алюминия (С) в образце 3 в диапазоне концентраций от 10 до 50 мкг/л

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. Полученные пробы помещали в автосамплер ААС-ЭТ и проводят определение ионов алюминия при длине волны 309,3 нм.

Для предварительной оценки пригодности разработанных условий методики, помимо установления основных валидационных характеристик методики описанных далее, был проведен сравнительный анализ результатов количественного определения ионов алюминия в образцах 7,9-18 (содержащих гель гидроксида или фосфата алюминия) двумя способами: разрабатываемой методикой ААС-ЭТ и методикой ГФ РФ (Таблица 30).

Таблица 30 - Содержание ионов алюминия в ИЛП, определяемое методикой ААС-ЭТ и методикой ГФ РФ

Наименование образца	Требование НД	Результаты, полученные методикой ААС-ЭТ	Результаты, полученные методикой ГФ РФ
Образец 7	<1,1 мг/мл	0,90 мг/мл	1,0 мг/мл
Образец 9	0,5-0,7 мг/0,5мл	0,68 мг/0,5 мл	0,63 мг/0,5 мл
Образец 10 ¹³	0,3-0,36 мг/0,5 мл	0,32 мг/0,5 мл	0,34 мг/0,5 мл
Образец 11 ¹⁴	1,1-1,7 мг/мл	1,3 мг/мл	1,3 мг/мл
	0,12-0,18 мг/флакон	0,14 мг/флакон	0,16 мг/флакон
Образец 12	0,20-0,45 мг/0,5мл	0,33 мг/0,5 мл	0,43 мг/0,5 мл
Образец 13	<1,2 мг/мл	0,97 мг/мл	0,99 мг/мл
Образец 14	<1,1 мг/мл	0,87 мг/мл	0,77 мг/мл
Образец 15	<1,1 мг/мл	0,79 мг/мл	0,88 мг/мл
Образец 16	<1,1 мг/мл	0,82 мг/мл	0,74 мг/мл
Образец 17	<1,1 мг/мл	0,57 мг/мл	0,60 мг/мл
Образец 18	<1,1 мг/мл	0,80 мг/мл	0,85 мг/мл

Содержание ионов алюминия в БЛП, определяемое методикой ААС-ЭТ, соответствует требованиям нормативной документации на каждый конкретный препарат и в целом коррелирует с результатами, полученными фармакопейной методикой комплексонометрического титрования (далее ГФ РФ).

Валидацию разработанной методики проводили с применением образцов 1-4 согласно требованиям ГФ РФ, руководств ЕМА, ИСН, FDA и ГОСТ Р ИСО [21,34,65,133,162] по следующим параметрам: специфичность, линейность,

¹⁴ Препарат, содержит фосфат алюминия

точность (повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность, n=15) (Таблица 31).

Таблица 31 - Валидационные характеристики методики определения ионов алюминия методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией

Параметр	Мера	Критерий приемлемости	Результат
Линейность	Визуальная оценка графика	Линейная регрессия	Регрессионная зависимость визуально линейна
	Коэффициент корреляции	$R \geq 0,99$	0,996
Повторяемость	Относительное стандартное отклонение	$\leq 5,0 \%$	3,14 %
Внутрилабораторная прецизионность	Относительное стандартное отклонение	$\leq 8,0 \%$	4,74 %
Правильность	Среднее значение выявления	90-110 %	109,8 %

Специфичность методики обусловлена выбранным методом элементного анализа, где длина волны детекции узко специфична для каждого конкретного элемента, в данном случае ионов алюминия. Линейность методики оценивали на образцах 1-4 в диапазоне 10-50 мкг/л. Прецизионность методики оценивалась на двух уровнях: повторяемости и внутрилабораторной прецизионности [21]. Полученные значения относительного стандартного отклонения для повторяемости и внутрилабораторной прецизионности свидетельствует о высокой прецизионности методики. Правильность методики подтверждена методом добавок.

Точностные характеристики методики (правильность и прецизионность) оценивали на образце 1 с добавленным количеством алюминия. Данные величины являются справедливыми исключительно для использованного образца. В связи с этим, для каждого конкретного препарата будет необходима верификация данной методики: установление соответствующих точностных характеристик, включая робастность (устойчивость) методики. Предел обнаружения и предел количественного определения данной методики не

устанавливали, поскольку исходное содержание ионов алюминия в БЛП заведомо выше аналитической области методики.

Поскольку для контроля количества ионов алюминия в БЛП большинство производителей используют фармакопейную методику (ГФ РФ), необходимо понимание статистической сопоставимости результатов, получаемых методикой ААС-ЭТ и ГФ РФ.

Такая оценка дает возможность альтернативного применения вновь разработанной методики без пересмотра допустимого диапазона нормы содержания аналита (при условии ее верификации), а также использования ФСО содержания ионов алюминия, аттестованного методикой ГФ РФ для обеспечения внутрилабораторного контроля качества.

Сопоставимость результатов оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа, сформулировав нулевую гипотезу следующим образом: методики ААС-ЭТ и ГФ РФ обладают одинаковыми точностными характеристиками (правильностью и прецизионностью) и систематические ошибки данных методик статистически незначимы.

Для исследования статистической значимости результатов были получены данные количественного определения ионов алюминия для образцов 1,2,5-8,19 методиками ААС-ЭТ и ГФ РФ ($n=15$).

Полученные результаты были обработаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа с расчетом критерия Фишера и последующим сравнением полученных значений для каждого из образцов с табличным (критическим) значением по формулам (4-6).

Межгрупповое число степеней свободы при таком способе расчета составляет $\nu_{\text{меж}} = 1$. Внутригрупповое число степеней свободы $\nu_{\text{вн}} = 28$. Критическое значение критерия Фишера составляет 4,20 при $\alpha=0,05$.

Значение критерия Фишера - F, рассчитанное для каждого из образцов, ниже табличного (критического) значения F_t , что подтверждает нулевую гипотезу (Таблица 32).

Таблица 32 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа

Наименование образца	Среднее значение содержания ионов алюминия, полученное методикой ГФ РФ (n=15), мг/мл	Среднее значение содержания ионов алюминия, полученное методикой ААС ЭТ (n=15), мг/мл	$S^2_{вн}$	$S^2_{меж}$	F-критерий Фишера ($F_t = 4,20$)
Образец 1	1,58	1,63	0,00431	0,00299	0,69
Образец 2	0,84	0,84	0,00108	0,00000	0,00
Образец 5	0,48	0,49	0,00040	0,00030	0,75
Образец 6	0,65	0,65	0,00050	0,00000	0,00
Образец 7	0,85	0,87	0,00238	0,00280	1,18
Образец 8	1,45	1,47	0,00436	0,00161	0,37
Образец 19	0,98	0,99	0,00222	0,00130	0,59

Таким образом, на основе высокотехнологичного метода ААС-ЭТ разработана методика количественного определения ионов алюминия в БЛП, которая может рассматриваться как альтернативная существующей фармакопейной методике комплексонометрического титрования.

Резюме

В ходе выполнения работы, описанной в данной главе, была оптимизирована оценка качества вспомогательных веществ наиболее часто используемых при производстве БЛП: стабилизаторов - полисорбата 80 и аминокислот; адьюванта - геля гидроксида алюминия.

Разработана и валидирована методика количественного определения полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах на основе метода

эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методика позволяет определять содержание полисорбата 80 в препаратах с различным типом белка и различным соотношением белка и полисорбата 80. Отработаны условия депротенинизации испытуемого образца методом твердофазной экстракции с применением картриджей Oasis HLB. Валидационные характеристики методики подтверждают ее специфичность, линейность и возможность количественного определения полисорбата 80 в БЛП с концентрацией белка до 220 мг/мл и содержанием полисорбата 80 в диапазоне концентраций от 0,02 до 0,2 мг/мл. Методика отличается простотой пробоподготовки и позволяет проводить прямое определение полисорбата 80, исключая получение производных. Хроматографические условия обеспечивают эффективное разделение компонентов анализируемой смеси (фильтрата свободного от белка) независимо от типа БЛП, что может оптимизировать и унифицировать оценку качества БЛП по данному показателю. Новизна методики подтверждена патентом Российской Федерации № 2812788 «Определение полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах».

Разработаны и валидированы методики прямого количественного определения глицина и смеси аминокислот в БЛП методом высокоэффективной хроматографии гидрофильного взаимодействия HILIC. Методики основаны на использовании хроматографической колонки с сорбентом, представляющим собой цвиттерионную фазу на основе силикагеля с привитыми бетаинами - Merck ZIC-HILIC. В качестве пробоподготовки, обеспечивающей последующее прямое определение аминокислот без дериватизации, выбран способ элиминации высокомолекулярного компонента матрицы путем твердофазной экстракции с применением картриджей для центрифугирования AmiconUltra® 10K. Преимуществом методик является упрощение стадии пробоподготовки за счет исключения стадии дериватизации, а также возможность одновременного селективного количественного определения нескольких аминокислот в БЛП.

Установленные ПКО для каждой из аминокислот не позволяет рассматривать данную методику как высокочувствительную, однако использование аминокислот в качестве стабилизаторов предполагает их достаточно высокое содержание в составе препарата. Таким образом, методики обладают достаточной чувствительностью для использования по назначению. Новизна методики подтверждена патентом Российской Федерации № 2700831 «Способ количественного определения глицина в биологических лекарственных препаратах методом гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии».

В «Руководство по экспертизе иммунобиологических лекарственных препаратов» включена Глава 11 – «Количественное определение аминокислот в иммунобиологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия». Разработан проект ОФС для ГФ РФ «Определение аминокислот в препаратах иммуноглобулинов методом гидрофильного взаимодействия».

Разработана и валидирована методика ААС-ЭТ для количественной оценки ионов алюминия. Данная методика применима для всех типов БЛП, содержащих как гель гидроксида алюминия, так и фосфата алюминия с последующим пересчетом ионов Al^{3+} на актуальное соединение, и может рассматриваться как альтернативная фармакопейной методике комплексометрического титрования. Отсутствие статистически значимых различий позволяет утверждать, что методики взаимозаменяемы и возможно использование любой их данных методик для оценки качества БЛП по показателю количественного определения ионов алюминия. Новизна методики подтверждена патентом Российской Федерации № 2799235 «Способ количественного определения ионов алюминия атомно-абсорбционной спектроскопией с электротермической атомизацией».

В «Руководство по экспертизе биологических лекарственных препаратов» под редакцией В.В. Косенко включена Глава IX «Определение вспомогательных

веществ в БЛП», содержащая Раздел 1 «Количественное определение аминокислот методом гидрофильной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ)» и раздел 4 «Количественное определение алюминия методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ААС-ЭТ)».

Разработанные унифицированные методики, ориентированные на использование высокотехнологичного оборудования, отвечают актуальным требованиям системы менеджмента качества лабораторных исследований и способствуют оптимизации контроля качества БЛП, по количественной оценке, вспомогательных веществ: полисорбата 80, аминокислот и ионов алюминия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методология оценки качества обусловлена нормативно-правовыми документами в числе которых федеральные законы Российской Федерации ФЗ от 12.04.2010 № 61 «Об обращении лекарственных средств» и ФЗ от 27.12.2002 № 184 «О техническом регулировании»; Решения и требования ЕЭС в области обращения ЛС в рамках Соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств Евразийской экономической комиссии: международное соглашение от 23.12.2014; Постановление Правительства РФ от 26.11.2019 №1510 «О порядке ввода в гражданский оборот лекарственных препаратов для медицинского применения»; Гармонизированные международные требования в области обращения ЛС (ICH); Надлежащие фармацевтические практики (CLP); Стандарты ISO серии 9000; Руководства ВОЗ Международные стандарты ISO и ГОСТы, регламентирующие требования к СО; Требования к аккредитованным лабораториям – ГОСТ ISO 17025; Национальные и международные фармакопеи.

Основные элементы методологии оценки качества представляют собой фармакопейные требования и их методическое обеспечение, которое, в свою очередь, включает в себя комплекс методов оценки качества и их метрологическое обеспечение в виде стандартных образцов.

Совершенствование методологии оценки качества заключается в разработке и актуализации вышеуказанных элементов путем разработки гармонизированных фармакопейных требований и актуализации имеющихся, путем разработки высокотехнологичных методик оценки показателей качества БЛП и разработки новых стандартных образцов или расширении области применения имеющихся.

Актуальность совершенствования методологии обусловлена высокой востребованностью БЛП для лечения и профилактики широкого спектра заболеваний; непрерывной разработкой новых и совершенствования уже имеющихся БЛП; переходным периодом от национальной регуляторной системы к наднациональной, формирующейся в рамках Евразийского экономического

союза (ЕАЭС), характеризующимся необходимостью разработки гармонизированных регуляторных и фармакопейных требований; обеспечением независимости отечественного рынка БЛП путем реализации программы импортзамещения; необходимостью дифференцированного подхода к оценке физико-химических показателей качества БЛП, обусловленной их разнообразием; развитием аналитических технологий и общей тенденцией использования в практике лабораторной экспертизы ЛС высокотехнологичного оборудования.

В результате анализа международных и отечественных фармакопейных требований, а также анализа регистрационных досье соответствующих препаратов и научной литературы, были разработаны общие гармонизированные требования к оценке подлинности структуры и чистоты рекомбинантных интерферонов альфа и бета, рекомбинантных факторов свертывания крови и PEG-модифицированных рекомбинантных белков, а также систематизированы в виде универсального алгоритма требования к разработке и аттестации стандартных образцов предназначенных для подтверждения подлинности их структуры.

Для препаратов интерферонов альфа и бета сформулированы общие гармонизированные фармакопейные требования к оценке физико-химических показателей качества. Также, наряду с гармонизированными требованиями, отражена специфика отечественных препаратов - показана необходимость:

- разработки, аттестации и использования для различных форм интерферона альфа-2b (содержащих и не содержащих N-концевой метионин), стандартного образца сравнения аналогичной структуры;
- разработки, аттестации и использования для интерферона бета-1b стандартного образца сравнения аналогичной структуры;
- использования индивидуальной методики пептидного картирования для аттестации стандартного образца и оценки качества интерферона бета-1b.

Для препаратов рекомбинантных факторов свертывания крови сформулированы общие гармонизированные фармакопейные требования к оценке

физико-химических показателей качества. Также, наряду с гармонизированными требованиями, отражена специфика данной группы препаратов:

- дано определение рекомбинантного фактора свертывания крови как «лиофилизированного препарата гликопротеинов, обладающего биологической активностью фактора свёртывания крови, выделенного из плазмы и предназначенного для заместительной терапии при заболеваниях, связанных с нарушениями системы свертывания крови»; разработана их классификация; отражена основная тенденция создания рекомбинантных факторов свертывания крови – получение молекул, структуры которых отличны от структуры молекул факторов свертывания крови, выделенных из плазмы, с целью снижения индукции ингибирующих антител; перечислены актуальные на сегодняшний день международные непатентованные наименования рекомбинантных факторов свертывания крови VIIa, VIII, IXa; показана целесообразность разработки, аттестации и использования стандартного образца сравнения аналогичной структуры для методов пептидного картирования и картирования гликанов.

Разработанные требования были использованы при формировании общих фармакопейных статей «Интерфероны» и «Факторы свертывания крови человека (генно-инженерные, рекомбинантные)», вошедшие в XIV издание Государственной фармакопеи РФ.

При разработке требований к оценке подлинности и чистоты препаратов на основе PEG-модифицированных белков учитывали документ ЕМА, данные научной литературы и опыт регистрационной экспертизы препаратов данной группы. Требования к оценке исходных белка и PEG, а также полученного конъюгата на уровне субстанции и готового продукта, отражены в виде разработанного единого формата спецификации, устанавливающего перечень обязательных к оценке показателей качества. Данные требования использованы при формировании проекта ОФС «Пегилированные (конъюгированные) терапевтические белки, полученные с применением технологии рекомбинантной

ДНК", предназначенной для включения в XV издание Государственной фармакопеи РФ.

Также разработанные требования изложены в Руководстве по экспертизе лекарственных препаратов крови (раздел «Рекомбинантные факторы свёртывания крови») и Руководстве 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») и внедрены в работу ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Систематизация требований к разработке и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков выполнена с учетом регуляторных и нормативных документов РФ, ЕМА и ИСН. Разработан алгоритм аттестации, состоящий из 4-х основных этапов, наполнение которых зависит от исходной задачи.

Обоснования наполнения каждого из этапов и их реализация позволяет систематизировать процесс разработки СО и обеспечивает прослеживаемость и доступность информации. Стандартные образцы подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков (ФСО и СОПр), аттестованные в соответствии с разработанным алгоритмом, могут рассматриваться как первичные в случае отсутствия возможности использования международных стандартных образцов соответствующего белка. Данные рекомендации изложены в Руководстве «Требования к стандартным образцам в дозе на биологические лекарственные средства» и внедрены в работу ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

В результате исследований по практическому применению алгоритма разработки и аттестации стандартных образцов подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков была оптимизирована оценка

подлинности структуры интерферонов альфа и бета, а также рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa.

