

УДК 604:615.07

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-23-37>

Научная статья /Scientific article



Разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры очищенного рекомбинантного интерферона бета-1b методом пептидного картирования

Е.О. Голощапова^{1,✉}, О.Б. Рунова¹, А.С. Минеро¹, О.В. Фадейкина¹, Р.А. Волкова¹, М.Б. Дегтерев², С.А. Таран², Р.Р. Шукуров², О.Б. Устинникова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Голощапова Евгения Олеговна; goloshapova@expmed.ru

Резюме

Лекарственные препараты на основе рекомбинантных человеческих интерферонов (рЧИФН) бета-1a и бета-1b применяют в качестве препаратов первой линии при лечении рассеянного склероза. При этом рЧИФН бета-1a и бета-1b имеют структурные отличия, обусловленные использованием эукариотической или прокариотической системы экспрессии соответственно. Согласно международным фармакопейным требованиям необходима оценка подлинности первичной структуры рекомбинантного белка методом пептидного картирования, который предполагает использование стандартного образца сравнения. Международный стандартный образец рЧИФН бета-1b для оценки подлинности отсутствует. **Цель работы:** разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности очищенного рекомбинантного рЧИФН бета-1b методом пептидного картирования. **Материалы и методы:** рЧИФН бета-1b производства АО «ГЕНЕРИУМ»; эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8. Исследование проводили методом пептидного картирования с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) и метода масс-спектрометрии высокого разрешения. Результаты оценивали с применением статистических методов расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации. **Результаты:** разработан и аттестован стандартный образец Государственной фармакопеи Российской Федерации для подтверждения подлинности рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447). Аттестованная характеристика представлена в виде диапазонов времен удерживания характеристических пиков: абсолютное время удерживания третьего (референтного) пика составило 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. **Выводы:** разработаны требования к ФСО рЧИФН бета-1b, в качестве кандидата в стандартный образец выбран полупродукт рЧИФН бета-1b, отобранный на стадии до добавления человеческого сывороточного альбумина; проведен контроль качества в соответствии с разработанной спецификацией и проанализирована аминокислотная последовательность молекулы с подтверждением наличия дисульфидной связи; получена аттестованная характеристика ФСО; сравнительный анализ пептидных карт разработанного и аттестованного ФСО

рЧИФН бета-1b и стандартного образца (CRS) рЧИФН бета-1a показал различие данных пептидных карт и, следовательно, необходимость применения разработанного ФСО.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон бета-1b; подлинность; пептидное картирование; высокоэффективная жидкостная хроматография; масс-спектрометрия; фармакопейный стандартный образец (ФСО)

Для цитирования: Голощাপова Е.О., Рунова О.Б., Минеро А.С., Фадейкина О.В., Волкова Р.А., Дегтерев М.Б., Таран С.А., Шукуров Р.Р., Устинникова О.Б. Разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры очищенного рекомбинантного интерферона бета-1b методом пептидного картирования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):23–37. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-23-37>

Development and certification of a pharmacopoeial reference standard for primary structure identification of purified recombinant interferon beta-1b by peptide mapping

E.O. Goloshchapova¹✉, O.B. Rounova¹, A.S. Minero¹, O.V. Fadeikina¹, R.A. Volkova¹, M.B. Degterev², S.A. Taran², R.R. Shukurov², O.B. Ustinnikova¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² Generium JSC, 14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Evgenia O. Goloshchapova; goloshapova@expmed.ru

Abstract

Medicines based on recombinant human interferons (rhIFNs) beta-1a and beta-1b are used as first-line treatment of multiple sclerosis. Meanwhile, rhIFN beta-1a and beta-1b have structural differences associated with the eukaryotic or prokaryotic expression systems, respectively. Pharmacopoeias require identification of the primary structure of recombinant proteins by peptide mapping, which involves the use of reference material. Currently, there is no international reference standard available for rhIFN beta-1b structural identification. **The aim of the study** was development and certification of a pharmacopoeial reference standard for identification of the amino acid sequence of purified rhIFN beta-1b by peptide mapping. **Materials and methods:** rhIFN beta-1b produced by GENERIUM and endoproteinase Glu-C from *Staphylococcus aureus* V8 were used in the study. The peptide mapping was performed using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC) and high-resolution mass spectrometry. Statistical evaluation of the results included calculation of the arithmetic mean, standard deviation, and coefficient of variation. **Results:** the authors developed and certified a Russian Pharmacopoeia reference standard for structural identification of rhIFN beta-1b (PhRS 3.2.00447). The certified characteristic is the range of retention times of characteristic peaks: the absolute retention time was 42.0–43.2 for the third (reference) peak, the relative retention time was 0.61–0.66 for the first peak, 0.68–0.73 for the second peak, 1.04–1.06 for the fourth peak, 1.14–1.15 for the fifth peak, 1.22–1.24 for the sixth peak, and 1.29–1.30 for the seventh peak. **Conclusions:** the authors developed requirements for the rhIFN beta-1b pharmacopoeial reference standard. The material chosen as the candidate reference standard was an intermediate rhIFN beta-1b product sampled before addition of human serum albumin. The quality control was carried out in accordance with the developed specification. The authors analysed the amino acid sequence

of the molecule, confirmed the presence of the disulfide bond, and obtained the certified characteristic of the reference standard. Comparative analysis of the peptide maps of the certified rhIFN beta-1b pharmacopoeial reference standard and the rhIFN beta-1a reference standard revealed differences between the maps, and, therefore, confirmed the relevance of the developed reference standard.

Key words: recombinant interferon beta-1b; identification; peptide mapping; high performance liquid chromatography; mass spectrometry; pharmacopoeial reference standard (PhRS)

For citation: Goloshchapova E.O., Rounova O.B., Minero A.S., Fadeikina O.V., Volkova R.A., Degterev M.B., Taran S.A., Shukurov R.R., Ustinnikova O.B. Development and certification of a pharmacopoeial reference standard for primary structure identification of purified recombinant interferon beta-1b by peptide mapping. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):23–37. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-23-37>

Введение

Лекарственные препараты на основе рекомбинантных человеческих интерферонов (рЧИФН) бета-1а и бета-1b применяют в качестве препаратов первой линии при лечении рассеянного склероза. При этом рЧИФН бета-1а и бета-1b имеют существенные структурные отличия, обусловленные использованием эукариотической или прокариотической системы экспрессии соответственно [1, 2].

рЧИФН бета-1а представляет собой гликопротеин, идентичный по аминокислотной последовательности ИФН бета человека. В качестве продуцента рЧИФН бета-1а используют эукариотическую клеточную культуру яичника китайского хомячка СНО (Chinese hamster ovary). рЧИФН бета-1b представляет собой негликозилированный белок, в качестве продуцента которого используют бактериальную клеточную культуру *Escherichia coli*. Молекулы рЧИФН бета-1а и рЧИФН бета-1b состоят из 166 и 165 аминокислотных остатков соответственно, при этом в молекуле рЧИФН бета-1b отсутствует N-концевой метионин, а остаток цистеина в позиции 16 заменен на серин [1].

