Физико-химические и биологические свойства биоподобного и референтного препаратов тканевого активатора плазминогена

В. Д. Гусарова, М. С. Пантюшенко, В. М. Симонов, Р. Р. Шукуров, Р. А. Хамитов, А. Ю. Вишневский*

Общество с ограниченной ответственностью
«Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ул. Владимирская 14, пос. Вольгинский, Петушинский район,
Владимирская область, 601125, Российская Федерация

Рекомбинантный тканевой активатор плазминогена (международное непатентованное название — алтеплаза), разработанный и зарегистрированный компанией АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия), является полным аналогом лекарственного препарата Актилизе®, используемого для лечения заболеваний, сопровождающихся тромбообразованием, таких как инфаркт миокарда, тромбоэмболия легочной артерии и ишемический инсульт. **Цель работы:** провести комплексное исследование сопоставимости физико-химических и биологических характеристик лекарственного препарата Ревелиза® и референтного препарата Актилизе® для оценки их биоподобия. **Материалы и методы:** сравнительное пептидное картирование с определением сопоставимости хроматографических профилей триптических гидролизатов проводилось методами ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии, определение молекулярно-массового распределения — методами масс-спектрометрии и электрофореза в полиакриламидном геле по Леммли. Для определения чистоты и гомогенности препаратов, а также содержания родственных примесей (олигомеров, фрагментов) использовали метод гель-фильтрации; исследование профиля N-гликозилирования осуществляли методом гидрофильной ВЭЖХ, определение тотального содержания сиаловых кислот — методом Свеннерхольма. Оценку связывания белка с фибрином и фибриногеном человека проводили методом поверхностного плазмонного резонанса, сравнение специфической активности — методом лизиса фибринового сгустка. **Результаты:** в ходе исследований было продемонстрировано полное совпадение пептидных карт анализируемых препаратов, что свидетельствует об идентичности аминокислотной последовательности алтеплазы в составе сравниваемых препаратов. Также сравнительно были определены молекулярная масса и содержание интактной одноцепочечной формы белка в лекарственных препаратах, количественно охарактеризованы посттрансляционные модификации, содержание сиаловых кислот и нейтральных сахаров. При изучении профиля N-гликозилирования обнаружены незначительные различия в процентном содержании мультиантенных комплексных гликанов. Специфичность алтеплазы оценивали при образовании белковых комплексов с природными лигандами алтеплазы — фибрином и ингибитором активатора плазминогена первого типа, при этом достоверных различий обнаружено не было. При сравнении специфической активации фибринолитической активности плазминогена в тесте на скорость лизиса фибринового сгустка была продемонстрирована сопоставимость препаратов Ревелиза® и Актилизе®. **Выводы:** проведенные сравнительные экспериментальные исследования показали отсутствие различий в структуре, гетерогенности распределения зарядов, содержании примесей, а также специфической активности алтеплазы в составе лекарственного препарата Ревелиза® и референтного препарата Актилизе®, что позволяет сделать вывод о сопоставимости препаратов по физико-химическим и биологическим свойствам.

Ключевые слова: тканевый активатор плазминогена; биоаналог; Актилизе®; Ревелиза®; профиль гликозилирования; посттрансляционные модификации; лизис фибринового сгустка

Для цитирования: Гусарова ВД, Пантюшенко МС, Симонов ВМ, Шукуров РР, Хамитов РА, Вишневский АЮ. Физико-химические и биологические свойства биоподобного и референтного препаратов тканевого активатора плазминогена. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):39–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-39-49>

***Контактное лицо:** Вишневский Александр Юрьевич; vishnevskiy@ibcgenerium.ru

Physico-Chemical and Biological Properties of Biosimilar and Reference Tissue Plasminogen Activator Products

V. D. Gusarova, M. S. Pantyushenko, V. M. Simonov, R. R. Shukurov, R. A. Khamitov, A. Yu. Vishnevskiy*

International Biotechnology Center «GENERIUM»,
14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinsky District,
Vladimir Oblast 601125, Russian Federation