Оптимизация заключалась в разработке и реализации индивидуальных программ аттестации стандартных образцов для контроля качества вышеуказанных терапевтических белков по показателю подлинности структуры.

Программа для стандартного образца интерферона альфа-1b (содержащего N-концевой метионин) была реализована аттестацией первичного фармакопейного стандартного образца 3.2.00433, предназначенного для пептидного картирования.

Программа для стандартного образца интерферона альфа-1b (не содержащего N-концевой метионин) была реализована аттестацией фармакопейного стандартного образца 3.2.00456 в прослеживаемости к международному стандартному образцу, предназначенному для пептидного картирования. Также показана возможность применения фармакопейного стандартного образца 3.2.00456 для оценки качества по показателям, характеризующим чистоту белка методами электрофореза в ПААГ, изофокусирования и ВЭЖХ.

Программа для стандартного образца интерферона бета-1b была реализована разработкой методики пептидного картирования и аттестацией первичного фармакопейного стандартного образца 3.2.00447.

Программа для стандартного образца рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa была реализована аттестацией стандартного образца предприятия, предназначенного для оценки подлинности структуры методом пептидного картирования (в прослеживаемости к международному стандартному образцу) и картирования гликанов (в качестве первичного стандартного образца).

Все разработанные стандартные образцы были внедрены на отечественных биофармацевтических предприятиях.

Оптимизация оценки вспомогательных веществ - стабилизаторов полисорбата 80 и аминокислот, и адьюванта - производных алюминия, заключалась в разработке методик их количественной оценки с применением

высокотехнологичных методов, отвечающих актуальным тенденциям лабораторной фармацевтической экспертизы и требованиям системы менеджмента качества лабораторных исследований.

Разработана и валидирована методика количественного определения полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах на основе метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методика позволяет определять содержание полисорбата 80 в препаратах с различным типом белка и различным соотношением белка и полисорбата 80. Валидационные характеристики методики подтверждают ее специфичность, линейность и возможность количественного определения полисорбата 80 в БЛП с концентрацией белка до 200 мг/мл и содержанием полисорбата 80 в диапазоне концентраций от 0,02 до 0,2 мг/мл. Методика отличается простотой пробоподготовки и позволяет проводить прямое определение полисорбата 80, исключая получение производных. Хроматографические условия обеспечивают эффективное разделение компонентов анализируемой смеси (фильтрата свободного от белка) независимо от типа БЛП, что может оптимизировать и унифицировать оценку качества БЛП по данному показателю.

Разработаны и валидированы методики прямого количественного определения глицина и смеси аминокислот в БЛП методом высокоэффективной хроматографии гидрофильного взаимодействия HILIC. Методики основаны на использовании хроматографической колонки с сорбентом, представляющим собой цвиттерионную фазу на основе силикагеля с привитыми бетаинами - Merck ZIC-HILIC. В качестве пробоподготовки, обеспечивающей последующее прямое определение аминокислот без дериватизации, выбран способ элиминации высокомолекулярного компонента матрицы путем твердофазной экстракции с применением картриджей для центрифугирования AmiconUltra® 10K. Преимуществом методик является упрощение стадии пробоподготовки за счет

исключения стадии дериватизации, а также возможность одновременного селективного количественного определения нескольких аминокислот в БЛП.

Разработана и валидирована методика ААС-ЭТ для количественной оценки ионов алюминия. Методика ААС-ЭТ применима для всех типов БЛП, содержащих как гель гидроксида алюминия, так и фосфата алюминия с последующим пересчетом ионов алюминия на актуальное соединение. На основании оценки сопоставимости результатов, полученных методикой ААС-ЭТ и фармакопейной методикой комплексометрического титрования (ГФ РФ) сделан вывод о возможности ее альтернативного применения, что расширяет возможности оценки качества при проведении лабораторной фармацевтической экспертизы. Полученные результаты способствуют оптимизации оценки качества БЛП по содержанию ионов алюминия.

На все разработанные методики были зарегистрированы патенты Российской Федерации.

Методики определения полисорбата 80 и аминокислот внедрены в работу отечественного биофармацевтического предприятия и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в виде главы «Количественное определение аминокислот в иммунобиологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия» в «Руководство по экспертизе иммунобиологических лекарственных препаратов».

В «Руководство по экспертизе биологических лекарственных препаратов» под редакцией В.В. Косенко включена Глава IX «Определение вспомогательных веществ в БЛП», содержащая Раздел 1 «Количественное определение аминокислот методом гидрофильной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ)» и раздел 4 «Количественное определение алюминия методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ААС-ЭТ)».

Разработан проект ОФС для ГФ РФ «Определение глицина в препаратах иммуноглобулинов методом гидрофильного взаимодействия».

Таким образом, решены поставленные задачи: разработаны и внедрены гармонизированные фармакопейные требования и рекомендации по экспертизе качества рекомбинантных интерферонов альфа и бета, рекомбинантных факторов свертывания крови и PEG-модифицированных белков; разработан и внедрен алгоритм аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков; разработаны и реализованы индивидуальные программы аттестации стандартных образцов; разработанные стандартные образцы внедрены в работу отечественных биофармацевтических предприятий; разработаны и внедрены высокотехнологичные методики количественной оценки актуальных вспомогательных веществ

В результате решения данных задач достигнута цель - усовершенствована существующая методология оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов.

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%) дисиазированной 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 спектрометрии с электротермической атомизацией для определения ионов алюминия в биологических лекарственных препаратах, содержащих гелевый гидроксид алюминия или фосфат 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 $F_t=4,2$.

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 спектроскопии 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ААС-ЭТ - Атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией

БЛП - Биологические лекарственные препараты

БСА - Бычий сывороточный альбумин

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ - Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ/МС/МС

ГЖХ - Газо-жидкостная хроматография

ГКСФ - Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГФ РФ - Государственная фармакопея Российской Федерации

ЕАЭС - Евразийский экономический союз

ЕФ - Европейская фармакопея

ЕЭК - Евразийская экономическая комиссия

ЛС - Лекарственные средства

МНН - Международное непатентованное наименование

МСО - Международный стандартный образец

НД - Нормативная документация производителя

НПА ЕАЭС - Нормативно-правовые акты Евразийского экономического союза

ОФ-ВЭЖХ - Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФС - Общая фармакопейная статья

ПААГ - Полиакриламидный гель

РФСК - Рекомбинантные факторы свертывания крови

СО - Стандартный образец

СОпр- Стандартный образец предприятия

ТФУ - Трифторуксусная кислота

УВЭЖХ - Ультраэффективная жидкостная хроматография

ФС - Фармакопейная статья

ФСК - Фактор свертывания крови

ФСО - Фармакопейный стандартный образец

ЧСА - Человеческий сывороточный альбумин

ЯМР - Ядерный магнитный резонанс

АQC - 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбамат

Immunoglobulin human (molecular size) BRP - Международный стандартный образец иммуноглобулина человека нормальный (British reference preparation)

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)

ЕМА/ЕМЕА- Европейское агентство по оценке лекарственных средств (European Medicines Agency)

ESI - Ионизация электроспреем (Electrospray ionization)

FDA - Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (Food and Drug Administration)

НІІС - Хроматография гидрофильного взаимодействия (Hydrophilic interaction chromatography)

ІСН - Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения

(International Council for Harmonisation)

OPA - Ортофталевый альдегид

PEG- Полиэтиленгликоль

rFVIIa - Рекомбинантный фактор свертывания крови VII активированный

rINF- Рекомбинантный интерферон

rINF-alfa2b (Met) - Рекомбинантный интерферон alfa2b, содержащий N-концевой метионин

rINF-alfa2b (no-Met) - Рекомбинантный интерферон alfa2b, не содержащий N-концевой метионин

RSD – Относительное стандартное отклонение или коэффициент вариаций (relative standard deviation)

S – Стандартное отклонение

S^2 – Дисперсия

SDS - Натрия додецилсульфат (sodium dodecyl sulfate)

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон "Об иммунопрофилактике инфекционных болезней" от 17.09.1998 № 157-ФЗ (с изменениями на 25 декабря 2023) // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/901717430> (дата обращения: 12.03.2024).
2. Федеральный закон «О техническом регулировании» от 27.12.2002 № 184-ФЗ (с изм. и допол. в ред. от 02.07.2021) // Официальный интернет портал правовой информации. - URL: <http://actual.pravo.gov.ru/content/content.html#hash=1c3a23c4eb681a4bcc709b48cd1b216cbf6ef0b594a75fba6996faf49465f4cc&t1=0> (дата обращения: 16.08.2024).
3. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ (с изм. и допол. в ред. от 08.08.2024) // Официальный интернет портал правовой информации. URL: <http://actual.pravo.gov.ru/content/content.html#hash=d1cc243d9b5f831722d0fc8ea72e622eed6d46еса6af50528b360aadbe454773&t1=0> (дата обращения: 15.08.2024).
4. Постановление Правительства Российской Федерации «О порядке ввода в гражданский оборот лекарственных препаратов для медицинского применения (вместе с «Правилами выдачи разрешения на ввод в гражданский оборот серии или партии иммунобиологического лекарственного препарата, выдачи заключения о соответствии серии или партии иммунобиологического лекарственного препарата требованиям, установленным при его государственной регистрации»)» от 26.11.2019 № 1510 // Официальное опубликование правовых актов. — 2019. — URL: <http://publication.pravo.gov.ru/document/0001201911280015?index=1> (дата обращения: 18.08.2024).

5. Постановление Правительства Российской Федерации «Об утверждении особенностей внесения изменений в документы, содержащиеся в регистрационном досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения, в случае дефектуры или риска возникновения дефектуры лекарственных препаратов в связи с введением в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера» от 23.03.2022 № 440 // Правительство России. — 2022. - URL: <http://government.ru/docs/all/139959> (дата обращения: 18.08.2024).
6. Распоряжение Правительства Российской Федерации «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года» от 07.06.2023 № 1495-р // Правительство России. — 2023. - URL: <http://government.ru/docs/all/148150/> (дата обращения: 18.08.2024).
7. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 09 июня 2023 года № 1508-р // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. - URL: <http://publication.pravo.gov.ru/document/0001202306130117> (дата обращения:).
8. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации «О Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения (вместе с «Положением о Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»)» от 20.03.2020 № 202 // Законы, кодексы и нормативно-правовые акты Российской Федерации. — с изм. и допол. в ред. от 20.12.2021. - URL: <https://legalacts.ru/doc/prikaz-minzdrava-rossii-ot-20032020-n-202-o-metrologicheskoi/> (дата обращения: 18.08.2024).

9. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении Правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и особенности экспертизы отдельных видов лекарственных препаратов для медицинского применения (референтных лекарственных препаратов, воспроизведённых лекарственных препаратов, биологических лекарственных препаратов, биоаналоговых (биоподобных) лекарственных препаратов (биоаналогов), гомеопатических лекарственных препаратов, лекарственных растительных препаратов, комбинаций лекарственных препаратов), форм заключений комиссии экспертов» от 24.08.2017 № 558н // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. - URL:<https://docs.cntd.ru/document/542612120> (дата обращения: 15.08.2024).
10. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей» от 20.07.2023 № 377 // Институт фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/upload/iblock/75e/sb0brnt1ctsx8k6gq31o0ojjqt16er7t.pdf> (дата обращения: 18.08.2024).
11. Приказ Министерства Здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении порядка формирования регистрационного досье на лекарственный препарат и требований к документам в его составе, требований к объёму информации, предоставляемой в составе регистрационного досье, для отдельных видов лекарственных препаратов для медицинского применения и порядка представления документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для медицинского применения в целях его государственной регистрации» от 12.07.2017 № 409н // Государственный реестр лекарственных средств Минздрава России. — 2023 г. — с изм. и допол. в ред. от 09.06.2020. - URL:

- <https://rlp.test.egisz.rosminzdrav.ru/doc/57792-prikaz-minzdrava-rossii-ot-12-07-2017-n-409n-red-ot-09-06-2020-ob-utverzhenii-poryadka-formirovaniya-registratsionnogo-dose-na-lekarstvennyj-preparat-i-trebovanij-k-dokumentam-v-ego-sostave-trebovanij-k-obemu-informatsii-predostavlyaemoj-v-sostave-registratsionnogo-dose-dlya-otdelnyh-vidov-lekarstvennyh-preparatov-dlya-medsinskogo-primeneniya-i-poryadka-predstavleniya-dokumentov-iz-kotoryh-formiruetsya-registratsionnoe-dose-na-lekarstvennyj-preparat-dlya-medsinskogo-primeneniya-v-tselyah-ego-gosudarstvennoj-registratsii-zaregistrirovano-v-minyuste-rossii-08-08-2017-n-47706> (дата обращения: 12.08.2024).
12. ГОСТ 32394-2014 (ISO Guide 30:1992 *Поправка. ИУС N 7-2015.) Межгосударственный стандарт. Стандартные образцы. Термины и определения, используемые в области стандартных образцов: дата введения 2016-01-01 // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200118302> (дата обращения: 13.09.2024).
 13. ГОСТ 8.532–2002. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Межлабораторная метрологическая аттестация. Содержание и порядок проведения работ: дата введения 2003-03-01 // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/120003046> (дата обращения: 15.09.2024).
 14. ГОСТ Р 50.2.031-2003 Национальная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Методика оценивания характеристики стабильности: дата введения 2004-07-01. – Москва: ИПК Издательство Стандартов, 2004. - URL: <https://meganorm.ru/Data2/1/4294814/4294814441.pdf> (дата обращения: 21.10.2024).
 15. ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений: дата введения 2010-04-15. –

- Москва: Стандартиформ, 2019. –16 с. - URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/48878/> (дата обращения: 21.10.2024).
16. ГОСТ Р 8.691-2010 (Руководство ИСО 31:2000) Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы материалов (веществ). Содержание паспортов и этикеток: дата введения 2012-01-01. – Москва: Стандартиформ, 2012. – 12 с. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293802/4293802158.pdf> (дата обращения: 21.10.2024).
17. ГОСТ Р 8.694-2010. Стандартные образцы материалов (веществ). Общие и статистические принципы определения метрологических характеристик стандартных образцов: дата введения 2012-07-01 // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200092657> (дата обращения: 15.09.2024).
18. ГОСТ Р 8.810-2012. Стандартные образцы. Программа и методика определения метрологических характеристик: дата введения 2014-03-01. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200102024> (дата обращения: 15.09.2024).
19. ГОСТ Р ИСО 17034–2021 Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов: дата введения 2021-12-01. – Москва: Российский институт стандартизации, 2021. – 28 с. – URL: <https://pqm-online.com/assets/files/lib/std/gost-r-iso-17034-2021.pdf> (дата обращения: 13.09.2024).
20. ГОСТ Р ИСО 21748-2021 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений: дата введения 2022-01-01. – Москва: Российский институт стандартизации, 2021. – 36 с. - URL: <https://protect.gost.ru/document.aspx?control=7&id=241433> (дата обращения: 13.08.2024).

21. ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений, часть 3: дата введения 2002.11.01. // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200029977> (дата обращения: 10.08.2024).
22. ГОСТ Р ИСО 9000-2015. Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь: дата введения 2015-11-01. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 54 с.– URL: <https://protect.gost.ru/document.aspx?control=7&id=237712> (дата обращения: 15.08.2024).
23. ГОСТ Р ИСО 9001-2015. Системы менеджмента качества. Требования: дата введения 2015-09-28. – Москва: Стандартинформ, 2020. – 32 с. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200124394> (дата обращения: 15.08.2024).
24. ГОСТ Р ISO 9000-2011 Система менеджмента качества. Основные положения и словарь. – Москва: Стандартинформ. - 2018. – 28 с.
25. ГОСТ ISO Guide 30-2019. Стандартные образцы. Некоторые термины и определения: дата введения 2020-09-01. – Москва: Стандартинформ, 2020. – 15 с. – URL: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293726/4293726676.pdf> (дата обращения: 25.09.2024).
26. ГОСТ ISO Guide 31-2019. Содержание сертификатов, этикеток и сопроводительной документации: дата введения 2020-09-01. – Москва: Стандартинформ, 2020. – 15 с. – URL: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293726/4293726676.pdf> (дата обращения: 13.09.2024).
27. ГОСТ ISO Guide 33-2019. Надлежащая практика применения стандартных образцов: дата введения 2020-08-01. – Москва: Стандартинформ, 2020. – 35 с. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293726/4293726674.pdf> (дата обращения: 13.09.2024).

28. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий: дата введения 2019-09-01. – Москва: Стандартинформ, 2021. – 32 с.– URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200166732> (дата обращения: 15.08.2024).
29. ГОСТ Р 8.315-2019 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения: 2020. – 42 с. – URL: <https://meganorm.ru/Data/722/72205.pdf> (дата обращения: 12.09.2024).
30. ГОСТ Р 8.871-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы предприятий и отраслей. Общие требования: дата введения 2015-06-01. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 16 с. – URL: <https://meganorm.ru/Data/586/58696.pdf> (дата обращения: 12.09.2024).
31. ГОСТы РИСО 5725-1-6–2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений (часть 1 – 6): дата введения 2002-11-01.– Москва: Стандартинформ, 2009.
32. Государственная фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах] / Министерство Здравоохранения Российской Федерации. – XIV издание. – Москва:ФЭМБ, 2018. – URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 16.08.2024).
33. ОФС 1.1.0007.18 «Стандартные образцы»// Государственная Фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах]. – XIV издание, том I. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 185-202.-URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/185/> (дата обращения: 03.08.2024).
34. ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»// Государственная Фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах]. – XIV издание, том I. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 276-288. - URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/275/> (дата обращения: 10.08.2024).

35. ОФС 1.1.0020.18 «Стабильность биологических лекарственных средств»// Государственная Фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах]. – XIV издание, том I. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 405-422.-URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/405/> (дата обращения: 17.09.2024).
36. ОФС 1.2.1.1.0005.18 «Атомно-абсорбционная спектроскопия»// Государственная Фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах]. – XIV издание, том I. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 769-776. - URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/771/> (дата обращения:14.09.2024).
37. ОФС 1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» //Государственная Фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах]. – XIV издание, том II. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 2575-2595. -URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/763/>(дата обращения: 20.09.2024).
38. ОФС 1.7.2.0016.15«Определение ионов алюминия в сорбированных биологических лекарственных препаратах» // Государственная Фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах]. – XIV издание, том II. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 2916-2919. - URL: <https://femb.ru/record/pharmacopeia14> (дата обращения: 05.08.2024).
39. ОФС.1.1.0007 «Стандартные образцы». Государственная Фармакопея Российской Федерации. - XV издание. – URL: <https://www.pharmacopeia.regmed.ru/pharmacopeia/izdanie-15/1/1-1/standartnye-obraztsy-/> (дата обращения 17.04.2024).
40. ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей»// Государственная Фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах]. – XIV издание, том I. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 553-554. - URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/553/> (дата обращения:14.09.2024).
41. ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография» // Государственная Фармакопея Российской Федерации. - XV издание. – URL:

- <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/khromatografiya/> (дата обращения 05.08.2024).
42. ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» // Государственная Фармакопея Российской Федерации. - XV издание. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/vysokoeffektivnaya-zhidkostnaya-khromatografiya/> (дата обращения 05.08.2024).
43. ОФС.1.4.1.0007 «Лекарственные формы для парентерального применения»// Государственная Фармакопея Российской Федерации: [в 4 томах]. – XIV издание, том II. – Москва: ФЭМБ, 2018. – С. 1881-1882. - URL: <https://femb.ru/record/pharmacopoeia14> (дата обращения: 13.08.2024).
44. ОФС.2.1.2.36 «Хроматографические методы разделения» // Фармакопея Евразийского экономического союза. – 2020. - том I, часть 1. – С.113. – URL: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/bd2/Farmakopeya-2020-t1_1.pdf (дата обращения 10.08.2024).
45. ОФС.2.2.1.2 «Валидация аналитических методик» // Фармакопея Евразийского экономического союза: [в 3 томах]. – Том 1, ч.2. – Москва, Евразийская экономическая комиссия, 2023. – С. 236-237. – ISBN 978-5-6049680-0-0. - URL: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf (дата обращения: 03.08.2024).
46. ОФС.2.2.1.2 «Стандартные растворы для испытаний на предельное содержание примесей»// Фармакопея Евразийского экономического союза: [в 3 томах]. – Том 1, ч.1. – Москва, Евразийская экономическая комиссия, 2020. – С. 494-501. - URL: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/bd2/Farmakopeya-2020-t1_1.pdf (дата обращения: 12.09.2024).

47. Государственный реестр зарегистрированных лекарственных средств – URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (дата обращения: 12.08.2024)
48. Интерферон альфа-2b, модифицированный полиэтиленгликолем, получение препарата и его применение / Публикация патента США. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2485134C2/ru>. (дата обращения: 01.11.2024).
49. Патент 2242516. Российская Федерация, МПК C12N15/21, A61K38/19. Способ получения рекомбинантного человеческого интерферона альфа-2b, рекомбинантная плазида и штамм продуцент для его осуществления: № 2003136404/15: заявл. 18.12.2003: опубл. 20.12.2004/ П.А. Черепанов, Т.Г. Михайлова, П.П. Черепанов. - 18 с.
50. Патент 2261913. Российская Федерация, МПК C12N15/22. Рекомбинантная плазмидная ДНК pES6-1, кодирующая полипептид интерферон бета-1b человека, и штамм *Escherichiacoli* BDEES6 – продуцент рекомбинантного интерферона бета-1b человека: № 2004100722/13: заявл. 15.01.2004: опубл. 10.10.2005 / Д.И. Баирамашвили, И.И. Воробьев, А.Г. Габибов. – 10 с.
51. Патент 2432401. Российская Федерация, МПК C12P21/06. Способ получения безметионинового интерферона альфа-2b человека: № 2009148626/10: заявл. 28.12.2009: опубл. 27.10.2011/ Д. А. Широков, В.В. Рябиченко, Р.И. Акишина. - 19 с.
52. Патент 2448160. Российская Федерация, Рекомбинантная плазмидная ДНК rar271, кодирующая полипептид фактора VII свертываемости крови человека, и линия клеток *mesocricetusauratus*ВНК 21 k.13 (2H7) - продуцент рекомбинантного фактора VII свертываемости крови человека: № 2010145842/10: заявл. 11.11.2010; опубл. 20.04.2012 / А.В. Петров, А.М. Шустер, О.В. Григорьева, А.Н. Александров, В.А. Мартьянов; заявитель и патентообладатель ЗАО «ГЕНЕРИУМ» - 14 с.

53. Патент 2473696. Российская Федерация, МПК C12P21/02. Промышленный способ получения и очистки рекомбинантного интерферона бета-1b человека из телец включения: № 2011129033/10: заявл. 14.07.2011: опубл. 27.01.2013/ А.И. Бобрускин, Н.В. Кононова, В.А. Мартьянов– 11 с.
54. Патент 2571496. Российская Федерация, МПК A61K/A61K. Новый стабилизатор для фармацевтических белков: № 2012149205/15: заявл. 27.05.2014: опубл. 20.12.2015 / Иварссон Эльза (SE), ЭстербергЙозефин (SE), Риппнер Брита (SE), Нильссон Ульрика (SE), Агерквист Ирене (SE) – 16 с.
55. Патент № RU2670965C9 Российская Федерация, МПК G01N30/74, СПК G01N33/15, G01N30/74. Способ измерения количества полисорбата-80 с применением щелочного гидролиза образца с последующей ВЭЖХ: № 2017143908: заявл. 14.12.2017: опубл. 21.11.2018 / Дегтерев М.Б.; Патентообладатели Общество с ограниченной ответственностью "Международный Биотехнологический Центр "Генериум" (RU). – 15 с. - URL:
<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/063923623/publication/RU2670965C9?q=prn%3DRU2670965C9> (дата обращения: 18.11.2024).
56. Патент EA012281B1. Евразийская патентная организация. Способ стабилизации белков: № EA200602254A, заявл. 27.05.2005: опубл. 28.08.2008 / АмерДжабер. – 48 с.
57. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии «О Фармакопее Евразийского экономического союза» от 11.08.2020 №100 // Электронный фонд правовых и нормативно - технических документов. - URL:
<https://docs.cntd.ru/document/565516251?section=text> (дата обращения: 18.08.2024).
58. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии «О Концепции гармонизации фармакопей государств – членов Евразийского экономического союза» от 22.09.2015 № 119 // Евразийская экономическая

- комиссия. - URL:
<https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/ec6/kontseptsiya.pdf> (дата обращения: 13.08.2024).
59. Решение Совета Евразийской экономической комиссии «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» от 03.11.2016 № 78 (с изм. и допол. в ред. от 29.05.2024) // Электронный фонд правовых и нормативно - технических документов. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026097> (дата обращения: 18.08.2024).
60. Решение Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» от 03.11.2016 № 89 (с изм. и допол. в ред. от 04.07.2023) // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026116> (дата обращения: 15.08.2024).
61. Решение Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза» от 03.11.2016 N 77 (с изменениями на 4 июля 2023 года) // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026099> (дата обращения: 30.09.2024).
62. Решение Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза» от 03.11.2016 N 79 // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026110> (дата обращения: 12.09.2024).
63. Решение Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 N 81 //

- Электронный фонд правовых и нормативно- технических документов. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026101> (дата обращения: 12.09.2024).
64. Решение Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» от 03.11.2016 N 89 (с изменениями на 4 июля 2023 года)// Электронный фонд правовых и нормативно- технических документов. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026116> (дата обращения: 12.09.2024).
65. Решение Совета Евразийской экономической комиссии «Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств» от 17.07.2018 № 113 // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/550738945> (дата обращения: 10.08.2024).
66. Исследование стабильности биотехнологических (биологических) препаратов // Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. В 6 т.: Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. Т. 3 – Москва: Ремедиум, 2017. – 360 с. – Глава 8. – С. 139-148. – ISBN 978=5-906499-23-3. – ISBN 978-5-906499-29-5.
67. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. Глава 5.1. Производство и контроль качества биотехнологических лекарственных препаратов, полученных по технологии рекомбинантной ДНК. М.: Ремедиум, 2017. - 360 с.
68. Производство и контроль качества биотехнологических лекарственных препаратов, полученных по технологии рекомбинантной ДНК// Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках

- Евразийского экономического союза. В 6 т.: Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. Т. 3 – Москва: Ремедиум, 2017. – 360 с.– Глава 5.1. – С. 81-89. – ISBN 978=5-906499-23-3. – ISBN 978-5-906499-29-5
69. Оценка качества биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК / А.Н.Миронов, В.А. Меркулов, Р.А. Волкова [и др.]// Руководство по экспертизе лекарственных средств: [в 4 томах]. – Том III. –344с. – Москва: ООО «Полиграф-Плюс», 2014.– Гл.1. – С. 4-23. - URL: <http://fptl.ru/biblioteka/razrabotka-i-ekspertiza-lekarstv.html> (дата обращения: 08.08.2024).
70. Оценка качества биологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов рекомбинантной ДНК: Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. III - Москва: Полиграф-плюс, 2014. - Глава 1, - С. 344.
71. Правила составления, изложения и оформления нормативной документации на фармацевтические субстанции лекарственного препарата для медицинского применения / А.Н. Миронов, И.В.Сакаева, Н.Д. Бунятыян [и др.] // Руководство по экспертизе лекарственных средств: [в 4 томах]. – Том II. – 280 с. – Москва: Гриф и К, 2013.– Гл.5. – С. 85-125. - URL: <http://fptl.ru/biblioteka/razrabotka-i-ekspertiza-lekarstv.html> (дата обращения: 11.08.2024).
72. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях / Пер. с англ. Р.Л. Кадиса, Г.Р. Нежиховского, В.Б. Симины; под общ. ред. Л. А. Конопелько. – СПб: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева, 2002. - 2-е издание. – 149 с. – URL: <https://rosakkreditatsiya-forum.ru/download/file.php?id=67> (дата обращения: 17.09.2024).

73. Руководство по биоподобным биологическим лекарственным препаратам, содержащим в качестве действующего вещества белки биотехнологического происхождения: вопросы качества (1-й пересмотр). – 2014. – EMEA/CHMP/BWP/24771/2012. URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3594/> (дата обращения: 18.09.2024).
74. Спецификации. Методы испытаний и критерии приемлемости биотехнологических (биологических) препаратов// Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. В 6 т.: Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. Т. 3 – Москва: Ремедиум, 2017. – 360 с.– Глава 6. – С. 119-134. – ISBN 978=5-906499-23-3. – ISBN 978-5-906499-29-5.
75. Разработка и производство лекарственных веществ (химические соединения и биотехнологические/биологические соединения) (ICH Q11) /Перевод: PharmAdvisor, версия перевода от 02.05.2020. - URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3635/> (дата обращения: 22.08.2024).
76. Сопоставимость биотехнологических/биологических препаратов, подвергшихся изменениям процесса производства (ICH Q5E) / Перевод: PharmAdvisor, версия перевода от 09.02.2021. - URL: <https://pharmadvisor.ru/document/tr3526/>.(дата обращения: 20.08.2024)
77. Трипсин, гидролиз белков // Справочник химика 21. Химия и химическая технология. - URL: <https://www.chem21.info/info/144036/> (дата обращения 11.07.2023).
78. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] ред.: Ю.А. Данилов, Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлов. - М.: Практика, 1999 - 459 с. - ISBN 5-89816-009-4.
79. Кюгерян, С.К. Атомный спектральный анализ нефтепродуктов. – Москва. - Химия. – 1985. - 320 с.

80. Лебедев, А.Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов/А.Т. Лебедев, К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина. - Москва: Техносфера, 2012. – 176 с.+ 4 с. цв. вкл. - ISBN 978-5-94836-334-9.
81. Перетрухина А. Т., Блинова Е. И. Бактерийные и вирусные препараты: Глава 12. Получение интерферона. – М.: Российская Академия Естествознания, 2010 - ISBN: 978-5-91327-156-3.
82. Попов, В.Ф. Лекарственные формы интерферонов: справочник врача/ В.Ф. Попов, О.В Попов. – М: Триада-Х, 2002. - 230 с. – ISBN 5-8249-0059-0.
83. Спирина, Н.Н. Ведение больных с рассеянным склерозом: метод. рекомендации / Н.Н. Спирина. – Москва, 2015. – 68 с.
84. Андреева, Т. А. Рекомбинантные препараты и их роль в современном лечении гемофилии/ Т. А. Андреева, Е. А. Селиванов // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2010. - Т. 9, №1. - С.32–41.
85. Блохин, Н. П. Особенности фармакологической динамики и кинетики пегилированного интерферона альфа (40кДа) «Пегасис»: новые возможности терапии хронического гепатита С / Н. П. Блохин, И. Г. Никитин // РЖГГК: материалы VII Российской конференции «Гепатология сегодня». – 2002. - Вып. 6.
86. Блынская, Е. В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных препаратов / Е. В. Блынская, С. В. Тишков, К. В. Алексеев // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Том. №1. - С. 6 – 11.
87. Волкова, Р. А. Требования к характеристике экспрессирующей конструкции и очищенного белка при проведении доклинических испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных с использованием методов генной инженерии / Р. А. Волкова, Ж. И. Авдеева, Е. В. Эльберт [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 49-52.

88. Гроховский, В.И. Определениеполисорбатов в биотехнологических препаратах / В.И. Гроховский, А.А. Бендрышев, С.В. Швец [и др.] // Разработкаи регистрация лекарственных средств. – 2017. - №2 (19). - С. 160-165.
89. Гусарова, В.Д. Физико-химические и биологические свойства биоподобного и референтного препаратов тканевого активатора плазминогена / В.Д. Гусарова, М.С. Пантюшенко, В.М. Симонов [и др.] // Биопрепараты – 2019. - Том 19, № 1. – С. 39-49.
90. Исаенко, Е. Ю. Адьюванты в современной вакцинологии / Е.Ю. Исаенко, Е.М. Бабич, И.В. Елисеева [и др.] // Annals of Mechnikov Institute. - 2013. - № 4. - С. 5 – 21.
91. Караулов, А. В. Обзор исследований вакцин семейства Гриппол и развития современных адьювантов / А.В. Караулов, А.С. Быков, Н.В. Волкова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика . – 2019. - Т.18 (4). - С.101-119.
92. Климов, В.И. Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств/ В.И. Климов, Е.И. Саканян, Р.А. Волкова [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2017. - Т.17. № 2. - С. 87-92.
93. Коробко, Д.С. Долгосрочная терапия рассеянного склероза интерфероном бета-1b. Результаты ретроспективного открытого наблюдательного исследования / Д.С. Коробко, М.А. Барабанова, К.З. Бахтиярова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. Спецвыпуски. – 2022. – Т. 122. - № 7-2. – С. 96 – 103.
94. Логинова, С.Я. Активность человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2*in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2 / С.Я. Логинова, В.Н. Щукина, С.В. Савенко, С.В. Борисевич // Вопросы вирусологии. – 2021. - Т. 66, №2. - С.123-128.