Указанные структурные особенности вариантов интерферона бета человека при сохранении общих биологических свойств лежат в основе их различий по удельной активности, характеру побочных действий, способности к индукции нейтрализующих антител (иммуногенности), схемам и способам введения лекарственных препаратов на основе терапевтических белков рЧИФН бета-1а и рЧИФН бета-1b [3].

В литературе встречаются сведения о клинических исследованиях, позволяющих сделать вывод о возможности замены препаратов рЧИФН бета-1а на рЧИФН бета-1b, однако такую воз-

можность не следует рассматривать как полную взаимозаменяемость данных подтипов интерферонов. Выбор гликозилированной или негликозилированной формы в каждом конкретном случае зависит от множества факторов, в том числе от индивидуальных особенностей пациента [4–7].

Одним из наиболее значимых этапов подтверждения качества рЧИФН бета является оценка подлинности его структуры с помощью комплекса методов, важнейшим из которых является пептидное картирование (ВЭЖХ). Данный метод предполагает использование стандартного образца сравнения.

Методика пептидного картирования, изложенная в монографии 01/2009:1639 Европейской фармакопеи, а также стандартный образец CRS (Chemical Reference Substance) предназначены для рЧИФН бета-1а. При этом методика предусматривает использование эндопротеазы LysC с рабочей областью около pH 9,0, что неприемлемо для рЧИФН бета-1b, поскольку данный белок нестабилен в нейтральной и щелочной среде. Монография в Европейской фармакопее и соответствующий стандартный образец рЧИФН бета-1b для подтверждения подлинности первичной структуры отсутствуют. Ранее нами была разработана методика пептидного картирования для рЧИФН бета-1b, учитывающая стабильность белка при кислых значениях pH [8, 9].

Цель работы – разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца (ФСО) для подтверждения подлинности аминокислотной последовательности очищенного рЧИФН бета-1b методом пептидного картирования. Задачи исследования: разработать требования к кандидату в ФСО для подтверждения подлинности структуры рЧИФН бета-1b и процедуре его аттестации; осуществить выбор кандидата в ФСО; разработать спецификацию и оценить

качество кандидата в стандартный образец; установить аттестованную характеристику ФСО; провести сравнительный анализ пептидных карт аттестованного ФСО рЧИФН бета-1b и CRS рЧИФН бета-1a.

Материалы и методы

Материалы:

- исследуемый образец – кандидат в ФСО рЧИФН бета-1b производства АО «ГЕНЕРИУМ»;
- стандарт рЧИФН бета-1a (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), CRS, кат. № Y0001101, серия 3);
- эндопротеиназа Glu-C (*Staphylococcus aureus* V8 proteinase, Sigma-Aldrich, кат. № P2922; 500–1000 U/mg);
- гуанидина гидрохлорид (Sigma-Aldrich);
- дитиотреитол (Sigma-Aldrich);
- уксусная кислота (Sigma-Aldrich);
- ацетат натрия (Sigma-Aldrich);
- центрифужные фильтры Amicon Ultra (Merck Millipore, кат. № UFC501024, объем 0,5 мл, Ultracel-10K);
- ферменты для мультиферментного протеолиза при определении аминокислотной последовательности кандидата в ФСО: протеаза Asp-N (Promega, кат. № VA1160), пепсин (Promega, кат. № V1959), протеаза Glu-C (Promega, кат. № V1651), протеаза Lys-C (Promega, кат. № VA1050), иммобилизованный трипсин (Thermo Fisher Scientific, кат. № 60109-101-B).

Оборудование:

жидкостные хроматографы Agilent Technologies Infinity 1260 (Agilent Technologies, США); Waters Alliance e2695 (Waters, США); Waters Acquity (Waters, США); Shimadzu Nexera X2 (Shimadzu Corporation, Япония).

Методы

Метод пептидного картирования с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ).

Растворы:

- ацетатный буферный раствор (рН 4,50–4,57);
- подвижная фаза А: доводят 1 мл трифторуксусной кислоты до 1000 мл водой;
- подвижная фаза В: к 1 мл трифторуксусной кислоты прибавляют воду до 100 мл и доводят объем до 1000 мл ацетонитрилом.

Процедура.

Кандидат в ФСО растворяли в воде для получения раствора с концентрацией около 0,6 мг/мл. Далее проводили гидролиз: 50 мкл кандидата в ФСО помещали в пробирку, добавляли 3 мкл раствора эндопротеиназы Glu-C и 20 мкл ацетатного буферного раствора, перемешивали и помещали в термостат при температуре 37 °С. Через 18 ч добавляли 0,2 мл 6 М раствора гуанидина гидрохлорида, перемешивали и прибавляли 0,007 мл 2 М раствора дитиотреитола. Перемешивали и помещали пробирку в термостат при температуре 100 °С на 1 минуту и затем охлаждали до температуры 2–8 °С. Образцы, полученные в результате гидролиза, использовали при проведении хроматографического разделения.

Условия хроматографического разделения: скорость потока – 1 мл/мин; температура колонки – 30±1 °С; детектор – УФ-детектор, длина волны 214 нм; объем пробы – 100 мкл.

Хроматографирование проводили с использованием хроматографической колонки YMC-Pack ODS-A (100×4,6 мм, октадецилсилил (C18) модифицированный силикагель с диаметром частиц 5 мкм, размер пор 300 Å, YMC, Япония) при температуре 30 °С с применением спектрофотометрического детектора (длина волны 214 нм) и градиентного режима с использованием двух подвижных фаз: подвижная фаза 1: 0,1% трифторуксусная кислота в воде; подвижная фаза 2: 0,1% трифторуксусная кислота в смеси ацетонитрил–вода, 9:1 при скорости потока 1 мл/мин [8] с применением хроматографов Agilent Technologies Infinity 1260, Waters Alliance e2695, Shimadzu Nexera X2 и Waters Acquity.

Метод масс-спектрометрии высокого разрешения для анализа первичной структуры ФСО. Анализ первичной структуры молекулы

Таблица 1. Программа градиента
Table 1. Gradient programme

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза А, %, об./об. <i>Mobile phase A, %, v/v</i>	Подвижная фаза В, %, об./об. <i>Mobile phase B, %, v/v</i>
0→8	100	0
8→68	100→40	0→60
68→72	40	60
72→75	40→100	60→0
75→80	100	0

рЧИФН бета-1b с проведением параллельного гидролиза целевого белка пятью протеазами с различной специфичностью и последующим хроматомасс-спектрометрическим анализом полученных гидролизатов осуществляли в системе ВЭЖХ Infinity 1260 Capillary LC System (Agilent Technologies, США) с масс-спектрометрическим детектором QTOF 6550 (Agilent Technologies, США).

Ферментативный гидролиз белка рЧИФН бета-1b для анализа первичной структуры проводили в следующих условиях:

- Пепсин. К раствору, содержащему 50 мкг белка, добавляли 2,5 мкл 1 н раствора HCl и 1 мкл раствора пепсина (1,0 мг/мл). Инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 ч. Реакцию останавливали нагревом смеси до 95 °С в течение 10 мин.
- Имобилизованный трипсин. К 150 мкл коммерческого реакционного буфера из состава набора SMART Digest Kit прибавляли 15 мкл суспензии имобилизованного трипсина и 50 мкл раствора белка (1,0 мг/мл). Инкубировали при температуре 70 °С и интенсивном встряхивании (1400 об/мин) в течение 1 ч. Реакцию останавливали охлаждением образца до комнатной температуры; образец центрифугировали (12 000 г, 15 мин) и отбирали супернатант для анализа.
- Asp-N. К раствору, содержащему 25 мкг белка, добавляли 2,1 мкл 6 М раствора гуанидин-гидрохлорида, 0,5 мкг Asp-N (0,2 мг/мл) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 ч.
- Эндопроотеиназа Glu-C. К раствору, содержащему 25 мкг белка, добавляли 0,7 мкл 6 М раствора гуанидин-гидрохлорида, 0,5 мкг Glu-C (0,4 мг/мл) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 ч.
- Эндопроотеиназа Lys-C. К 25 мкл раствора белка (2,0 мг/мл) прибавляли 40 мкл раствора AccuMAP Denaturing Solution (Promega), 12 мкл буфера (AccuMAP 10X Low pH Reaction Buffer, Promega), 15 мкл воды и 25 мкл раствора Lys-C. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего добавляли 20 мкл буфера (AccuMAP 10X Low pH Reaction Buffer), 155 мкл воды и 25 мкл раствора Lys-C. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 3 ч. Реакцию останавливали добавлением 6,4 мкл трифторуксусной кислоты.

Разделение пептидов проходило в нанопотоковом режиме на устройстве ProtID-Chip-43 (Agilent Technologies, США) с использованием следующих фаз: фаза А – 0,1% муравьиная кислота в 50 мМ формиате аммония; фаза Б – смесь фазы А с ацетонитрилом, 1:9; элю-

ирование пептидов проводили в режиме линейного градиента (1–48% фазы Б за 52 мин); регистрацию сигналов – в режиме положительной ионизации и дата-зависимого тандемного сканирования. Для анализа результатов использовали программное обеспечение Peaks AB v.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc.) со следующими условиями: максимальное значение допуска на расхождение между теоретической и экспериментальной массой пептида – 12 ppm для масс-спектров в режиме фронтального сканирования и 0,02 Да для масс-спектров в режиме тандемного сканирования. При соотношении регистрируемых масс пептидов с теоретическими значениями учитывались химические (аддукты с ионами натрия, формилирование, отщепление аммония или воды) и посттрансляционные (отщепление N-концевого метионина, окисление остатков метионина, триптофана и гистидина, дезамидирование остатков аспарагина или глутамина) модификации.

Для подтверждения первичной структуры белка использовали следующую аминокислотную последовательность рЧИФН бета-1b: MS YNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRM NFDIPEEIKLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQD SSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEK EDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAW TIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN.

Метод масс-спектрометрии высокого разрешения для анализа аминокислотной последовательности пептидов, получаемых в результате пептидного картирования ФСО. Анализ проводили с хроматомасс-спектрометрической идентификацией целевых пептидных фрагментов в каждой фракции элюата в системе ВЭЖХ Nexera X2 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором Q Exactive HF Biopharma (Thermo Scientific). В качестве образцов использовали 8 фракций объемом 100–200 мкл, полученных в результате гидролиза и последующего хроматографического разделения кандидата в ФСО. Состав фракции: 0,5–1 мкг пептида в подвижной фазе. Условия гидролиза и хроматографического разделения ФСО описаны выше. Разделение пептидов проходило на колонке Acquity UPLC® Peptide CSH C18 (2,1×100 мм, Waters, США) использованием подвижных фаз: фаза А – 0,1% муравьиная кислота в воде; фаза Б – 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле; элюирование проводили в режиме линейного градиента (3–40% фазы Б за 6,5 мин), регистрацию сигналов – в режиме положительной ионизации и дата-зависимого тандемного сканирования. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение Biopharma Finder v.3.2 (Thermo

Scientific) и Peaks AB v.2.0 (Bioinformatics Solutions Inc.). При соотнесении регистрируемых масс пептидов с теоретическими значениями учитывались химические (аддукты с ионами натрия, формилирование, отщепление аммония или воды) и посттрансляционные (неотщепление N-концевого метионина, окисление остатков метионина, триптофана и гистидина, дезамидирование остатков аспарагина или глутамина) модификации.

Статистическая обработка результатов.

Для оценки результатов использовали статистические методы анализа с вычислением среднего арифметического X_{cp} по формуле (1) и среднеквадратичного отклонения S по формуле (2):

$$X_{cp} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad (1)$$

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

Результаты и обсуждение

На основании теоретического анализа предполагаемых условий применения были разработаны требования к кандидату ФСО для подтверждения подлинности структуры рЧИФН бета-1b:

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

Разработаны требования к процедуре аттестации:

- наличие методики пептидного картирования, обладающей достаточной специфичностью для выявления значимых структурных отличий молекулы рЧИФН бета-1b;
- анализ аминокислотной последовательности основных пептидов с оценкой покрытия теоретической последовательности молекулы рЧИФН бета-1b;
- установление диапазонов времен удерживания основных (характеристических) пиков на основании результатов, полученных в условиях воспроизводимости.

В качестве материала для получения кандидата в ФСО был выбран полупродукт рЧИФН бета-1b производства АО «ГЕНЕРИУМ», отобранный на финальной стадии очистки белка до добавления стабилизатора – человеческого

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

В качестве основы для оценки качества кандидата в ФСО была использована нормативная документация на Интерферон бета-1b субстанцию-раствор (замороженный) ФС 001677-290818, при этом номенклатура показателей спецификации и нормы были частично изменены: норма по показателю «Описание» – в связи с заменой замороженной формы на лиофилизированную; норма по показателю «pH» – в связи с изменением диапазона; исключен показатель «Аномальная токсичность»; показатель «Стерильность» заменен на показатель «Микробиологическая чистота», поскольку кандидат в ФСО не является препаратом для введения людям; исключены показатели «Общий белок» и «Вирусная безопасность» в связи с отсутствием ЧСА. Кандидату в ФСО было присвоено наименование «Лиофилизат интерферона бета-1b без добавок белковой природы»; разработана Спецификация № ОКК-СПЦ-710-01, включающая оценку 18 показателей, и оценено соответствие кандидата в ФСО по данной спецификации, в частности по показателям:

- хроматографической чистоты (количество олигомеров и фрагментов молекул составило 1% при норме не более 5%);
- родственных примесей (количество дезамидированных форм составило 6% при норме не более 8%);
- специфической активности рЧИФН бета-1b