95. Никитин, И.Г. Пегилированные лекарственные препараты: современное состояние проблемы и перспективы / И.Г. Никитин, Байкова И.Е., Л.М. Гогова // Лечебное дело. - 2005. - № 4. - С. 18-24.
96. Никитин, И.Г. Пегилированные препараты: современное состояние проблемы и перспективы / И.Г. Никитин, Г.И. Строжаков // Вирусные гепатиты, достижения и перспективы: информационный бюллетень. – 2001. - №3(13). - С. 3-8.
97. Никифорова, А.Н. Результаты изучения иммуногенности инактивированной сезонной гриппозной вакцины с адъювантом «Совидон™» / А. Н. Никифорова, Д. С. Бушменков, В. А. Меркулов, Н. Н. Степанов // Научно-практический, образовательный, медицинский журнал Врач-Провизор-Пациент. – 2011. - №1. – С. М8.
98. Никифорова, А.Н. Вакцинопрофилактика и поиск новых адъювантов /А.Н. Никифорова, А.Н. Миронов // Сибирский медицинский журнал. – 2011. - №5. – С. 15-19.
99. Олефир, Ю.В. Современные биологические/биотехнологические лекарственные препараты. Актуальные вопросы разработки и перспективы использования / Ю.В. Олефир, Н. В. Медуницын, Ж.И. Авдеева [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2016. – Т. 16, № 3. - С. 67–77.
100. Орлова, Н.А. Фактор свертывания крови IX для терапии гемофилии В / Н.А. Орлова, С.В. Ковнир, И.И. Воробьев, А.Г. Габибов // ActaNaturae. – 2012. – Т.4. - № 2(13). - С. 62-75.
101. Попова, Е.В. Опыт применения российского биоаналога интерферона бета-1b в лечении детского рассеянного склероза/Е.В. Попова, А.Н. Бойко, О.В. Быкова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова – 2016. – № 6. – С. 73-75.

102. Рожков, С. П. Термодинамическое сродство к растворителю как показатель критических температур растворения белковых макромолекул/ С. П. Рожков, А. С. Горюнов // Труды Карельского научного центра РАН. - 2015. - № 12. - С. 96-100.
103. Солдатов, А.А. Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии / А.А. Солдатов, Ж.И. Авдеева, В.Д. Мосягин, Ю.В. Олефир [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т.61. - № 4. – С. 208-215.
104. Фадейкина, О.В. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств / О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова // Химико-фармацевтический журнал - 2017. - № 8. - С. 80-86.
105. Всероссийское общество гемофилии. – 2024. – [Электронный ресурс]. – URL: <https://hemophilia.ru> (дата обращения 08.02.2024).
106. Amino Acid Analysis // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia. – Issue 11.7. – 01/2010:20256.
107. Biotechnology–derived articles – Peptide mapping// United States Pharmacopoeia: Revision Bulletin. – 2009. – article 1055. – P.1 – 5 URL: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/peptideMapping.pdf (датаобращения:12.09.2024).
108. British Pharmacopoeia chemical reference substances. – 2024. – [Электронныйресурс]. – URL: <https://www.pharmacopoeia.com/reference-standards> (датаобращения: 01.09.2024).
109. Consortium for Functional Glycomics: Consortium for Functional GlycomicsDatabase / National Center for Functional Glycomics. – URL: <https://www.functionalglycomics.org/> (датаобращения: 12.09.2024).
110. Glycan analysis of glycoproteins// European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia. – Issue 11.6. – 01/2011:20259.

111. Human coagulation factor IX (rDNA) concentrated solution // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia. – Issue 11.6. – 01/2015:2522.
112. Human coagulation factor VIIa (rDNA) concentrated solution //European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia. – Issue 11.6. – 01/2015:2534.
113. Human coagulation factor VIII (rDNA) concentrated solution // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia. – Issue 11.6. – 01/2008:1643.
114. Interferon alfa–2 concentrated solution // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia – Issue 11.6. – 07/2015:1110.
115. Interferon beta–1a Concentrated Solution // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia. – Issue 11.6 – 01/2009:1639.
116. Peptide mapping // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia. – Issue 11.6 – 01/2010:20255.
117. Recombinant DNA technology, product of // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia – Issue 11.6. – 01/2008:0784.
118. Ph. Eur. Reference Standards: Purpose and use. – 2024. – [Электронныйресурс]. – Режимдоступа: <https://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-purpose-and-use> (датаобращения 16.02.2022).
119. Reference standards // European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care: European Pharmacopoeia. – Issue 11.6. – 01/2018:51200.
120. The European Pharmacopoeia Reference Standards catalogue – URL: <https://crs.edqm.eu/>(датаобращения:11.08.2024).
121. United States Pharmacopeia Reference Standards – URL: <https://www.usp.org/reference-standards>(датаобращения: 17.09.2024).

122. WHO Good manufacturing practices for biological products / WHO Technical Report Series. – 2016. – № 999. – Annex 2.
123. WHO Good practices for national pharmaceutical control laboratories // WHO Technical Report Series. – 2002. – № 902. – Annex 3.
124. WHO Guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology // WHO Technical Report Series. – 1991. – № 814.
125. WHO Guidelines on procedures and data requirements for changes to approved vaccines // WHO Technical Report Series. – 2017. – № 993. – Annex 4.
126. WHO Guidelines on procedures and data requirements for changes to approved biotherapeutic products // WHO Technical Report Series. – 2017. – № 1011. – Annex 3.
127. WHO Guidelines on Stability Evaluation of Vaccines // WHO Technical Report Series. — 2011. — №. 962. — Annex 3.
128. WHO Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology // WHO Technical Report Series. – 2014. – № 987. – Annex 4.
129. WHO Manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccines / Quality, Safety and Standards unit of the Department of Immunization, Vaccines and Biologicals; World Health Organization. – Geneva: WHO, 2011. – 228 p.
130. WHO Recommendations for evaluating animal cell cultures used as substrates for the production of biological products, as well as for describing the characteristics of cell banks // WHO Technical Report Series. – 2013. – № 978. – Annex 3.
131. WHO Recommendations for the preparation, characterization, and establishment of international and other biological reference standards // WHO Technical Report Series. — 2006. — №. 932. — Annex 2.

132. ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and products – Scientific guideline // European Medicines Agency. – 2003. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q1-r2-stability-testing-new-drug-substances-and-products-step-5_en.pdf (датаобращения: 11.08.2024).
133. ICH Q2 (R2) ICH harmonized guideline validation of analytical procedures: Scientific guideline // European Medicines Agency. – 2024. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (датаобращения 07.07.2024).
134. ICH Q5A (R2). Guideline on Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products from Cell Lines of Human or Animal Origin // European Medicines Agency. – 2023. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q5a2-guideline-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-or-animal-origin-step-5_en.pdf (датаобращения: 15.10.2024).
135. ICH Q5C. Guideline for industry: Quality of Biotechnological products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products // European Medicines Agency. – 1995. – URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q5C%20Guideline.pdf> (датаобращения: 18.08.2024).
136. ICH Q5D. Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products // European Medicines Agency. – 1997. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q5-d-derivation-and-characterisation-cell-substrates-used-production-biotechnological-biological-products-step-5_en.pdf (датаобращения: 15.10.2024).
137. ICH Q5B. Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of R-DNA Derived Protein Products // U.S. FOOD & DRUG Administration. – 1996. – URL: <https://www.fda.gov/media/71417/download> (датаобращения: 15.10.2024).

138. ICH Q5E. Guidance for industry: Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process // U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. – 2005. – URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q5e-comparability-biotechnologicalbiological-products-subject-changes-their-manufacturing-process> (датаобращения: 10.08.2024).
139. ICH Q6B. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products: Scientific guideline // European Medicines Agency. – 1999. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q6b-specifications-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological-biological-products-scientific-guideline> (датаобращения: 12.08.2024).
140. Concept paper on the revision of the reflection paper on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant interferon alpha or pegylated recombinant interferon alpha//European Medicines Agency. – 2015. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-concept-paper-revision-reflection-paper-non-clinical-clinical-development-similar-biological_en.pdf (датаобращения: 22.08.2024).
141. Guidance on the description of pegylated (conjugated) proteins in the SPC // European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. – 2003. – EMEA/CPMP/BWP/3068/03. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guidance-description-composition-pegylated-conjugated-proteins-spc_en.pdf (дата обращения: 19.08.2024).
142. Guideline on adjuvants in vaccines for human use [Электронныйресурс]. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-adjuvants-vaccines-human-use-see-also-explanatory-note_en.pdf (датаобращения 27.04.2024 г.).

143. Guideline on clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor IX products // European Medicines Agency. – 2015. – EMA/CHMP/BPWP/144552/2009. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-clinical-investigation-recombinant-and-human-plasma-derived-factor-ix-products_en.pdf (дата обращения: 12.05.2024).
144. Guideline on comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process – non-clinical and clinical issues // European Medicines Agency. – 2006. – EMEA/CHMP/BMWP/101695/2006. URL: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/2024-06/guideline-comparability-biotechnology-derived-medicinal-products-after-change-manufacturing-process-ema.pdf> (дата обращения: 14.09.2024).
145. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues // European Medicines Agency. – 2014. – EMA/CHMP/BWP/247713/2012. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active-substance-quality-issues-revision-1_en.pdf (дата обращения: 12.08.2024).
146. Guideline on similar biological medicinal products containing interferon beta//European Medicines Agency. – 2013. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/similar-biological-medicinal-products-containing-interferon-beta> (дата обращения: 22.08.2024).
147. Handling and Use of Non-Compendial Reference Standards in the OMCL Network: General European OMCL Network (GEON) Quality Management Document // European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. – 2012 (last adopted 2020). – PA/PH/OMCL (11) 204 R9.
148. Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in

- vaccines // The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; *Evaluation of Medicines for Human Use* London. – 2001. – CPMP/BWP/2517/00. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/points-consider-reduction-elimination-or-substitution-thiomersal-vaccines_en.pdf (дата обращения: 01.11.2024).
149. Production and quality control of medicinal products derived by recombinant DNA technology: Scientific guideline // European Medicines Agency. – 1994. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/production-quality-control-medicinal-products-derived-recombinant-dna-technology> (дата обращения: 23.08.2024).
150. Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances: Scientific guideline // European Medicines Agency. – 2000. – URL: <https://www.ema.europa.eu/en/production-quality-control-medicinal-products-derived-recombinant-dna-technology> (дата обращения: 23.08.2024).
151. Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology // European Medicines Agency. – 1994. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/production-and-quality-control-medicinal-products-derived-recombinant-dna-technology_en.pdf (дата обращения: 04.10.2024).
152. ISO 17034:2016. General requirements for the competence of reference material producers: published on 11. 2016 – Geneva: International Organization for Standardization, 2016. – Ed.1. – Vol. 1. – P. 24. – URL: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:29357:en> (дата обращения: 25.09.2024).
153. ISO 30:2015. Reference materials – Selected terms and definitions: published on 02. 2015 – Geneva: International Organization for Standardization, 2015. – Ed.3. – Vol. 1. – P. 8. – URL: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:guide:30:ed-3:v1:en> (дата 03.08.2024).

154. ISO 33401:2024. Reference materials –Contents of certificates, labels and accompanying documentation: published on 01. 2024 – Geneva: International Organization for Standardization, 2024. – Ed.1. – Vol. 1. – P. 10. – URL: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:84222:en> (датаобращения: 18.04.2024).
155. ISO 33403:2024. Reference materials – Good practice in using reference materials: published on 06. 2024 – Geneva: International Organization for Standardization, 2024. – Ed.1. – Vol. 1. – P. 26. – URL: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:33403:ed-1:v1:en> (датаобращения: 16.08.2024).
156. ISO 33405:2024. Reference materials –Approaches for characterization and assessment of homogeneity and stability: published on 05. 2024 – Geneva: International Organization for Standardization, 2024. – Ed.1. – Vol. 1. – P. 96. – URL: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:33405:ed-1:v1:en> (датаобращения: 25.08.2024).
157. European Patent Office 0809996. Interferon conjugates: application Number: 97108261.5: Publication: 03.12.1997 / P. Bailon, A. V. Palleroni – P. 16.
158. Patent № CA2438960A1 Canada, IPC A61K31/575, A61K31/7028, A61K31/704, A61K39/145, A61P31/16, C12N7/06, C12N7/04, CPC A61K39/145, A61K9/0021, A61P31/16, C12N7/00, A61K2039/54, C12N2760/16 134, C12N2760/16163. Novel vaccine: № PCT/EP02/01843: publication 06.09.2002 / Garcon N., Van Hoecke C., Slaoui M.M.; applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. – 52 p. – URL: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/026245752/publication/CA2438960A1?q=Patent%20WO%2002%2F067983.%20Novel%20vaccine.%202002-09-06> (датаобращения: 19.11.2024).
159. Patent № US6048537A United States of America, IPC C12N 7/02, A61K 35/145, C12N 7/00, C12N 7/06, A61K 39/145, A61K 49/00, A61P 31/00, C12N 7/04, CPC

- C12N 7/00, A61K 39/12, A61K 39/145, A61P 31/16, A61K 2039/5252, C12N 2760/16134 C12N 2760/16163. Method for preparing an influenza virus, antigens obtained and applications thereof: № 08793373: application 27.05.1997: publication 11.04.2000 / Violay J. M., Court G., Gerdil C., Chalumeau H., McVerry P.; applicant PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS. – 5 p. – URL: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/009466323/publication/US6048537A?q=pn%3DUS6048537> (датаобращения: 19.11.2024).
160. Patent № WO0122992A2 World Intellectual Property Organization, IPC A61K39/145, A61K47/02, A61K9/12, A61P31/16, C12N7/02, A61K39/00, CPC A61K39/12, A61K39/145, A61P31/12, A61P31/16, A61P37/04, C07K14/005, C12N7/00, A61K2039/5252, A61K2039/54, A61K2039/543, A61K2039/55505, C12N2760/16122, C12N2760/16151, C12N2760/16222, C12N2760/16234, C12N2760/16251. Novel composition: № PCT/EP00/09509: application 27.09.2000: publication 05.04.2001 / D'Hondt E., Henme N.; applicants SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE], SAECHSISCHES SERUMWERK [DE]. – 32 p. – URL: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/010861908/publication/WO0122992A2?q=WO%2001%2F22992A2> (датаобращения: 19.11.2024).
161. 0.1% w/w Polysorbate 80 in Water for Injection / PL 10673/0026 // MHRA UKPAR. – Octapharma Ltd. URL: <https://mhraproducts4853.blob.core.windows.net/docs/a6b5e378de8d4946c49af8bdee91a406696d0ca6> (дата обращения: 20.11.2024).
162. Validation of Chromatographic Methods: Reviewer Guidance // Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration. – 1994. – P. 33. – URL: <https://www.fda.gov/media/75643/download> (датаобращения: 05.06.2024).
163. Abu Lila, Amr S. 3 – PEGylation and anti-PEG antibodies engineering of biomaterials for drug delivery systems beyond polyethylene glycol / Amr S . Abu

- Lila, T. Shimizu, T. Ishida // Woodhead Publishing Series in Biomaterials. – 2018. – P.51–68. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101750-0.00003-9> (датаобращения: 23.09.2024).
164. Crommelin, D. J. A. Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications / D. J. A. Crommelin, A. Hawe, W. Jiskoot. – Germany: Berlin/Heidelberg, 2019. – P. 83 – 103.
165. Doerffel, K. Statistik in der analytischen Chemie. – Leipzig: Dt. Verl. Für Grundstoffindustrie, 1990 – 256 p. – ISBN3342005572 (ISBN–13: 9783342005575).
166. Interferon methods and protocols / edited by Daniel J. J. Carr. – Humana Totowa, 2005 – P.236 – ISBN 978–1–58829–418–0.
167. Lurie, Robert H. Cytokines and Cancer / edited by Leonidas C. Plataniotis. – NY: Springer, 2005 – P. 378 – ISBN 978–0–387–24360–3.
168. Mahler, H.–C. Protein aggregation and particle formation: effects of formulation, interfaces, and drug product manufacturing operations / H.–C. Mahler, S. Fischer, T. W. Randolph, J. F. Carpenter // Aggregation of Therapeutic Proteins. – John Wiley & Sons, Inc., 2010. – P. 301 – 331. – ISBN 9780470411964.
169. Mapping Multiple Sclerosis Around the World Multiple: Atlas of MS 2013 London: Sclerosis International Federation, 2013. – P. 28. URL: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf> (дата обращения:02.10.2024).
170. Multiple Sclerosis Resources in the World: Atlas –Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2008. – P.56. URL: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43968/9789241563758_eng.pdf?sequence=1(дата обращения: 02.10.2024).
171. Proteins at Solid–Liquid Interfaces (Principles and Practice) / S. Noinville, M. Revault. Conformations of Proteins Adsorbed at Liquid–Solid Interfaces. P. 119 –

150. ed. P. Déjardin – Berlin: Springer. – 2006. – 346 P. – ISBN–10 354032657X, ISBN013 978–3540326571.
172. Rowe, R.C. (ed) PolyoxyethyleneSorbitan Fatty Acid Esters / R.C. Rowe, P. J. Sheskey, M. E. Quinn (eds) // Handbook of Pharmaceutical Excipients. – 6th Ed. – Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. – P. 549–553.
173. Sahar, A. The case for protein PEGylation / A. Sahar, C. Ginn, S. Brocchini // Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems Beyond Polyethylene Glycol: Woodhead Publishing Series in Biomaterials. – 2018. – P. 27–49. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101750-0.00002-7> (датаобращения: 03.11.2024).
174. Salmaso, S. Peptide and Protein Bioconjugation /S. Salmaso, P. Caliceti // Peptide and Protein Delivery: Chapter 11, abstract. – 2011. – P. 247 – 290. URL: https://www.researchgate.net/publication/279426309_Peptide_and_Protein_Bioconjugation(дата обращения: 03.11.2024).
175. Srivastava, A. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia / A. Srivastava, E. Santagostino, A. Dougall [et al.] // Haemophilia. – 2020. – 3rd edition. – Suppl 6. – P. 1 – 158.
176. Stability of Protein Pharmaceuticals: vol. 3, Part B. *In Vivo* Pathways of Degradation and Strategies for Protein Stabilization / M. A. Hanson, S. K. E. Rouan. Introduction to formulation of protein pharmaceuticals. P. 209 – 233. ed. Tim J. Ahern and Mark C. Manning – New York: Plenum Press, 1992. – 328 P. — ISBN 978–0–306–44153–0.
177. Adamo, M. A simple reversed phase high–performance liquid chromatography method for polysorbate 80 quantitation in monoclonal antibody drug products / M. Adamo, L. W. Dick Jr., D. Qiu[et al.] // Journal of chromatography. B. – 2010. – Vol. 878. – № 21. – PP. 1865–1870.
178. Adams, A. Interferon beta–1b and childhood multiple sclerosis / A. Adams, W. Tyor, K. Holden // Pediatric Neurology. – 1999. – Vol. 21, Issue 1. – P. 481–483.

179. Agopian, A. Secondary structure analysis of HIV-1-gp41 in solution and adsorbed to aluminum hydroxide by Fourier transform infrared spectroscopy / A. Agopian, F. Ronzon, E. Sauzéat [et al.] // *BiochimBiophys Acta*. – 2007. – Vol. 1774(3). – P. 351–358.
180. Ahsana, F. Characterization and bioassay of post-translationally modified interferon -2b expressed in *Escherichia coli* /F. Ahsana, A. Amina, M. Nasir [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2014. – Vol. 184. – P. 11–16.
181. Alenda, R. Blood lymphocyte subsets identify optimal responders to interferon-beta in MS / R. Alenda, L. Costa- Frossard // *eurol*. – 2018 – Vol. 265. – P. 24–31.
182. Angelucci, C. Recombinant human IFN-beta affects androgen receptor level, neuroendocrine differentiation, cell adhesion, and motility in prostate cancer cells / C. Angelucci, F. Iacopino, S. Ferracuti // *J Interferon Cytokine Res*. – 2007. – Vol. 27 (8). – P. 643– 652.
183. Anson, D. S. Expression of active human clotting factor IX from recombinant DNA clones in mammalian cells/ D. S. Anson, D. E. Austen, G.G. Brownlee // *Nature*. – 1985. – Vol. 315. – P. 683–685.
184. Arakawa T, Timasheff SN. The stabilization of proteins by osmolytes / T. Arakawa, S. N. Timasheff // *Biophys J*. – 1985. – Vol. 47(3). – P. 411– 414.
185. Arakawa, T. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations / T. Arakawa, K. Tsumoto, Y. Kita [et al.] // *Amino Acids*. – 2007. – Vol.33(4). – P. 587–605.
186. Azuma, K. Application of Pre-Column Labeling Liquid Chromatography for Canine Plasma-Free Amino Acid Analysis / K. Azuma, Y. Hirao, Y. Hayakawa [et al.] // *Metabolites*. – 2016. – Vol.6(1). – P. 3.
187. Bach, E. A. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling / E. A. Bach, M. Aguet, R. D. Schreiber // *Annu. Rev. Immunol*. – 1997. – Vol. 15. – P.563 – 591.

188. Bailon, P. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 кДа branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C / P. Bailon, A. Palleroni, C. A. Schaffer [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2001. – Vol. 12. – P. 195 – 202.
189. Baldo, P. Interferon-alpha for maintenance of follicular lymphoma / P. Baldo, M. Rupolo, A. Compagnoni [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2010. – Vol. 20 (1):CD004629.
190. Baldrige, J. R. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents / J. R. Baldrige, P. McGowan, J. T. Evans [et al.] // *Expert Opin Biol Ther*. – 2004. – Vol.4(7). – P. 1129 – 1138.
191. Bam, N. B. Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions / N. B. Bam, J. L. Cleland, J. Yang [et al.] // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 1998. – Vol. 87. – № 12. – P. 1554 – 1559.
192. Barbero, P. Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis (INCOMIN Trail) II: analysis of MRI responses to treatment and correlation with NAb / P. Barbero, M. Bergui, E. Versino [et al.] for the INCOMIN Trial Study Group // *MultScler*. – 2006. – Vol.12, Issue 1. – P. 72 – 76. – Erratum in *MultScler*. – 2006. – 12(6). – P. 830.
193. Bauer, M. Poly (2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly (ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility // M. Bauer, C. Lautenschlaeger, K. Kempe [et al.] // *Macromol. Biosci*. – 2012. – Vol. 12. – P. 986 – 998.
194. Baum, K. Comparison of injection site pain and injection site reactions in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1a or 1b. / K. Baum, F. Coret Ferrer, E. Klimova [et al.] // *Mult. Scler*. – 2007. – Vol.13, Issue 9. – P. 1153 – 1160.

195. Beauglehole, A. C. Recent advances in the production of recombinant factor IX: bioprocessing and cell engineering / A. C. Beauglehole, D. R. Recinos, C. L. Pegg [et al.] // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2022. – Vol.43(3). – P. 484 – 502.
196. Belloni, L. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNAminichromosome / L. Belloni, L. Allweiss, F. Guerrieri // *J Clin Invest*. – 2012. – Vol. 122 (2). – P. 529 – 537.
197. Ben-Bassat, A. Amino-terminal processing of proteins / A. Ben-Bassat // *Nature*. – 1987. – Vol. 3. – P. 315–326.
198. Blick, S. K. A. Certolizumab pegol: in Crohn's disease / S. K. A. Blick, M. P. Curran // *BioDrugs*. – 2007. – Vol.21(3). – P.195 – 201; discussion 202 – 3.
199. Böhm, E. Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells / E. Böhm, B. K. Seyfried, M. Dockal [et al.] // *BMC Biotechnol*. – 2015. – Vol.15. – P. 87 – 101.
200. Bonacci, G. Stabilization of homogeneous preparations of pregnancy zone protein lyophilized in the presence of saccharose. Structural and functional studies / G. Bonacci, M. C. Sánchez, M. Gonzalez [et al.] // *J BiochemBiophys Methods*. – 2000. – Vol. 46(1–2). – P. 95–105.
201. Bond, M. Biochemical characterization of recombinant factor IX / M. Bond, M. Jankowski, H. Patel [et al.] // *SeminHematol*. – 1998. – Vol.35(2, Suppl 2). – P.11 – 7.
202. Borden, E. C. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine / E. C. Borden, G. C. Sen, G. Uze // *Nat. Rev. Drug Discov*. – 2007. – Vol.6 (12). – P. 975 – 990.
203. Bosch, L. Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods / L. Bosch, A. Alegría, R. Farré // *Journal of chromatography B. Analytical*

- Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2006. – Vol. 831(1–2). – P.176–183.
204. Brandstetter, H. X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B / H. Brandstetter, M. Bauer, R. Huber [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1995. – Vol. 92. – P. 9796 – 9800.
205. Braun, A.C. Predicting critical micelle concentration and micelle molecular weight of polysorbate 80 using compendial methods / A. C. Braun, D. Ilko, B. Merget [et al.] // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2015. – Vol. 94. – P. 559–68.
206. Braun, L. J. The role of adjuvant in mediating antigen structure and stability / L. J. Braun, A.M. Eldridge, J. Cumiskey [et al.] // J Pharm Sci. – 2012. – Vol.101(4). – P. 1391–13999.
207. Brice, P. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des LymphomesFolliculaires. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte / P. Brice, Y. Bastion, E. Lepage [et al.] // J ClinOncol. – 1997. – Vol. 15(3). – P.1110 – 7.
208. Brierley, M. M. Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry / M. M. Brierley, E. N. Fish //J. Interferon. Cytokine Res. – 2002. – Vol.22. – P. 835–845.
209. Buckel, P. Recombinant Protein Drugs. (Milestones in Drug Therapy) / P. Buckel // Molecules. – 2001. – Vol.6. – P. 1063.
210. Carpenter, J.F. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes / J. F. Carpenter, J. H. Crowe // Cryobiology. – 1988. – Vol. 25(3). – P. 244 – 55.
211. Castagnone, P. D. Tween 80 and the immunological defense against Ehrlich ascites carcinoma / P. D. Castagnone, R. F. Di, A. Ingrami // Archivioitaliano di patologia e clinicadeitumori. – 1967. – Vol. 10. – №1/2. – P.29 – 35.

212. Castro, L. S. Interferon–Based Biopharmaceuticals: Overview on the Production, Purification, and Formulation / L. S. Castro, G. S. Lobo, P. Pereira [et al.] // *Vaccines* (Basel). – 2021. – Vol. 9. – P. 328.
213. Chaplin, S. Plegridy for the treatment of RRMS in adults / S. Chaplin, S. Gnanapavan // *Prescriber*. – 2015. – P. 29 – 31. URL: <https://wileymicrositebuilder.com/practicaldiabetes/wp-content/uploads/sites/23/2015/12/Plegridy-for-the-treatment-of-RRMS-in-adults.pdf> (дата обращения: 02.11.2024).
214. Chapman, S.A. Acute renal failure and intravenous immune globulin: occurs with sucrose–stabilized, but not with D–sorbitol–stabilized, formulation / S. A. Chapman, K. L. Gilkerson, T. D. Davin, M. R. Pritzker // *Ann Pharmacother*. – 2004. – Vol. 38(12). – P. 2059 – 67.
215. Charles, R.M. The treatment of bleeding in acquired haemophilia with recombinant factor VIIa: Multicentre study / R. M. Charles, C. Hay, C. Ludlam // *ThrombHaemost*. – 1997. – Vol. 78(6). – P. 1463 – 7.
216. Chkhis, A. Efficacy of High–Dose Nebulized Interferon a 2b in Severe COVID–19 Pneumonia /A. Chkhis, N. Abdulrazzaq, S. Mokhtar, A. Al Jasmi // *Turk. Thorac. J.*– 2021. – Vol. 22. – P. 199 – 204.
217. Christiansen, A. Stability of the non–ionic surfactant polysorbate 80 investigated by HPLC–MS and charged aerosol detector / A. Christiansen, T. Backensfeld, S. Kühn, W. Weitschies // *Die Pharmazie*. – 2011. – Vol. 66. – № 9. – P. 666 – 671.
218. Cohen, S.A. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6–aminoquinoly1–N–hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high–performance liquid chromatography/ S. A. Cohen, D. P. Michaud // *Anal.Biochem*. – 1993. – Vol.211(2). – P. 279 – 287.
219. Colaprico, A. Adsorption onto aluminum hydroxide adjuvant protects antigens from degradation / A. Colaprico, S. Senesi, F. Ferlicca, B. Brunelli [et al.] // *Vaccine*. – 2020. Vol. 38(19). – P. 3600 – 3609.

220. Conradt, H.S. Structure of the carbohydrate moiety of human interferon- β secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line / H. S. Conradt, H. Egge // *J Biol Chem.* – 1987. – Vol. 262 (30). – P. 14600 – 14605.
221. Coppola, A. Current and evolving features in the clinical management of haemophilia / A. Coppola, M. Morfini, E. Cimino [et al.] // *Blood Transfus.* – 2014. – Vol. 3. – P. 554 – 562.
222. Croom, Katherine F. Recombinant Factor VIIa (Eptacog Alfa) A Review of its Use in Congenital Hemophilia with Inhibitors, Acquired Hemophilia, and Other Congenital Bleeding Disorders / Katherine F. Croom, Paul L. McCormack // *Biodrugs.* – 2008. – Vol. 22 (2). – P. 121 – 136.
223. Davoudi-Monfared, E. A randomized clinical trial of the efficacy and safety of interferon β -1a in treatment of severe COVID-19 / E. Davoudi-Monfared, H. Rahmani, H. Khalil // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2020. – Vol. 64 (9). – P. 01061.
224. Deechongkit, S. Physical and biophysical effects of polysorbate 20 and 80 on darbepoetin alfa / S. Deechongkit, J. Wen, L. O. Narhi [et al] // *Journal of pharmaceutical sciences.* – 2009. – Vol. 98. – №9. – P. 3200 – 3217.
225. Deisenhammer, F. Bioavailability of interferon beta 1b in MS patients with and without neutralizing antibodies / F. Deisenhammer, M. Reindl, J. Harvey // *Neurology.* – 1999. – Vol. 52. – P. 1239 – 1243.
226. Delgado, C. The uses and properties of PEG-linked proteins / C. Delgado, G. E. Francis, D. Fisher // *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems.* – 1992. – Vol. 9. – P. 249 – 304.
227. Deng, S. Quantification of Five Clinically Important Amino Acids by HPLC–Triple TOF™ 5600 Based on Pre-column Double Derivatization Method / S. Deng, D. Scott, U. Garg // *Methods Mol Biol.* – 2016. – Vol. 1378. – P. 47–53.

228. Didierlaurent, A. M. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines / A. M. Didierlaurent, B. Laupèze, A. Pasquale [et al.] // *Expert Rev Vaccines*. – 2017. – Vol. 16(1). – P. 55 – 63.
229. Dimitrov, I. 4.27–Olygmeric Poly (ethylene oxide)s. Functionalized Poly (ethylene glycol)s. PEGylation / I. Dimitrov, C.B. Tsvetanov // *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. – 2012. – Vol.4. – P. 679 – 693.
230. Dong, A. Secondary structures of proteins adsorbed onto aluminum hydroxide: infrared spectroscopic analysis of proteins from low solution concentrations / A. Dong, L. S. Jones, B. A. Kerwin [et al.] // *Anal Biochem*. – 2006. – Vol. 351(2). – P. 282 – 290.
231. Dozier, J. K. Site–Specific PEGylation of therapeutic proteins / J. K. Dozier, M. D. Distefano // *Int. J. Mol Sci*. – 2015. – Vol. 16 (10). – P. 25831 – 25864.
232. Dunn, A. L. Real–world experience with use of antihemophilic factor (Recombinant), PEGylated for prophylaxis in severe haemophilia / A. L. Dunn, S. P. Ahuja, E. S. Mullins // *Haemophilia*. – 2018. – Vol. 24. – P. e84 – e92.
233. Dwivedi, M. Polysorbate degradation in biotherapeutic formulations: identification and discussion of current root causes / M. Dwivedi, M. Blech, I. Presser, P. Garidel // *International journal of pharmaceutics*. – 2018. – Vol.552. – P. 422 – 436.
234. Elliott, J. A. W. Gibbsian Surface Thermodynamics / J. A. W. Elliott // *J Phys Chem B*. – 2020. – Vol. 124(48). – P. 10859 – 10878; Erratum in: *J Phys Chem B*. – 2023. – Vol.127(3). – P. 806.
235. Erkmen, C. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC): Latest Applications in the Pharmaceutical Researches / C. Erkmen, W. H.Gebrehiwot, B. Uslu // *Current Pharmaceutical Analysis*. – 2021. – Vol. 17 (3). –P. 316 – 345.
236. Fatouros, A. Recombinant factor VIII SQ — The influence of formulation parameters on structure and surface adsorption / A. Fatouros, B. Sjostrom // *International journal of pharmaceutics*. – 2000. – Vol. 194. – PP. 69–79.

237. Fekete, S. Fast and sensitive determination of Polysorbate 80 in solutions containing proteins // S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2010. – Vol. 52. – № 5. – P. 672 – 679.
238. Fischer, D. Effect of poly(ethylene imine) molecular weight and pegylation on organ distribution and pharmacokinetics of polyplexes with oligodeoxynucleotides in mice / D. Fischer, B. Osburg, H. Petersen [et al.] // *Drug Metab Dispos.* – 2004. – Vol. 32(9). – P. 983–92.
239. Foser, S. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon α -2a (PEGASYS) / S. Foser, A. Schacher, K. A. Weyer [et al.] // *Protein Exp. Purif.* – 2003. – Vol. 30. – P. 78 – 87.
240. Franchini, M. Recombinant factor VIII concentrates / M. Franchini, G. Lippi // *Semin Thromb Hemost.* – 2010. – Vol. 36(5). – P. 493 – 497.
241. Freund, J. Sensitization to horse serum by means of adjuvants / J. Freund, K. McDermott // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1942. – Vol. 49. – P. 548 – 553.
242. Gaberc–Porekar, V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins / V. Gaberc–Porekar, I. Zore, B. Podobnik, V. Menart // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* – 2008. – Vol. 11. – P. 242 – 250.
243. Ghaderi, D. Implications of the presence of N–glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins / D. Ghaderi, R. E. Taylor, V. Padler–Karavani, S. Diaz [et al.] // *Nature Biotechnol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 863 – 867.
244. Gherardi, R.K. Myalgia and chronic fatigue syndrome following immunization: macrophagic myofasciitis and animal studies support linkage to aluminum adjuvant persistency and diffusion in the immune system / R. K. Gherardi, G. Crépeaux, F. J. Authier // *Autoimmun Rev.* – 2019. – Vol.18(7). – P. 691 – 705.
245. Gisslinger, H. Ropoginterferon α -2b, a novel IFN α -2b, induces high response rates with low toxicity in patients with polycythemia vera / H. Gisslinger, O. Zagrijtschuk, V. Buxhofer–Ausch [et al.] // *Blood.* – 2015. – Vol.126(15). – P. 1762 – 9.