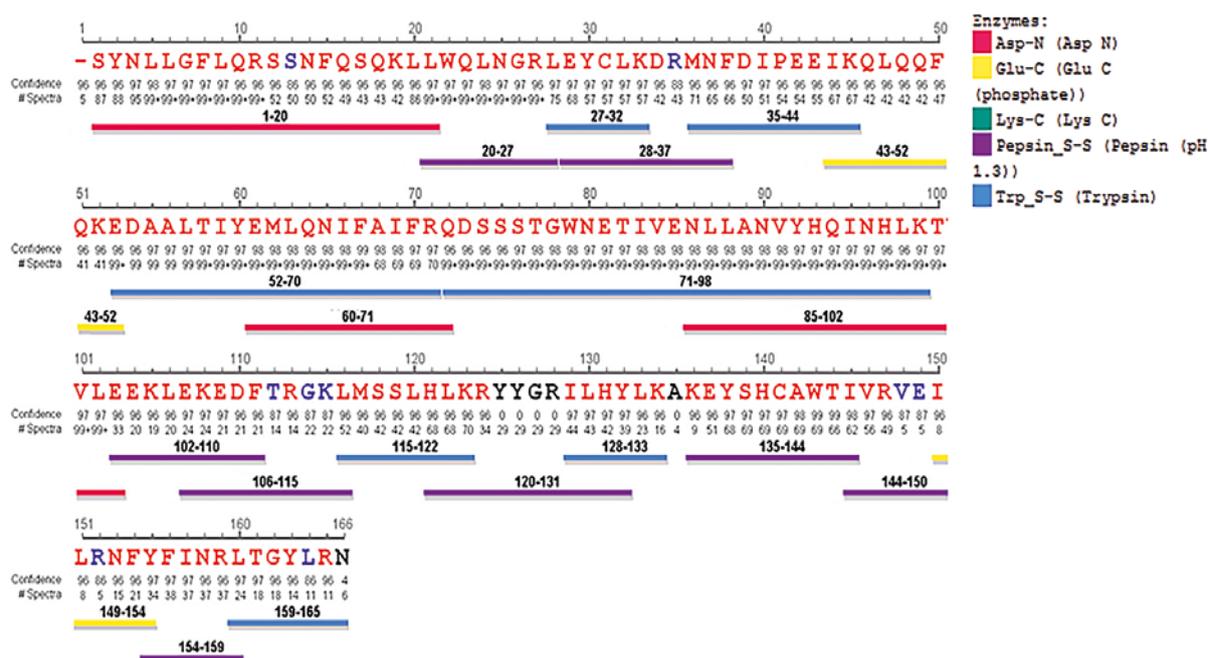


Рис. 1. Ключевые характеристические пептиды аминокислотной последовательности кандидата в фармакопейный стандартный образец интерферона бета-1b, идентифицированные по результатам хроматомасс-спектрометрического анализа продуктов гидролиза белка протеазами с различной специфичностью. В легенде сверху расположение цветных отрезков соответствует положению пептидов в аминокислотной цепи. В легенде справа цветами обозначены примененные протеазы (Asp-N, Glu-C, Arg-C, Lys-C, пепсин, трипсин).

Fig. 1. Key characteristic peptides of the amino acid sequence of the candidate interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard, identified by chromato-mass spectrometric analysis of protein hydrolysis products by proteases with different specificity. In the legend above, the location of the coloured segments corresponds to the position of the peptides in the amino acid chain. In the legend on the right, the proteases used (Asp-N, Glu-C, Arg-C, Lys-C, pepsin, trypsin) are marked with colours.

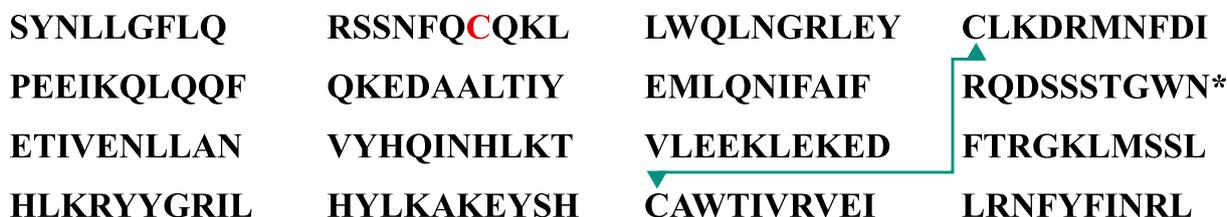


Рис. 2. Аминокислотная последовательность интерферона бета-1b. Стрелкой отмечена дисульфидная связь (Cys30–Cys140).

Fig. 2. Amino acid sequence of interferon beta-1b. The disulfide bond (Cys30–Cys140) is indicated by the arrow.

(8,2 млн МЕ/мл при норме не менее 4 млн МЕ/мл);
 – количества рЧИФН бета-1b (0,24 мг/мл при норме от 0,22 до 0,28 мг/мл);
 – количества остаточных белков штамма-производителя и количество остаточной ДНК штамма-производителя (3,1 нг/мг ИФН бета-1b и 1,78 пг/мг рЧИФН бета-1b соответственно).
 Также была проведена оценка первичной структуры молекулы с применением мультферментного протеолиза целевого белка с последующим хроматомасс-спектрометрическим анализом полученных гидролизатов.
 Оценка показала полное совпадение ожидаемой аминокислотной последовательности кан-

дидата в ФСО с известной последовательностью рЧИФН бета-1b (рис. 1 и 2) [1]. Суммарная доля идентифицированной части аминокислотной последовательности составила 100%. Было подтверждено наличие дисульфидной связи между цистеинами, находящимися в положениях 30 и 140 (рис. 3).
 Далее для аттестации ФСО рЧИФН бета-1b применяли методику пептидного картирования, разработанную на предыдущем этапе работы [8]. Анализ профилей пептидных карт кандидата в ФСО, полученных в процессе валидации вышеуказанной методики, позволил выбрать 7 характеристических пиков, отличающихся достаточной интенсивностью и стабильным