246. Glenny, A. Immunological notes. xvii–xxiv / A. Glenny, C. Pope, H. Waddington, U. J. Wallace // *Pathol. Bacteriol.* – 1926. – Vol. 29. – P. 31 – 40.
247. Grabarek, A. D. What makes polysorbate functional? Impact of polysorbate 80 grade and quality on IgG stability during mechanical stress / A. D. Grabarek, U. Bozic, J. Rousel [et al.] // *Journal of pharmaceutical sciences.* – 2020. – Vol. 109. – № 1. – P. 871 – 880.
248. Grace, M. Structural and biological characterization of pegylated recombinant IFN–alpha2b / M. Grace, S. Youngster, G. Gitlin [et al.] // *Journal of Interferon & Cytokine Research.* – 2001. – Vol. 21. – P. 1103 – 15.
249. Graham, M. L. Pegaspargase: a review of clinical studies / M. L. Graham // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2003. – Vol. 55. – P. 1293 – 1302.
250. Guo, Y. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography / Y. Guo, S. Gaiki // *J Chromatogr A.* – 2011. – Vol. 1218(35). – P. 5920 – 5938.
251. Guo, Y. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatograph / Y. Guo, S. Gaiki // *J Chromatogr A.* – 2005. – Vol.1074(1–2). – P.71 – 80.
252. Habermann, T. M. Splenectomy, interferon, and treatments of historical interest in hairy cell leukemia // *HematolOncolClin North Am.* – 2006. – Vol. 20. – P. 1075 – 86.
253. Hackl, E. Effect of Arginine on the Aggregation of Protein in Freeze–Dried Formulations Containing Sugars and Polyol: 1–Formulation Development / E. Hackl, J. Darkwah, G. Smith, I. Ermolina // *AAPS PharmSciTech.* – 2018. – Vol. 19. – P. 896 – 911.
254. Hagen, F.S. Characterization of a cDNA coding for human factor VII / F. S. Hagen, L. Gray, P. O’Hara [et al.] – URL: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.83.8.2412> (датаобращения: 15.08.2024).

255. Hahn, N. Therapeutic Interferon Interchange in Relapsing Multiple Sclerosis Lowers Health Care and Pharmacy Expenditures with Comparable Safety/N. Hahn, K. Palmer // *The Permanente Journal*. – 2018. – Vol. 22. – P. 18 – 46.
256. Hao, Z. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) // Z. Hao, B. Xiao, N. Weng // *J Sep Sci*. – 2008. – Vol.31(9). – P. 1449 – 1464.
257. Harris, J.M. Effect of pegylation on pharmaceuticals / J. M. Harris, R. B. Chess // *Nat.Rev. Drug Discov*. – 2003. – Vol. 2. – P. 214 – 221.
258. Harris, J.M. Poly(Ethylene Glycol) Chemistry. Biotechnological and Biomedical Applications / J. M. Harris. – New York: Plenum, 1992. – URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4899-0703-5>.
259. Heaton, J.C. Some factors that can lead to poor peak shape in hydrophilic interaction chromatography, and possibilities for their remediation / J. C. Heaton, D. V. McCalley // *J Chromatogr A*. – 2016. – Vol. 1427. – P. 37 – 44.
260. Hedner, U. Recombinant activated factor VII: 30 years of research and innovation / U. Hedner // *Blood Rev*. – 2015. – Vol. 29. – Sup. 1. – P. 54 – 58.
261. Hewitt, D. Mixed-mode and reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodologies to study composition and base hydrolysis of polysorbate 20 and 80 / D. Hewitt, M. Alvarez, K. Robinson [et al.] // *Journal of chromatography. A*. – 2011. – Vol. 1218. – P. 2138 – 2145.
262. Hu, M. High-performance liquid chromatographic determination of polysorbate 80 in pharmaceutical suspensions / M. Hu, M. Niculescu, X. M. Zhang., A. Hui // *J Chromatography A*. – 2003. – Vol. 984, issue 2. – P. 233 – 236.
263. Husek, P. Simultaneous profile analysis of plasma amino and organic acids by capillary gas chromatography / P. Husek // *J Chromatogr B Biomed Appl*. – 1995. – Vol. 669(2). – P. 352 – 7.

264. Hyun, J. W. Neutralizing Antibodies Against Interferon- β in Korean Patients with Multiple Sclerosis / J. W. Hyun, G. Kim, Y. Kim // *J Clin Neurol.* – 2018. – Vol.14. – P. 186 – 190.
265. Ilko, D. Fatty acid composition analysis in polysorbate 80 with high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detection / D. Ilko, A. Braun, O. Germershaus [et al] // *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik.* – 2015. – Vol. 94. – P. 569 – 574.
266. Inada, Y. Polyethylene Glycol (PEG)-Protein Conjugates: Application to Biomedical and Biotechnological Processes / Y. Inada, A. Matsushima, Y. Kodera // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers.* – 1990. – Vol. 5(3). – P. 343 – 64.
267. Iorio, A. Establishing the Prevalence and Prevalence at Birth of Hemophilia in Males: A Meta-analytic Approach Using National Registries / A. Iorio, J. S. Stonebraker, H. M. Chambost [et al.] // *Haemophilia. Epub.* – 2019. – Vol.171(8). – P. 540 – 546.
268. Isaacs, A. Virus interference. I. The interferon / A. Isaacs, J. Lindenmann // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 1957. – Vol. 147. – P. 258 – 267.
269. Ishibashi, M. Characterization of arginine as a solvent additive: a halophilic enzyme as a model protein / M. Ishibashi, K. Tsumoto, D. Ejima [et al] // *Protein Pept Lett.* – 2005. – Vol. 12(7). – P. 649 – 53.
270. Iwasaki, A. Why and How Vaccines Work / A. Iwasaki, S. B. Omer // *Cell.* – 2020. – Vol.183(2). – P. 290 – 295.
271. Iwasaki, Y. Separation technique for the determination of highly polar metabolites in biological samples / Y. Iwasaki, T. Sawada, K. Hatayama [et al.] // *Metabolites.* – 2012. – Vol. 2. – P. 496 – 515.
272. Iyer, V. Preformulation characterization of an aluminum salt-adjuvanted trivalent recombinant protein-based vaccine candidate against *Streptococcus pneumoniae* /

- V. Iyer, L. Hu, M. R. Liyanage [et al.] // *J Pharm Sci.* – 2012. – Vol. 101(9). – P. 3078 – 3090.
273. Jandera, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review / P. Jandera // *Anal Chim Acta.* – 2011. – Vol. 692 (1–2). – P. 1 – 25.
274. Jensen, K.T. Improving co-amorphous drug formulations by the addition of the highly water-soluble amino acid, proline / K.T. Jensen, K. Löbmann, T. Rades, H. Grohganz // *Pharmaceutics.* – 2014. – Vol. 6 (3). – P. 416 – 435.
275. Jevsevar, S. PEGylation of therapeutic proteins / S. Jevsevar, M. Kunstelj, V. G. Porekar // *Biotechnol. J.* – 2010. – Vol. 5. – P. 113 – 128.
276. Jin–Yan, L. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS–CoV–2 inhibit type I interferon signaling pathway / L. Jin–Yan, L. Ce–Heng, W. Qiong [et al.] / *Virus Res.* – 2020. – Vol. 286:198074.
277. Johnsen, E. Hydrophilic interaction chromatography of nucleoside triphosphates with temperature as a separation parameter // E. Johnsen, S. R. Wilson, I. Odsbu [et al.] // *J Chromatogr A.* – 2011. – Vol. 1218(35). – P. 5981 – 5986.
278. Jones, L.S. Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens / L. S. Jones, L. J Peek, J. Power [at al.] // *J Biol Chem.* – 2005. – Vol. 280(14). – P.13406 – 13414.
279. Jurlander B. Recombinant activated factor VII (rFVIIa): characterization, manufacturing and clinical development / B. Jurlander, L. Thim, N. Klausen [et al.] // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2001. – Vol. 27. – P.373 – 384.
280. Kamionka, M. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli* / M. Kamionka // *Current Pharmaceutical Biotechnology.* – 2011. – Vol. 12. – P. 268 – 274.
281. Kapp, S. J. Competitive adsorption of monoclonal antibodies and nonionic surfactants at solid hydrophobic surfaces / S. J. Kapp, I. Larsson, M. Van De Weert

- [et al.] // Journal of pharmaceutical sciences. – 2015. – Vol. 104. – № 2. – P. 593 – 601.
282. Karpusas, M. The structure of human interferon- β : implications for activity / M. Karpusas, A. Whitty, L. Runkel, P. Hofman // Cell. Mol. Life Sci. CMLS. – 1998. – Vol. 54 (11). –P. 1203 – 1216.
283. Karpusas, M. The crystal structure of human interferon beta at 2.2- Å resolution/ M. Karpusas, M. Nolte, C. B. Benton [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1997. – Vol. 94. – P. 11813 – 11818.
284. Kaufman, R. J. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells / R. J. Kaufman, L. C. Wasley, B. C. Furie, B. Furie[et al.] // J. Biol. Chem. – 1986. – Vol. 261(21). – P. 9622 – 9628.
285. Kayraklioglu, N. CpG Oligonucleotides as Vaccine Adjuvants/ N. Kayraklioglu, B. Horuluoglu, D. M. Klinman // Methods Mol Biol. – 2021. – Vol. 2197. – P. 51 – 85.
286. Kenneth, R. Enzymatic cleavage and HPLC peptide mapping of proteins / R. Kenneth, K. L. Stone // Molecular Biotechnology. – 1997. – Vol. 8 (2). – P. 155. – 167.
287. Kesik-Brodacka, M. Progress in biopharmaceutical development. / M. Kesik-Brodacka // Biotechnol Appl Biochem. – 2018. – Vol.65(3). – P. 306 – 322.
288. Khossravi, M. Analysis methods of polysorbate 20: A new method to assess the stability of polysorbate 20 and established methods that may overlook degraded polysorbate 20 / M. Khossravi, Y. H. Kao, R. J. Mersny, T. D. Sweeney // Pharmaceutical research. – 2002. – Vol. 19. – № 5. – P. 634 – 639.
289. Kim, J. Qiu J. Quantitation of low concentrations of polysorbates in high protein concentration formulations by solid phase extraction and cobalt-thiocyanate derivatization / J. Kim, J. Qiu // Anal Chim Acta. – 2014. – Vol. 806, P. 144 – 151.

290. Kim, N. A. Arginine as a protein stabilizer and destabilizer in liquid formulations / N. A. Kim, S. Hada, R. Thapa, S.H. Jeong // *Int J Pharm.* – 2016. – Vol. 513(1–2). – P. 26 – 37.
291. Kinstler, O. Mono–N–terminal poly(ethyleneglycol)–protein conjugates / O. Kinstler, G. Molineux, M. Treuheit[et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2002. – Vol. 54. – P. 477 – 485.
292. Kishore, R. S. K. The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics / R. S. K. Kishore, S. Kiese, S. Fischer [et al.] // *Pharmaceutical research.* – 2011. – Vol. 28. – P. 1194 – 1210.
293. Kita, Y. Contribution of the surface free energy perturbation to protein–solvent interactions / Y. Kita, T. Arakawa, T. Y. Lin, S. N. Timasheff // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. – P. 15178 – 15189.
294. Kivisakk, P. Neutralising and binding anti–interferon–b–1 b (IFN–b–1b) antibodies during IFN–b–1b treatment of multiple sclerosis / P. Kivisakk, G. V. Alm, W. Z. Tian [et al] // *MultScler.* – 1997. – Vol. 3. – P. 184 – 190.
295. Klaus, W. The Three–dimensional High–Resolution Structure of Human Interferon a–2a Determined by Heteronuclear NMR Spectroscopy in Solution / W. Klaus, B. Gsell, A. M. Labhardt[et al.] // *Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 274. – P. 661 – 675.
296. Klausen, N. K. Analysis of the site–specific asparagine–linked glycosylation of recombinant human coagulation factor VIIa by glycosidase digestions, liquid chromatography and mass spectrum / N. K. Klausen, S. Bayne, L. Palm // *Mol. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 9. – P.195 – 204.
297. Ko, E. J. Immunology and efficacy of MF59–adjuvanted vaccines / E. J. Ko, S.M. Kang // *Hum Vaccin Immunother.* – 2018. – Vol.14(12). – P. 3041 – 3045.
298. Kovner, D. Characterization of recombinantly–expressed hydrolytic enzymes from chinese hamster ovary cells: identification of host cell proteins that degrade

- polysorbate / D. Kovner, I. H. Yuk, A. J. Shen [et al] // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2023. – Vol. 112. – P. 1351 – 1363.
299. Kozlowski, A. Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C / A. Kozlowski, J. M. Harris // *Journal of Controlled Release*. – 2001. – Vol. 72. – P. 217 – 224.
300. Kozuch, B. Comparative stability study of polysorbate 20 and polysorbate 80 related to oxidative degradation / B. Kozuch, J. Weber, J. Buske[et al] // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – № 9. – P. 2332.
301. Kriegel, C. Pediatric safety of polysorbates in drug formulations / C. Kriegel, M. Festag, R. S. K. Kishore [et al] // *Children (Basel, Switzerland)*. – 2019. – Vol. 7. – № 1.
302. Krown, S. E. AIDS-associated Kaposi's sarcoma: is there still a role for interferon alfa? // S. E. Krown // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2007. – Vol. 18 (5–6). – P. 395 – 402.
303. Kubis, A. The cytotoxic effect of Tween 80 on Ehrlich ascites cancer cells in mice // A. Kubis, R. Witek, Z. Olszewski, S. Krupa // *Die Pharmazie*. – 1979. – Vol. 34. – №11. – P. 745 – 746.
304. Kumar, A. Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography / A. Kumar, J. C. Heaton, D. V. McCalley // *J Chromatogr A*. – 2013. – Vol. 1276. – P. 33 – 46.
305. Kumaran, J. Structure–function study of the extracellular domain of the human type I interferon receptor (IFNAR)–1 subunit / J. Kumaran, O. R. Colamonic, E. N. Fish // *J Interferon Cytokine Res.* – 2000. – Vol. 20(5). – P. 479 – 85.
306. Kusterle, M. Size of pegylated protein conjugates studied by various methods / M. Kusterle, S. Jevsevar, V. Gaberc–Porekar // *Acta Chim. Slov.* – 2008. – Vol. 55. – P. 594 – 601.