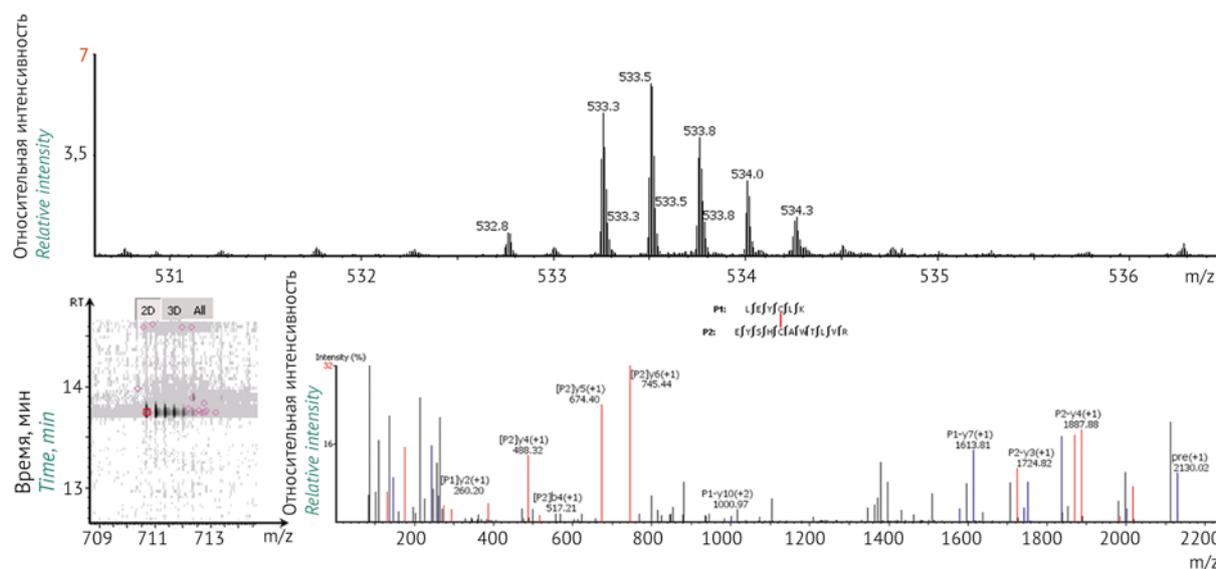


Рис. 3. Хроматомасс-спектрометрические свойства пептида аминокислотной последовательности ИФН бета-1b (положения 27–32 – 136–146), содержащего в своем составе дисульфидную связь между цистеинами, находящимися в положениях 30 и 140. Сверху – масс-спектр четырехзарядного иона пептида; слева внизу – двумерная масс-хроматограмма трехзарядного иона пептида; справа внизу – его тандемный масс-спектр.

Fig. 3. Chromatomass spectrometric properties of the disulfide-containing peptide from positions 27–32 to 136–146 with bond location Cys30–Cys140. Top—mass spectrum of a four-charged peptide ion; bottom left—two-dimensional mass chromatogram of a triple-charged peptide ion; bottom right—its tandem mass spectrum.

временем удерживания. Пик под номером 3 как наиболее стабильный был выбран в качестве основного пика с абсолютным временем удерживания около 42,5 минуты, остальные 6 пиков – характеристическими пиками с относительными временами удерживания (рис. 4).

На основании двадцати результатов, полученных в условиях воспроизводимости в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 (работу выполнили четыре специалиста в двух лабораториях с использованием четырех хроматографов), были рассчитаны диапазоны абсолютного и относительных времен удерживания характеристических пиков (табл. 2), представляющих собой аттестованную характеристику ФСО, и разработана сопроводительная документация – паспорт и инструкция по применению ФСО 3.2.00447.

Диапазон абсолютного времени удерживания пика 3 рассчитывали как среднее значение времени удерживания $X_{cp3} \pm 3S$, где S – среднеквадратичное отклонение при $n = 20$. Диапазон относительных времен удерживания пиков 1, 2, 4, 5, 6, 7 рассчитывали как средние значения времен удерживания $X_{cp1(2,4,5,6,7)} \pm 2S$, где S – среднеквадратичное отклонение при $n = 20$ [10].

Для подтверждения, что пептиды, соответствующие выбранному характеристическим пикам, содержат наиболее значимые

фрагменты молекулы рЧИФН бета-1b, было проведено исследование их аминокислотной последовательности. Для этого был проведен препаративный отбор фракций соответствующих пиков и их последующее исследование методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения (табл. 3) [11–13].

В результате исследования было выявлено, что суммарно данные пептиды составляют 77% аминокислотной последовательности ФСО рЧИФН бета-1b. При этом наиболее информативным для оценки структуры рЧИФН бета-1b является пик № 6, поскольку именно данный пептид содержит серин вместо цистеина в позиции 16 и не содержит N-концевой метионин, что является основным структурным отличием белковой части молекулы рЧИФН бета-1b от рЧИФН бета-1a.

В ходе работы также проведен сравнительный анализ пептидных карт ФСО (рЧИФН бета-1b) и CRS (рЧИФН бета-1a) (рис. 5 и 6, табл. 4).

Времена удерживания характеристических пиков ФСО рЧИФН бета-1b в целом совпадают с временами удерживания характеристических пиков стандартного образца рЧИФН бета-1a (стандарта CRS). Исключение составляет пик 6, содержащий N-концевой фрагмент молекулы (с 1-го по 42-й аминокислотный остаток) и характеризующийся наличием метионина для стан-

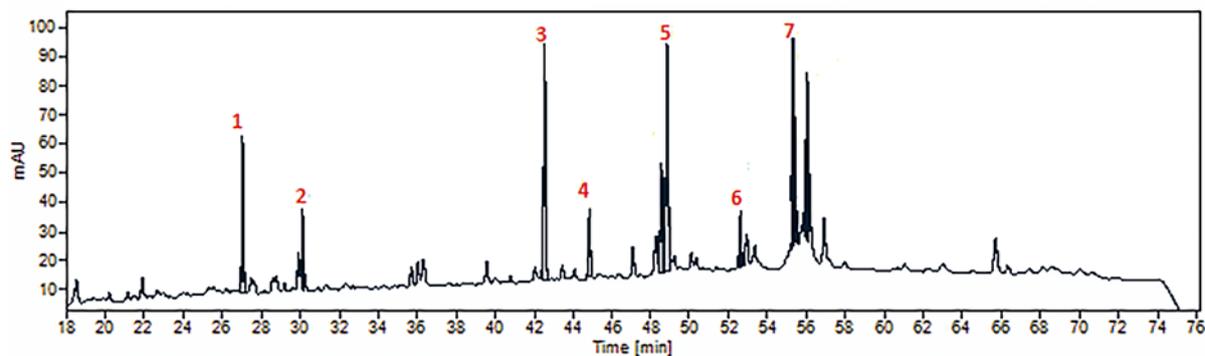


Рис. 4. Типичная пептидная карта кандидата в фармакопейный стандартный образец интерферона бета-1b. Ось X – время, мин; ось Y – оптическая плотность.

Fig. 4. A typical peptide map of the candidate material for interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard. X axis–time, min; Y axis–optical density.

дарту CRS и его отсутствием для ФСО, а также заменой аминокислоты в 16 (17) позиции, что подтверждается данными масс-спектрометрического анализа (табл. 2). Также наблюдается отличие профилей пептидных карт в диапазоне 54,5–58,0 мин. При этом на хроматограмме рЧИФН бета-1а наблюдается значительное количество негидролизованного белка (кластерные пики в диапазоне 64–69 мин), что предположительно может быть результатом более слабого гидролиза молекулы стандарта CRS, вызванного присутствием гликанов.

Сравнительный анализ хроматограмм рЧИФН бета-1а (стандарта CRS) и рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447), полученных в условиях пептидного картирования (пригодных для менее стабильного белка – рЧИФН бета-1b), а также результаты масс-спектрометрического анализа пептидов подтвердили необходимость использования ФСО рЧИФН бета-1b в качестве образца сравнения, так как пептидные карты данных белков различаются.

Выводы

Разработаны требования к ФСО рЧИФН бета-1b, а именно:

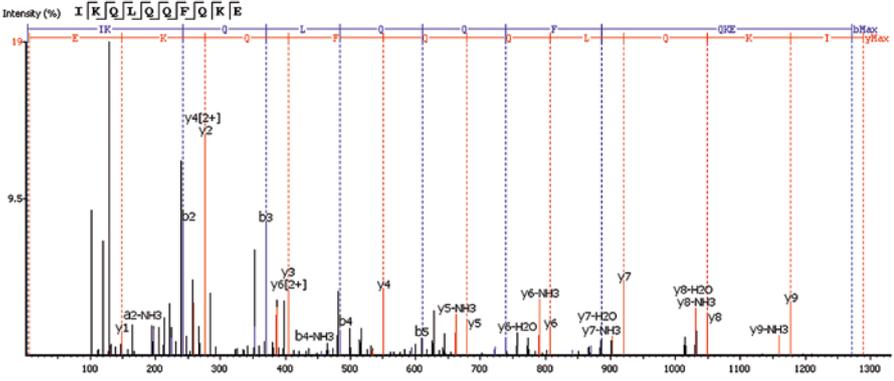
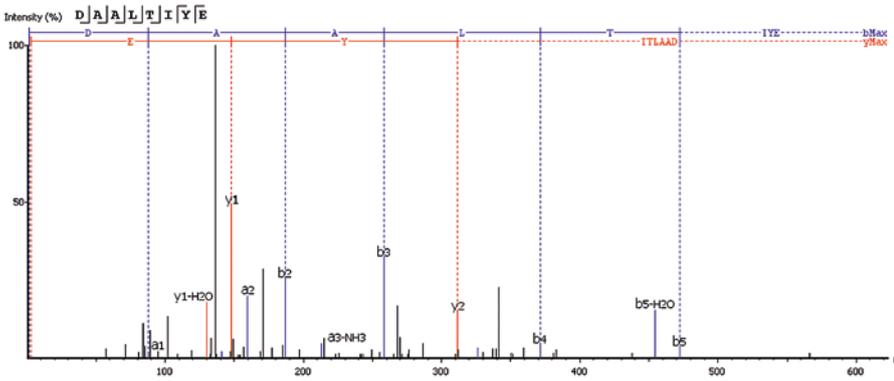
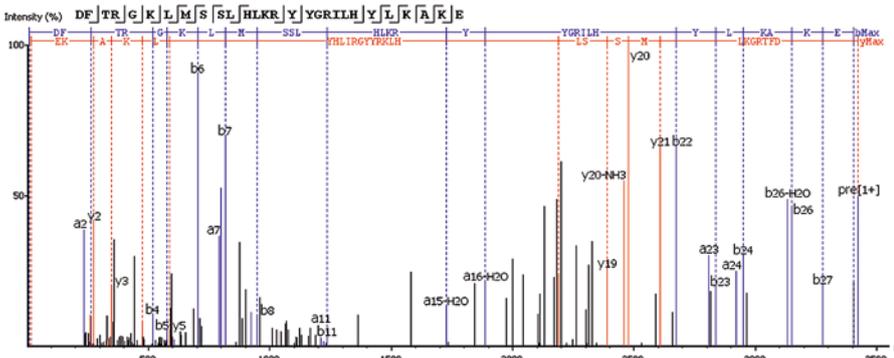
- отсутствие вспомогательных веществ белковой или иной природы, потенциально влияющих на профиль пептидной карты;
- стабильность раствора стандартного образца;
- соответствие требованиям спецификации на субстанцию за исключением показателей, изменяемых направленно (например, формы выпуска, pH и т. д.).

Показано соответствие аминокислотной последовательности молекулы рЧИФН бета-1b теоретическим данным (более 95%). В качестве кандидата в ФСО рЧИФН бета-1b выбран полупродукт рЧИФН бета-1b, отобранный на финальной стадии очистки до добавления ЧСА, проведен контроль качества в соответствии с разработанной спецификацией и проанализирована аминокислотная последовательность молекулы с подтверждением наличия дисульфидной связи.

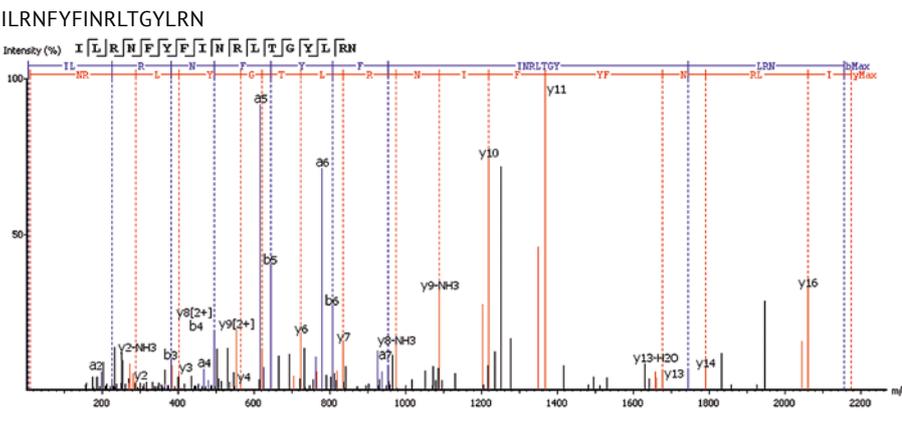
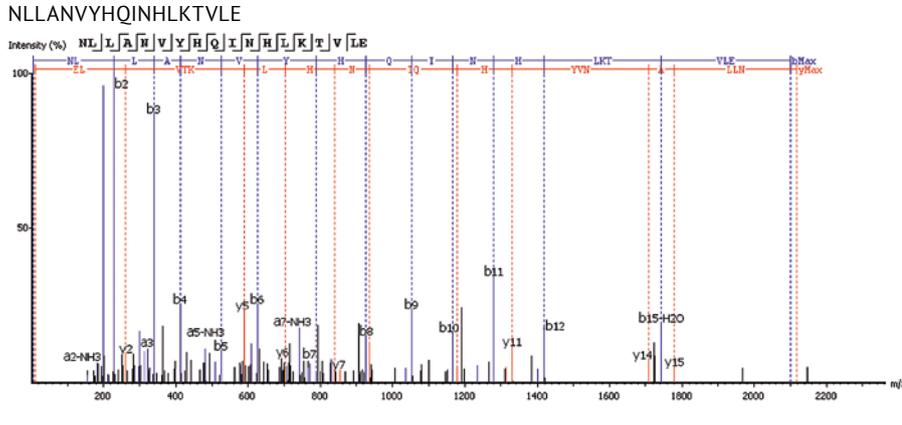
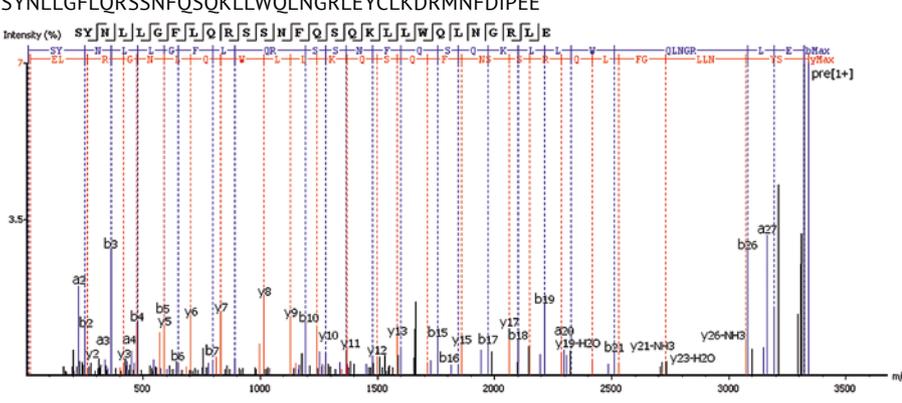
Таблица 2. Аттестованная характеристика фармакопейного стандартного образца интерферона бета-1b
Table 2. Certified characteristic of interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard

Пик <i>Peak</i>	Абсолютное время удерживания, мин <i>Absolute retention time, min</i>	Относительное время удерживания, диапазон <i>Relative retention time, range</i>
1	–	0,61–0,66
2	–	0,67–0,73
3	42,0–43,2	–
4	–	1,04–1,06
5	–	1,14–1,15
6	–	1,22–1,24
7	–	1,29–1,30

Таблица 3. Результаты исследования аминокислотной последовательности пептидов интерферона бета-1b, соответствующих характеристическим пикам, методом масс-спектрометрии
Table 3. Results of mass spectrometric analysis of the amino acid sequences of interferon beta-1b peptides corresponding to the characteristic peaks

Пептид <i>Peptide</i>	Положение в цепи <i>Location in the chain</i>	Измеренная мономерная молекулярная масса. Да <i>Measured monoisotopic molecular weight, Da</i>	Тандемный масс-спектр <i>Tandem mass spectrum</i>
1	43–52	1288,71	<p style="text-align: center;">IKQLQQFQKE</p> 
2	53–60	894,43	<p style="text-align: center;">DAALTYE</p> 
3	109–136	3422,88	<p style="text-align: center;">DFTRGLMSSLHLKRYGRILHLYLKAKE</p> 

Продолжение таблицы 3
 Table 3 (continued)

Пептид <i>Peptide</i>	Положение в цепи <i>Location in the chain</i>	Измеренная мономерная масса, Да <i>Measured monoisotopic molecular weight, Da</i>	Тандемный масс-спектр <i>Tandem mass spectrum</i>
4	149–165	2172,20	<p>ILRNFYFINRLTGYLNR</p> 
5	85–102	2118,16	<p>NLLANVYHQINHLKTVLE</p> 
6	1–42	5092,53	<p>SYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEE</p> 

Пептид <i>Peptide</i>	Положение в цепи <i>Location in the chain</i>	Измеренная мономерная молекулярная масса, Да <i>Measured monoisotopic molecular weight, Da</i>	Тандемный масс-спектр <i>Tandem mass spectrum</i>
7	81–102	2560,40	<p>TIVENLLANVYHQINHLKTVLE</p>

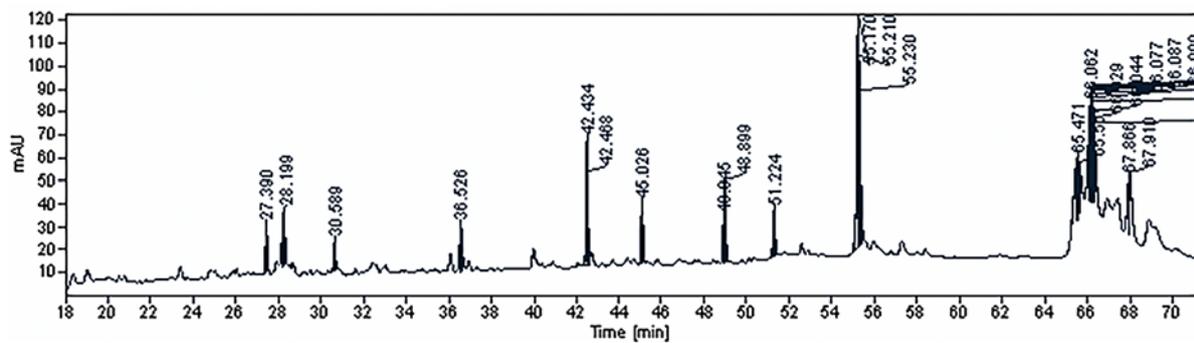


Рис. 5. Пептидная карта интерферона бета-1а CRS. Ось X – время, мин; ось Y – оптическая плотность.

Fig. 5. Peptide map of the interferon beta-1a CRS. X axis–time, min; Y axis–optical density.

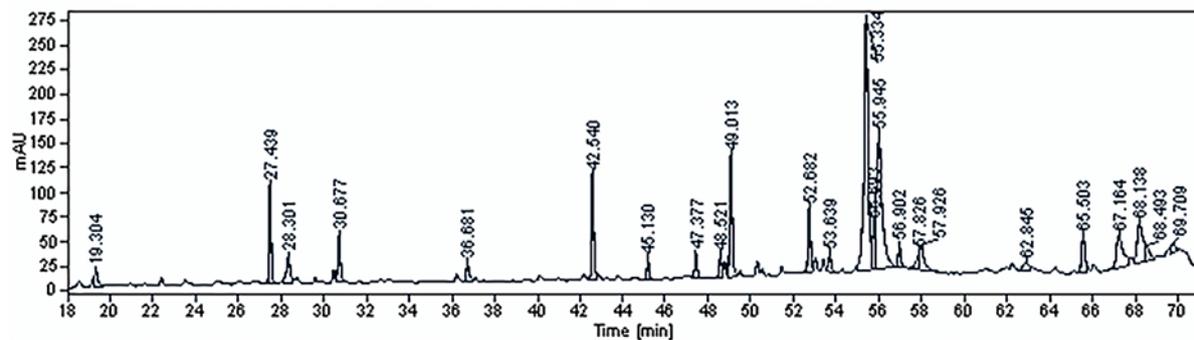


Рис. 6. Пептидная карта фармакопейного стандартного образца интерферона бета-1b. Ось X – время, мин; ось Y – оптическая плотность.

Fig. 6. Peptide map of the interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard. X axis–time, min; Y axis–optical density.

Таблица 4. Времена удерживания характеристических пиков фармакопейного стандартного образца бета-1b и интерферона бета-1a CRS

Table 4. Characteristic peak retention times of the interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard and interferon beta-1a CRS

Пик <i>Peak</i>	Время удерживания характеристических пиков, мин <i>Peak retention time, min</i>	
	интерферон бета-1a CRS <i>interferon beta-1a CRS</i>	фармакопейный стандартный образец интерферона бета-1b <i>interferon beta-1b pharmacopoeial reference standard</i>
1	27,390	27,439
2	30,589	30,677
3	42,434	42,540
4	45,026	45,130
5	48,899	49,013
6	51,224	52,682
7	55,170	55,334

Установлена аттестованная характеристика ФСО рЧИФН бета-1b в виде диапазонов абсолютного и относительных времен удерживания характеристических пиков: абсолютное время удерживания третьего пика составило 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.

Сравнительный анализ пептидных карт разработанного ФСО рЧИФН бета-1b и CRS рЧИФН бета-1a показал различие данных пептидных карт и, следовательно, необходимость применения разработанного ФСО.