307. Lagassé, H. Recent advances in (therapeutic protein) drug development / H. Lagassé, A. Alexaki, V. Simhadri [et al.] // *F1000Research*. – 2017. – Vol. 6. – P. 113.
308. Lau, J. L. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions / J. L. Lau, M. K. Dunn // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 26. – P. 2700 – 2707.
309. Lee, H.J. Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs / H.J. Lee, A. McAuley, K.F. Schilke, J. McGuire // *Advanced drug delivery reviews*. – 2011. – Vol. 63. – № 13. – P. 1160 – 1171.
310. Li, J. Interfacial stress in the development of biologics: fundamental understanding, current practice, and future perspective / J. Li, M. E. Krause, X. Chen [et al] // *The AAPS journal*. – 2019. – Vol. 21. – № 3. – P. 44.
311. Liebert, M. A. Final report on the safety assessment of polysorbates 20, 21, 40, 60, 61, 65, 80, 81, and 85 / M. A. Liebert // *Journal of the American College of Toxicology*. – 1984. – Vol. 3. – № 5. – P. 1 – 82.
312. Liu, J. Improved expression of recombinant human factor iX by Co0expression of GGCX, VKOR and furin / J. Liu, A. Jonebring, J. Hangstrom, A.– Ch. Nystrom, A. Lovgren // *Protein J.* – 2014. – Vol. 33. – P. 174 – 183.
313. Liu, L. The effects of excipients on protein aggregation during agitation: an interfacial shear rheology study / L. Liu, W. Qi, D. K. Schwartz [et al]// *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2013. – Vol. 102. – № 8. – P. 2460 – 2470.
314. Liu, Z. A reliable LC–MS/MS method for the quantification of natural amino acids in mouse plasma: Method validation and application to a study on amino acid dynamics during hepatocellular carcinoma progression / Z. Liu, M.–J. Tu, C. Zhang [et al.] // *J Chromatogr B. Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2019. – Vol. 1124. – P. 72 – 81.
315. Lokugamage, K. G. SARSCoV–2 sensitive to type I interferon pretreatment / K. G. Lokugamage, C. Schindewolf, V. D. Menachery // *bioRxiv*. – 2020. – URL:

- <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.07.982264v3> (датаобращения: 16.10.2024).
316. Luxon, B.A. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C infection / B. A. Luxon, M. Grace, D. Brassard, R. Bordens // *Clinical Therapeutics*. – 2002. – Vol. 24. – P. 1363 – 1383.
317. Lv, J–Y. Histidine as a versatile excipient in the protein–based biopharmaceutical formulations / J–Y. Lv, R.G. Ingle, H. Wu [et al // *Int J Pharm*. – 2024. – Vol. 662. – P. 124472.
318. Lyseng–Williamson, K.A. Coagulation Factor IX (Recombinant), Albumin Fusion Protein (Albutrepenonacog Alfa; Idelvion[®]): A Review of Its Use in Haemophilia B / K. A. Lyseng–Williamson // *Drugs*. – 2017. – Vol. 77(1). – P. 97 – 106.
319. Macdougall, I. C. Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential new treatments for anaemia / I. C. Macdougall, K.–U. Eckardt // *Lancet*. – 2006. – Vol. 368. – P. 947 – 953.
320. Mannhalter, J. W. Modulation of the human immune response by the nontoxic and non–pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation/ J. W. Mannhalter // *Clin Exp Immunol*. – 1985. – Vol. 61(1). – P. 143 – 151.
321. Mannully, S. T. Perspectives on progressive strategies and recent trends in the production of recombinant human factor VIII / S. T. Manully, L. N. Ramya, K. K. Pulicherla // *Int J Biol Macromol*. – 2018. – Vol. 119. – P. 496 – 504.
322. Marrack, P. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium / P. Marrack, A. S. McKee, M. W. Munks // *Nat Rev Immunol*. – 2009. – Vol.9(4). – P. 287 – 293.
323. Masson, J. D. Critical analysis of reference studies on the toxicokinetics of aluminum–based adjuvants / J. D. Masson, G. Crépeaux, F. J. Authier [et al // *J InorgBiochem*. – 2018. – Vol. 181. – P. 87 – 95.

324. Maurelli, M. Interferon–beta injection site reactions in patients with multiple sclerosis / M. Maurelli, R. Bergamaschi, A. Antonin [et al.] / *J. Dermatolog Treat.* – 2018. – Vol. 29, Issue 8. – P. 831 – 834.
325. May, J.C. The aluminum content of biological products containing aluminum adjuvants: determination by atomic absorption spectrometry / J. C. May, J. J. Progar, R. Chin // *Journal of Biological Standardization.* – 1984. – Vol. 12. – P. 175 – 183.
326. McCalley, D. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica–based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography // *J Chromatogr A.*– 2010. – Vol. 1217(20). – P. 3408 – 3417.
327. McCalley, D. V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography / D.V. McCalley // *J Chromatogr A.* – 2017. – Vol. 1523. – P. 49 – 71.
328. McShan, A. C. Hydrolysis of polysorbate 20 and 80 by a range of carboxylester hydrolases / A. C. McShan, P. Kei, J. A. Ji [et al] // *PDA journal of pharmaceutical science and technology.* – 2016. – Vol. 70. – P. 332 – 345.
329. Medzhitov, R. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition / R. Medzhitov, C. A. Janeway // *Cell.* – 1997. – Vol. 91(3). – P. 295 – 298.
330. Mei, B. Rational design of a fully active, long–acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment / B. Mei, C. Pan, H. Jiang [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116(2). – P. 270 – 9.
331. Mero, A. Covalent conjugation of poly(ethylene glycol) to proteins and peptides: Strategies and methods / C. Clementi, FM. Veronese, G. Pasut // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 751. – P. 95–129.
332. Minton, A. P. Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: prediction and observation / A. P. Minton // *J Pharm Sci.* – 2005. – Vol. 94. – P. 1668 – 1675.

333. Mitsuyasu, R. T. Interferon alpha in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma / R. T. Mitsuyasu // *Br. J Haematol.* – 1991. – Vol. 79, Suppl 1. – P. 69 – 73.
334. Mogensen, K. E. The Type I Interferon Receptor: Structure, Function, and Evolution of a Family Business / K. E. Mogensen, M. Lewerenz, J. Reboul [et al] // *Journal of Interferon and Cytokine.* – 2004. – Vol. 19. – No. 10. – P. 1069 – 98.
335. Moncalvo, F. Nanosized Delivery Systems for Therapeutic Proteins: Clinically Validated Technologies and Advanced Development Strategies Front / F. Moncalvo, M. I. Martinez Espinoza, F. Cellesi // *Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00089> (датаобращения: 30.09.2024).
336. Mora, J. R., White, J. T. DeWall, S. L. Immunogenicity risk assessment for PEGylated therapeutics / J. R Mora, J. T. White, S. L. DeWall // *AAPS J.* – 2020. – Vol. 22. – P. 35.
337. Morefield, G. L. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro / G. L. Morefield, A. Sokolovska, D. Jiang [et al.] // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23(13). – P. 1588 – 1595.
338. Nair, L.M. Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection / L. M. Nair, N. V. Stephens, S. Vincent [et al] // *Journal of chromatography. A.* – 2003. – Vol. 1012. – № 1. – P. 81 – 86.
339. Nayak, V. S. Evaporative light scattering detection based HPLC method for the determination of polysorbate 80 in therapeutic protein formulations / V. S. Nayak, Z. Tan, P. M. Ihnat[et al] // *Journal of chromatographic science.* – 2012. – Vol. 50. – № 1. – P. 21–25.
340. Nielsen, F.S. Characterisation of recombinant factor IX before and after GlycoPEGylation / F. S. Nielsen, A. S. Schmidt, A. K. Kristensen [et al.] // *Int J Pharm.* – 2020. – Vol.15(588). – P. 119654.

341. Nucci, M. The therapeutic value of poly(ethylene–glycol)–modified proteins / M. Nucci, R. Shorr, A. Abuchoweski // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1991. – Vol. 6. – P. 133 – 151.
342. O'Hagan, D.T Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants / D. T. O'Hagan, N. M. Valiante // *Nat Rev Drug Discov*. – 2003. – Vol. 2(9). – P. 727 – 735.
343. Olive, C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants / C. Olive // *Expert Rev Vaccines*. – 2012. – Vol. 11(2). – P. 237 – 256.
344. Orru, S. Structural analysis of modified forms of recombinant IFN–beta produced under stress–simulating conditions / S. Orru, A. Amoresano, R. Siciliano [et al.] // *BiolChem*. – 2000. – Vol. 381. – P. 7 – 17.
345. Osterberg, T. Development of a freeze–dried albumin–free formulation of recombinant factor VIII SQ / T. Osterberg, A. Fatouros, M. Mikaelsson // *Pharmaceutical research*. – 1997. – Vol. 14. – №7. – P.892 – 898.
346. Ovanesov, M. V. Considerations on activity assay discrepancies in factor VIII and factor IX products / M. V. Ovanesov, J. W. Jackson, B. Golding, T. K. Lee // *J ThrombHaemost*. – 2021. – Vol. 19(9). – P. 2102 – 2111.
347. Ovanesov, M. V. Summary of the WHO hearing on the development of product–specific reference materials for coagulation factor VIII and factor IX products / M. V. Ovanesov, S. C. Williams [et al.] // *Biologicals*. – 2020. – Vol. 67. – P. 88 – 93.
348. Owens, D. E. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles / D. E. Owens, N. A. Peppas // *Int. J. Pharm*. – 2006. – Vol. 307. – P. 93 – 102.
349. Paik, J. Damoctocog Alfa Pegol: A Review in Haemophilia A / J. Paik, E. D. Deeks // *Drugs*. – 2019. – Vol. 79(10). – P. 1147 – 1156.
350. Pan, J. Rapid characterization of commercial polysorbate 80 by ultra–high performance supercritical fluid chromatography combined with quadrupole time–

- of-flight mass spectrometry / J. Pan, Y. Ji, Z. Du, J. Zhang // *Journal of chromatography. A.* – 2016. – Vol. 1465. – P. 190 – 196.
351. Pedersen, I.M. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism / I. M. Pedersen, G. Cheng, S. Wieland // *Nature.* – 2007. – Vol. 449 (7164). – P. 919 – 922.
352. Peek, L. J. Effects of stabilizers on the destabilization of proteins upon adsorption to aluminum salt adjuvants / L. J. Peek, T. T. Martin, C. Nation [et al.] // *J Pharm Sci.* – 2007. – Vol. 96(3). – P. 547 – 557.
353. Periat, A. Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides and proteins / A. Periat, S. Krull, D. Guillaume // *J Sep Sci.* – 2015. – Vol. 38(3). – P. 357 – 67.
354. Perucho, J. Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC / J. Perucho, R. Gonzalo-Gobernado, E. Bazan [et al.] // *Amino Acids.* – 2015. – Vol. 47(5). – P. 963 – 73.
355. Pestka, S. Interferons and their actions / S. Pestka, J. A. Langer, K. C. Zoon, C. E. Samuel // *Annu Rev Biochem.* – 1987. – Vol. 56. – P. 727 – 77.
356. Pfister, D. Process for protein PEGylation / D. Pfister, M. Morbidelli // *Journal of Controlled Release.* – 2014. – Vol. 180. – P. 134 – 149.
357. Phillip, D.M. Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial / D. M. Phillip, R. J. Marsden, V. J. Tear // *Lancet Respir Med.* – 2021. – Vol. 9 (2). – P. 196 – 206.
358. Piedmonte, D. M. Formulation of Neulasta(R) (pegfilgrastim) / D. M. Piedmonte, M. J. Treuheit // *Adv. Drug Del. Rev.* – 2008. – Vol. 60. – P. 50 – 58.
359. Pokorski, J. K. Structural characterization of protein-polymer conjugates for biomedical applications with small-angle scattering / J. K. Pokorski, M. J. A. Hore // *Currenyt Opinion in Colloid and Interface Science.* – 2019. – Vol. 42. – P.157 –

168. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.08.001> (датаобращения: 03.11.2024).
360. Poon, M. C. Recombinant factor IX recovery and inhibitor safety: a Canadian post-licensure surveillance study/ M. C. Poon, D. Lillicrap, C. Hensman [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2002. – Vol. 87(3). – P. 431 – 443.
361. Porfiryeva, N. PEGylated systems in pharmaceuticals / N. Porfiryeva, R. I. Moustafine, V. V. Khutoryanskiy // *Polymer Science Series C.* – 2020. – Vol. 62. – P. 62 – 74 – URL: <https://doi.org/10.1134/S181123822001004X> (датаобращения: 18.08.2024).
362. Porres, J. C. Treatment of chronic delta infection with recombinant human interferon alpha 2c at high doses / J. C. Porres, V. Carreño, J. Bartolomé [et al.] // *J Hepatol.* – 1989. – Vol. 9(3). – P. 338 – 44.
363. Povsic, T. J. Pre-existing anti-PEG antibodies are associated with severe immediate allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated aptamer / T. J. Povsic, M. G. Lawrence, A. M. Lincoff[et al.] // *J. AllergyClin. Immunol.* – 2016. – Vol. 138. – P. 1712 – 1715.
364. Pretorius, C. J. Rapid amino acid quantitation with pre-column derivatization; ultra-performance reverse phase liquid chromatography and single quadrupole mass spectrometry / C. J. Pretorius, B. C. McWhinney, B. Sipinkoski [et al.] // *Clin Chim Acta.* – 2018. – Vol. 478. – P. 132 – 139.
365. Principi, N. Aluminum in vaccines: Does it create a safety problem? / N. Principi, S. Esposito // *Vaccine.* – 2018. – Vol. 36(39). – P. 5825 – 5831.
366. Prinsen, H. Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass-spectrometry / H. Prinsen, B. Schiebergen-Bronkhorst, M. W. Roeleveld [et al.] // *J Inherit Metab Dis.* – 2016. – Vol. 9 (5). – P. 651 – 660.
367. Prinsen, H. C. M. T. Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem

- mass–spectrometry / H. C. M. T. Prinsen, B. G. M. Schiebergen–Bronkhorst, M. W. Roeleveld [et al.] // *J. Inherit Metab. Dis.* – 2016. – Vol. 39, issue 5. – P. 651 – 660.
368. Pulendran, B. S. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants/ B. S. Pulendran, P. Arunachalam, D.T. O'Hagan // *Nat Rev Drug Discov.* – 2021.– Vol. 20(6). – P. 454 – 475.
369. Pyn, A. Solute crystallization in mannitol–glycine systems—implications on protein stabilization in freeze–dried formulations / A. Pyne, K. Chatterjee, R. Suryanarayanan // *J Pharm Sci.* – 2003. – Vol. 92(11). – P. 2272 – 83.
370. Qiang, Y. Preparation and characterization of mono-PEGylated consensus interferon by a novel polyethylene glycol derivative / Y. Qiang, X. Wenchao, M. Guanghui, S. Zhiguo // *ChemTech and Biotech.* – 2006. – Vol. 81. – P. 776 – 781.
371. Qing, X. Protein N–terminal processing: substrate specificity of *Escherichia coli* and human methionine aminopeptidases / X. Qing, F. Zhang, A. N. Benjamin // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49 (26). – P. 5588 – 5599.
372. Radhakrishnan, R. Zinc mediated dimer of human interferon alpha 2b revealed by X–Ray crystallography / R. Radhakrishnan, L. J. Walter, A. Hruza // *Structure.* – 1996. – Vol. 4 (12). – P. 1453 – 1463.
373. Rahmani, H. Interferon β –1b in treatment of severe COVID–19: a randomized clinical trial / H. Rahmani, E. Davoudi–Monfared, A. Nourian // *IntImmunopharmacol.* – 2020. – Vol. 88. – P. 106903.
374. Raso, S Recombinant factor VIII: past, present and future of treatment of hemophilia A / S. Raso, C. Hermans // *Drugs Today (Barc).* – 2018, – Vol. 54(4). – P. 269 – 281.
375. Ratain, M. J. The role of interferon in the treatment of hairy cell leukemia / M. J. Ratain, J. W. Vardiman, H. M. Golomb // *SeminOncol.* – 1986.– Vol.13, (3 Suppl 2). – P. 21 – 8.

376. Ravasco, J. M. J. M. Bioconjugation with maleimides: a useful tool for chemical biology / J. M. J. M. Ravasco, H. Faustino, A. Trindade, P. M. P. Gois // *Chem. A Eur. J.* – 2019. – Vol. 25. – P. 43 – 59.
377. Reed, S.G. Key roles of adjuvants in modern vaccines / S. G. Reed, M. T. Orr, C. B. Fox // *Nat Med.* – 2013. – Vol. 19(12). – P. 1597 – 1608.
378. Régnier, M. Structural perturbation of diphtheria toxoid upon adsorption to aluminium hydroxide adjuvant / M. Régnier, M. C. Metz, W. Jiskoot. // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30(48). – P. 6783 – 6788.
379. Rudick, R. A. Incidence and significance of neutralizing antibodies to interferon beta–1a in multiple sclerosis / R. A. Rudick, N. A. Simonian, J. A. Alam [et al.] // *Neurology.* – 1998. – Vol. 50. – P. 1266 – 1272.
380. Runkel, L. Structural and functional differences between glycosylated and nonglycosylated forms of human interferon–beta (IFN–beta) / L. Runkel, W. Meier, B. Pepinsky [et al.] // *Pharm. Res.* – 1998. – Vol. 15. – P. 641 – 649.
381. Russell–Jones, R. Interferon–alpha therapy for melanoma. Review / R. Russell–Jones // *Clin Exp Dermatol.* – 2000. – Vol. 25. – P. 1 – 6.
382. Ruta, J. A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography / J. Ruta, S. Rudaz, D. V. McCalley[et al.] // *J Chromatogr A.* – 2010. – Vol. 1217(52). – P. 8230 – 8240.
383. Sakai, T. The gamma–carboxyglutamic acid domain of human factor VIIa is essential for its interaction with cell surface tissue factor / T. Sakai, T. Lund–Hansen, L. Thim, W. Kisiel // *J Biol Chem.* – 1990. – Vol. 265, No.4. – P. 1890 – 1894.
384. Sakamoto, T. Simultaneous Amino Acid Analysis Based on ¹⁹F NMR Using a Modified OPA–Derivatization Method / T. Sakamoto, Z. Qiu, M. Inagaki, K. Fujimoto // *Anal Chem.* – 2020. – Vol. 92(2). – P. 1669 – 1673.
385. Samuel, D. C. Proline inhibits aggregation during protein refolding / D. Samuel, T.K. Kumar, G. Ganesh [et al.] // *Protein Sci.* – 2000. – Vol. 9(2). – P. 344 – 52.

386. Sánchez–Tapias, J. M. Recombinant alpha 2c–interferon therapy in fulminant viral hepatitis / J. M. Sánchez–Tapias, A. Mas, J. Costa [et al.] // *J. Hepatol.* – 1987. – Vol. 5(2). – P. 205 – 10.
387. Sang, Hoon Paik. Mixture of Tree Amino Acids as Stabilizers Replacing Albumin in Lyophilization of New Third Generation Recombinant Factor VIII GreenGene F / Sang Hoon Paik, Yong Jae Kim, Sang Kyul Han [et al.] // *Biotechnol. Prog.* – 2012. – Vol. 28. – No.6. – P. 1517 – 1525.
388. Satchell, S. C. Interferon– beta reduces proteinuria in experimental glomerulonephritis / S. C. Satchell, O. Buchatska, S. B. Khan // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – Vol. 18 (11). – P. 2875 – 2884.
389. Saurabh, S. Understanding the Stabilizing Effect of Histidine on mAb Aggregation: A Molecular Dynamics Study / S. Saurabh, C. Kalonia, Z. Li [et al.] // *Mol Pharm.* – 2022. – Vol. 19(9). P. – 3288 – 3303.
390. Savjani, N. Use of ferric thiocyanate derivatization for quantification of polysorbate 80 in high concentration protein formulations / N. Savjani, E. Babcock, H. K. Khor, A. Raghani // *Talanta.* – 2014. – Vol. 130. – P. 542 – 546.
391. Schiffer, C.A. Interferon studies in the treatment of patients with leukemia/ C. A. Schiffer // *Semin Oncol.* – 1991. – Vol. 18, (5 Suppl 7). – P. 1 – 6.
392. Schuster, J. In vivo stability of therapeutic proteins / J. Schuster, A. Koulov, H.–C. Mahler [et al.] // *Pharm. Res.* – 2020. – Vol. 37. – P. 23.
393. Seely, J. E. Making site–specific PEGylation work / J. E. Seely, S. D. Buckel, P. D. Green, C. W. Richey // *Biopharm Int.* – 2005. – Vol. 18. – P. 30 – 35.
394. Seyfried, B. MALDI linear TOF mass spectrometry of PEGylated (glyco)proteins / B. Seyfried, J. Siekmann, O. Belgacem, R.J. Wenzel // *J Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 45(6). – P. 612 – 7.
395. Shardlowa, E. The measurement and full statistical analysis including Bayesian methods of the aluminium content of infant vaccines / E. Shardlowa, C. Linhart,

- S. Connor // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2021. – Vol. 66. – P. 1 – 7.
396. Shi, S. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity / S. Shi, H. Zhu, X. Xia [at al.] // *Vaccine*. – 2019. – Vol. 37(24). – P. 3167 – 3178.
397. Shima, M. Current status and future prospects of activated recombinant coagulation factor VIIa, NovoSeven®, in the treatment of haemophilia and rare bleeding disorders / M. Shima // *Ann Hematol*. – 2024. – Vol. 103(8). – P. 2647 – 2658.
398. Siddiqi, H.K. COVID–19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical–therapeutic staging proposal / H. K. Siddiqi, M. R. Mehra // *J. Heart Lung Transplant*. – 2020. – Vol. 39(5). – P. 405 – 7.
399. Sinanoglu. O. Effect of water and other solvents on the structure of biopolymers / O. Sinanoglu, S. Abdalnur // *Fed Proc*. – 1965. – Vol. 24. – S. 12–23.
400. Singh, S. M. Effect of polysorbate 20 and polysorbate 80 on the higher–order structure of a monoclonal antibody and its Fab and Fc fragments probed using 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy / S.M. Singh, S. Bandi, D. N. M. Jones, K. M.G. Mallela // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2017. – Vol. 106. – №12. – P. 3486 – 3498.
401. Socia, A. Direct determination of amino acids by hydrophilic liquid chromatography with charged aerosol detection / A. Socia, J. P. Foley // *J. Chromatogr. A*. – 2016. – Vol. 1446. – P. 41 – 49.
402. Sørensen, H. P. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* / H. P. Sørensen, K. K. Mortensen // *Microbial Cell Factories*. – 2005. – Vol. 4(1). – P. 1.
403. Stanford, M. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids / M. Stanford, H. S. William // *Journal of Biological Chemistry*. – 1948. – Vol. 176 (1), – P. 367 – 388.

404. Stärtzel, P. Arginine as an Excipient for Protein Freeze–Drying: A Mini Review / P. Stärtzel // *J Pharm Sci.* – 2018. – Vol. 107(4). – P. 960 – 967.
405. Sun, H. Simultaneous quantitative analysis of polyethylene glycol (PEG), PEGylated paclitaxel and paclitaxel in rats by MS/MS^{ALL} technique with hybrid quadrupole time–of–flight mass spectrometry / H. Sun, Q. Zhang, Z. Zhang [et al.] // *J Pharm Biomed Anal.* – 2017. – Vol. 145. – P. 255 – 261.
406. Sutkeviciute, I. The influence of different glycosylation patterns on factor VII biological activity / I. Sutkeviciute, E. Mistiniene, J. Sereikaite, V. Bumelis // *Biochimie.* – 2009. – Vol. 91. – P.1123 – 1130.
407. TalukДar, R. Pancreatic stellate cells: new target in the treatment of chronic pancreatitis / R. TalukДar, R. Tandon // *Gastroenterol. Hepatol.* – 2008. – Vol. 23 (1). – P. 34 – 41.
408. Tani, T. H. Single step method for the accurate concentration determination of polysorbate 80 / T. H. Tani, J. M. Moore, T. W. Patapoff // *Journal of Chromatography. A.* – 1997. – Vol. 786. – № 1. – P. 99 – 106.
409. Themelis, T. A novel hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of underivatized amino acids in alimentary supplements / T. Themelis, R. Gotti, R. Gatti // *J Pharm Biomed Anal.* – 2017. – Vol. 145. – P. 751 – 757.
410. Trottier, M.D. Peripheral, but not central nervous system, type I interferon expression in mice in response to intranasal vesicular stomatitis virus infection / M. D. Trottier, D. S. Lyles // *J. Neurovirol.* – 2007. – Vol. 13 (5). – P. 433 – 445.
411. Tsumoto, K. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification / K. Tsumoto, M. Umetsu, I. Kumagai [et al.] // *Biotechnol Prog.* – 2004. – Vol. 20(5). – P. 1301 – 8.
412. Turecek, P. L. PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs / P. L. Turecek, M. J.Bossard, F. Schoetens, I. A. Ivens // *J.Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 105. – P. 460 – 475.

413. Turecek, P.L. BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterization / P. L. Turecek, M. J. Bossard, M. Graninger [et al.] // *Hamostaseologie*. – 2012. – Vol.32, Suppl 1. – S. 29 – 38.
414. Turecek, P. L. A Review of Chemistry and. *Journal of Pharmaceutical Sciences* / P.L.Turecek, M.J. Bossard, F. Schooetens, I.A. Ivens // *PEGylation of Biopharmaceuticals*. – 2016. – Vol. 105, Issue2. – P. 460 – 475.
415. Van Tellingen, O. Rapid esterase-sensitive breakdown of polysorbate 80 and its impact on the plasma pharmacokinetics of docetaxel and metabolites in mice / O. Van Tellingen, J. H. Beijnen, J. Verweij [et al] // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 1999. – Vol. 5. – № 10. – P. 2918 – 2924.
416. Vancompernelle, B. Optimization of a gas chromatography–mass spectrometry method with methyl chloroformate derivatization for quantification of amino acids in plant tissue / B. Vancompernelle, K. Croes, G. Angenon // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. – 2016. – Vol. 1017–1018. – P. 241 – 249.
417. Vargason, A.M. The evolution of commercial drug delivery technologies / A. M. Vargason, C. A. Aaron, S. Mitragotri // *Nat Biomed Eng*. – 2021. – Vol. 5. – P. 951 – 967.
418. Verma, S. K. New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective / S. K. Verma, P. Mahajan, N.K. Singh [at al.] // *Front Immunol*. – 2023. – Vol. 14:1043109.
419. Wagner, R. Zusammensetzung und Wirkmechanismen von Adjuvanzen in zugelassenen viralen Impfstoffen [Composition and mode of action of adjuvants in licensed viral vaccines] / R. Wagner, E. Hildt. // *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. – 2019. – Vol. 62(4). – P. 462 – 471.

420. Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks / G. Walsh. // *Nat. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 36, P. 1136 – 1145.
421. Wang, S. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications / S. Wang, S. Youngster, M. Grace [et al.] // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2002. – Vol. 54(4). – P. 547 – 70.
422. Waugh, D.S. An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags // *Protein expression and purification.* – 2011. – Vol. 80(2). – P. 283 – 293.
423. Weir, N. A new generation of high-affinity humanized PEGylated Fab' fragment anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibodies / N. Weir, D. Athwal, D. Brown, R. Foulkes // *Therapy.* – 2006. – Vol. 3(4). – P. 535 – 45. URL: https://www.researchgate.net/publication/244934121_A_new_generation_of_high-affinity_humanized_PEGylated_Fab_fragment_anti-tumor_necrosis_factor-monoclonal_antibodies (дата обращения: 25.09.2024).
424. Weismann, C. Structure and expression of human alpha-interferon genes / C. Weismann, S. Nagata, S. Boll [et al.] // *Princess Takamatsu Symp.* – 1982. – Vol. 12. – P. 1 – 22.
425. Weisser, K. Aluminium in plasma and tissues after intramuscular injection of adjuvanted human vaccines in rats / K. Weisser, T. Göen, J. D. Oduro [et al.] // *Arch Toxicol.* – 2019. – Vol. 93(10). – P. 2787 – 2796.
426. Wetzel, R. J. Properties of a human alpha-interferon purified from E. coli extracts / R. Wetzel, L. J. Perry, D. A. Estell [et al.] // *Interferon Res.* – 1981. – Vol. 1(3). – P. 381 – 90.
427. Yamaoka, T. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice / T. Yamaoka, Y. Tabata, Y. Ikada // *Journal of Pharmaceutical Science.* – 1994. – Vol. 83. – P. 601 – 606.

428. Yancey, P. H. Living with water stress: evolution of osmolyte systems / P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand [et al.] // *Science*. – 1982. – Vol. 217(4566). – P. 1214 – 22.
429. Yokoyama, T. Simultaneous determination of primary and secondary d- and l- amino acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with two-step labelling method / T. Yokoyama, M. Tokuda, M. Amano, K. Mikami // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* – 2017.– Vol. 81 (9). – P. 1681 – 1686.
430. Yu-Sen Wang, S. Y. Identification of the Major Positional Isomer of Pegylated Interferon Alpha-2b / S. Y. Yu-Sen Wang // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39 (35). – P. 10634 – 10640.
431. Yu, H. Simultaneous determination of amino acids and carbohydrates by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection / H. Yu, Y. S. Ding, S. F. Mou [et al.] // *J Chromatogr A*. – 2002. – Vol. 966 (1-2). – P. 89 – 97.
432. Yu, J. Interferon-a-2b Aerosol Inhalation Is Associated with Improved Clinical Outcomes in Patients with Coronavirus Disease-2019 / J. Yu, X. Lu, L. Tong, X. Shi, J. Ma[et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* –2021. – Vol. 87. – P. 4737 – 4746.
433. Zacchi, L. F. Coagulation factor IX analysis in bioreactor cell culture supernatant predicts quality of the purified product / L. F. Zacchi, D. Roche-Recinos, C.L. Pegg [et al.] // *CommunBiol.* – 2021. – Vol. 4(1). – P. 1 – 19.
434. Zaghmi, A. Determination of the degree of PEGylation of protein bioconjugates using data from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy / A. Zaghmi, A. A. Greschner, E. Mendez-Villuendas [et al.] // *Data Brief*. – 2019. – Vol. 25. – P. 104037. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6565728/> (дата обращения: 30.09.2024).
435. Zaghmi, A. Mechanisms of activity loss for a multi-PEGylated protein by experiment and simulation / A. Zaghmi, A. A. Greschner, E. Mendez-Villuendas,

- [et al.] // *Materials Today Chemistry*. – 2019. – Vol. 12. – P. 121–131. – URL: https://www.researchgate.net/publication/330969658_Mechanisms_of_activity_loss_for_a_multi-PEGylated_protein_by_experiment_and_simulation (датаобращения: 02.11.2024).
436. Zalipsky, S. Functionalized poly (ethylene glycols) for preparation of biologically relevant conjugates / S. Zalipsky // *Bioconjug. Chem.* – 1995. – Vol. 6. – P. 150 – 165.
437. Zhang, C. Loss of PEG chain in routine SDS–PAGE analysis of PEG–maleimide modified protein / C. Zhang, Y. Liu, C. Feng [et al.] // *Electrophoresis*. – 2015. – Vol. 36(2). – P. 371 – 4.
438. Zhang, J. NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A / J. Zhang, X. Peng, A. Jonas, J. Jonas // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34(27). – P. 8631 – 41.
439. Zhang, P. Polypeptides with high zwitterion density for safe and effective therapeutics / P. Zhang, P. Priesch, C. Tsao [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2018. – Vol. 57. – P. 7743 – 7747.
440. Zhang, Q. Recent applications of hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmaceutical analysis / Q. Zhang, F. Q. Yang, L. Ge [et al.] // *J Sep Sci.* – 2017. – Vol. 40(1). – P. 49 – 80.
441. Zhao, T. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms / T. Zhao, Y. Cai, Y. Jiang [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2023. – Vol. 8(1). – P. 283.
442. Zheng, Y. Respiratory Syncytial Virus F Subunit Vaccine With AS02 Adjuvant Elicits Balanced, Robust Humoral and Cellular Immunity in BALB/c Mice / Y. Zheng, L. Bian, H. Zhao [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – Vol.11. – P. 526965.
443. Zhou, F. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID–19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study / F. Zhou, T. Yu, R. Du [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395(10229). – P. 1054 – 62.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)
Юридический адрес: 127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42
Фактический адрес: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, стр. 1,3, тел. 8 (499) 190-18-18, доб. 65-17, 64-16

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

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

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

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

Директор Центра экспертизы и контроля
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



В.П. Бондарев

В.П. Бондарев



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

ПАСПОРТ

ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (отраслевой)

**ИНТЕРФЕРОН альфа-2b ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ
(безметиониновая форма)**

ФСО.3.2.00456

СЕРИЯ:001-010923

1. НАЗНАЧЕНИЕ: фармакопейный стандартный образец (ФСО) предназначен для использования в качестве образца сравнения для оценки качества соответствующих субстанций методом пептидного картирования, а также для использования при воспроизведении физико-химических методик оценки качества соответствующих субстанций, аналогично образцу CRS (EDQM, кат. № 10320301).

2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА: "Принципиальное совпадение профилей пептидных карт испытуемого и стандартного образца с максимально допустимым расхождением времен удерживания характеристических пиков испытуемого и стандартного образцов не более 0,6 %".

3. ОПИСАНИЕ, ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ: ФСО представляет собой раствор (замороженный), разлитый по 2 мл во флаконы R2 из нейтрального стекла. В замороженном состоянии ФСО представляет собой плотную затвердевшую беловатого цвета массу, после размораживания - бесцветную, прозрачную, слегка опалесцирующую жидкость. Специфическая активность 4.47×10^8 МЕ/мл. Методом масс-спектрометрического анализа верифицирована на 100% аминокислотная последовательность и подтверждены дисульфидные связи в положениях C₁ - C₉₈ и C₂₉ - C₁₃₈.

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

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

6. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ: ФСО должен храниться в защищенном от света месте при температуре не выше минус 40 °С. После размораживания ФСО допустимо его хранение при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 дней. Повторное замораживание не допускается.

Транспортирование с использованием транспортных средств и оборудования, обеспечивающего соблюдение качества ФСО при температуре не выше минус 18 °С в течение 14 дней.

Стабильность значений аттестованной характеристики в течение срока годности ФСО гарантируется при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

7. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ: материал ФСО предназначен для лабораторных испытаний и не является лекарственным средством. При использовании ФСО применяйте меры безопасности, регламентированные в учреждении.

8. ДАТА ВЫПУСКА: 01.09.2023 г.

9. СРОК ГОДНОСТИ: 01.09.2025 г.

Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБГ
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



А.А. Мовсисянц



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

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

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

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ ИНТЕРФЕРОНА БЕТА-1b

ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)

СЕРИЯ: 001-150920

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

2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА: абсолютное время удерживания третьего (референсного) пика 42,0-43,2 мин, относительное время удерживания первого пика 0,61-0,66, второго пика 0,68-0,73, четвертого пика 1,04-1,06, пятого пика 1,14-1,15, шестого пика 1,22-1,24, седьмого пика 1,29-1,30.

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

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

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

6. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ: ФСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Транспортирование всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С.

Стабильность значений аттестованной характеристики в течение срока годности ФСО гарантируется при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

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

8. ДАТА ВЫПУСКА: 15.09.2020 г.

9. СРОК ГОДНОСТИ: 15.09.2022 г.

Директор Центра экспертизы и контроля МИБИ
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Месс

В.П.Бондарев

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.