Литература/References

1. Бобрускин АИ, Кононова НВ, Мартянов ВА, Шустер АМ. Промышленный способ получения и очистки рекомбинантного интерферона бета-1b человека из телец включения. Патент Российской Федерации № 2473696; 2013. [Bobruskin AI, Kononova NV, Martianov VA, Shuster AM. Industrial method for production and purification of recombinant human interferon beta-1b from inclusion bodies. Patent of the Russian Federation No. 2473696; 2013 (In Russ.)]
2. Orru S, Amoresano A, Siciliano R, Napoleoni R, Finocchiaro O, Datola A, et al. Structural analysis of modified forms of recombinant IFN-beta produced under stress-simulating conditions. *Biol Chem.* 2000;381(1):7–17. <https://doi.org/10.1515/BC.2000.002>
3. Runkel L, Meier W, Pepinsky R, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res.* 1998;15(4):641–9. <https://doi.org/10.1023/a:1011974512425>
4. Hahn N, Pharm D, Palmer K, Delate T. Therapeutic interferon interchange in relapsing multiple sclerosis lowers health care and pharmacy expenditures with comparable safety. *Perm J.* 2018;22:18–46. <https://doi.org/10.7812/TPP/18-046>
5. Alenda R, Costa-Frossard L, Alvarez-Lafuente R, Espejo C, Rodriguez-Martin E, de la Maza SS, et al. Blood lymphocyte subsets identify optimal responders to IFN-beta in MS. *J Neurol.* 2018;265(1):24–31. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8625-6>
6. Попова ЕВ, Бойко АН, Быкова ОВ, Нанкина ИГ, Батышева ТТ. Опыт применения российского биоаналога интерферона бета-1b в лечении детского рассеянного склероза. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2016;6:73–5. [Popova EV, Boyko AN, Bykova OV, Nankina IG, Batysheva TT. Experience of application of Russian biosimilar of interferon beta-1b for treatment of pediatric multiple sclerosis. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2016;6:73–5 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17116/jnevro20161166173-75>
7. Hyun JW, Kim G, Kim Y, Kong B, Joung A, Park NY, et al. Neutralizing antibodies against interferon-beta in Korean patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurol.* 2018;14(2):186–90. <https://doi.org/10.3988/jcn.2018.14.2.186>
8. Голощапова ЕО, Минеро АС, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Разработка методики пептидного картирования для оценки подлинности рекомбинантного интерферона бета-1b. *Биофармацевтический журнал.* 2021;13(1):22–7. [Goloshchapova EO,

- Minero AS, Runova OB, Ustinnikova OB. Development of a peptide mapping technique to evaluate the authenticity of recombinant interferon beta-1b. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2021;13(1):22–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-1-21-26>
9. Голощачова ЕО, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Рекомбинантные интерфероны бета-1а и бета-1b: особенности структуры белка и проблемные вопросы подтверждения ее подлинности. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(8):61–4. [Goloshchapova EO, Runova OB, Ustinnikova OB. Recombinant interferons beta-1a and beta-1b: protein structure features and problematic issues of identity confirmation. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(8):61–4 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-8-61-64>
 10. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):44–50 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>
 11. Zhang Z, Pan H, Chen X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(1):147–76. <https://doi.org/10.1002/mas.20190>
 12. Tian Y, Ruotolo B. The growing role of structural mass spectrometry in the discovery and development of therapeutic antibodies. *Analyst*. 2018;143(11):2459–68. <https://doi.org/10.1039/c8an00295a>
 13. Hada V, Bagdi A, Bihari Z, Timari SB, Fizil A, Szantay C Jr. Recent advancements, challenges, and practical considerations in the mass spectrometry-based analytics of protein biotherapeutics: A viewpoint from the biosimilar industry. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;161:214–38. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.024>

Вклад авторов. **Е.О. Голощачова** – формирование задач исследования, выполнение экспериментальных работ и статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, формирование документации на стандартные образцы, написание текста рукописи; **О.Б. Рунова** – обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **А.С. Минеро** – выполнение экспериментальных работ, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **О.В. Фадейкина** – проверка документации на стандартные образцы; **Р.А. Волкова** – обсуждение результатов исследования, проверка и согласование документации на стандартные образцы, редактирование рукописи; **М.Б. Дегтерев** – хроматомасс-спектрометрические исследования, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **С.А. Таран** – выполнение экспериментальных работ, обсуждение результатов исследования, редактирование документации на стандартные образцы, редактирование рукописи; **Р.Р. Шукуров** – обсуждение результатов исследования, проверка и согласование документации на стандартные образцы, редактирование рукописи; **О.Б. Устинникова** – идея и дизайн исследования, планирование и обсуждение результатов исследования, обсуждение и проверка документации на стандартные образцы, редактирование и дополнение текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. **E.O. Goloshchapova**—elaboration of research tasks, carrying out experimental work, statistical processing of the data, discussion of the results, preparation of the reference material documentation, writing of the text; **O.B. Rounova**—discussion of the study results, editing of the text; **A.S. Minero**—performing experimental work, discussion of the study results, editing of the text; **O.V. Fadeikina**—review of the reference material documentation; **R.A. Volkova**—discussion of the study results, review and approval of the reference material documentation, editing of the text; **M.B. Degterev**—performing chromatomass spectrometric studies, discussion of the study results, editing of the text; **S.A. Taran**—performing experimental work, discussion of the study results, editing of the reference material documentation, editing of the text; **R.R. Shukurov**—discussion of the study results, review and approval of the reference material documentation, editing of the text; **O.B. Ustinnikova**—elaboration of the idea and design of the study, planning and discussion of the results of the study, discussion and review of the reference material documentation, editing of the text of the paper and supplementing it with necessary information. **Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4). **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Голощачова Евгения Олеговна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6611-0101>
Goloshapova@expmed.ru

Рунова Ольга Борисовна, канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
Runova@expmed.ru

Минеро Анастасия Сальвадоровна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>
minero@expmed.ru

Фадеекина Ольга Васильевна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
Fadeikina@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Volkova@expmed.ru

Дегтерев Максим Борисович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>
degterev@ibcgenerium.ru

Таран Сергей Анатольевич, канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5875-6933>
taran@ibcgenerium.ru

Шукуров Рахим Рахманкулович, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
shukurov@ibcgenerium.ru

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
Ustinnikova@expmed.ru

Поступила 09.09.2021

После доработки 02.02.2022

Принята к публикации 11.03.2022

Eugenia O. Goloshchapova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6611-0101>
Goloshapova@expmed.ru

Olga B. Rounova, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
Runova@expmed.ru

Anastasia S. Minero. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>
minero@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
Fadeikina@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Volkova@expmed.ru

Maksim B. Degterev. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>
degterev@ibcgenerium.ru

Sergey A. Taran, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5875-6933>
taran@ibcgenerium.ru

Rakhim R. Shukurov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
shukurov@ibcgenerium.ru

Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
Ustinnikova@expmed.ru

Received 9 September 2021

Revised 2 February 2022

Accepted 11 March 2022