Recombinant tissue plasminogen activator (international nonproprietary name — alteplase) which was developed by «GENERIUM» (Russia) and received a marketing authorisation in Russia is completely analogous to Actilyse® which is used to treat medical conditions accompanied by thrombosis, such as acute myocardial infarction, pulmonary embolism, and ischemic stroke. **The aim of the study** was to carry out a comprehensive comparison of physico-chemical and biological properties of Revelyse® and the reference product Actilyse® in order to assess their biosimilarity. **Materials and Methods:** comparative peptide mapping and determination

of comparability of chromatographic profiles of tryptic hydrolysates was performed using RP-HPLC and mass-spectrometry; the molecular weight distribution was determined by mass-spectrometry and polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli method). The purity and homogeneity of products as well as the content of related impurities (oligomers and fragments) were determined using gel filtration; N-glycosylation profile was analysed by hydrophilic HPLC, total sialic acid was quantified by the Svennerholm resorcinol method. Protein binding to fibrin and human fibrinogen was assessed by surface plasmon resonance, and the specific activity was compared by fibrin clot lysis. **Results:** the research demonstrated a complete overlap of the products' peptide maps, which indicates the identity of alteplase amino acid sequences in the two medicines being compared. The authors of the study also determined the molecular weight and the content of the intact single-stranded form of the protein, and quantified post-translational modifications, the content of sialic acids and neutral sugars. The analysis of the N-glycosylation profile revealed insignificant differences in the percentage of multi-antenna complex glycans. The specificity of alteplase was evaluated by analysing the formation of protein complexes with natural alteplase ligands – fibrin and plasminogen activator inhibitor-1, but no significant differences were found. The comparison of specific activation of plasminogen fibrinolytic activity was performed based on the results of the assay analysing the fibrin clot lysis rate, and it demonstrated comparability of Revelyse® and Actilyse®. **Conclusions:** comparative experimental studies have shown no differences in the structure, charge distribution heterogeneity, impurities content, and specific activity of alteplase as a component of Revelyse® and the reference product Actilyse®, which leads to the conclusion that they are similar in terms of physico-chemical and biological properties.

Key words: tissue plasminogen activator; biosimilar; Actilyse®; Revelyse®; glycosylation profile; post-translational modifications; fibrin clot lysis

For citation: Gusarova VD, Pantyushenko MS, Simonov VM, Shukurov RR, Khamitov RA, Vishnevskiy AYU. Physico-chemical and biological properties of biosimilar and reference tissue plasminogen activator products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):39–49. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-39-49>

Corresponding author: Aleksandr Yu. Vishnevskiy; vishnevskiy@ibcgenerium.ru

Тканевой активатор плазминогена (tPA) является мультидоменной сериновой протеиназой, катализирующей реакцию превращения плазминогена (Pgn) в плазмин (Plm) расщеплением R₅₆₁–V₅₆₂. tPA представляет собой гликопептид, состоящий из 527 аминокислот, которые формируют пять пространственных доменов четырех типов: (1) А-домен фибринонектинового типа I фингер-домен — последовательность 1–43; (2) GF-подобный домен — последовательность 44–91; (3–4) два крингл-домена (kringle I — последовательность 92–173, kringle II — последовательность 180–261), соответствующие крингл-доменам плазминогена и протромбина; (5) протеазный С-концевой фрагмент (последовательность 276–527), гомологичный трипсиновым сериновым протеазам, содержит активный каталитический сайт, состоящий из His322, Asp371 и Ser478 (рис. 1). Присутствующие 35 остатков цистеина образуют 17 внутримолекулярных дисульфидных связей.

Основная роль tPA, экспрессируемого клетками эндотелия сосудов, заключается в разрушении фибриновых полимеров посредством активации плазмينا, поэтому рекомбинантный человеческий tPA используется для лечения заболеваний, связанных с тромбообразованием (таких, как инфаркт миокарда, ишемический инсульт и эмболия легочной артерии).

В 1987 году FDA одобрило регистрацию ЛП Актилизе® («Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ», Германия) — рекомбинантного человеческого tPA (МНН *Алтеплаза*), отличающегося от ранее созданных препаратов преимущественным фибринолитическим действием и очень слабым влиянием на фибриноген плазмы.

Компанией АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия) разработан и зарегистрирован рекомбинантный человеческий тканевой активатор плазминогена (в лекарственной форме лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 50 мг) под торговым названием Ревелиза®, являющийся полным аналогом по составу, дозировке и лекарственной форме ЛП Актилизе®.

Для регистрации биоподобных лекарственных средств необходимо после оценки качества и доказательств его соответствия установленным требованиям показать схожесть параметров качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим ЛП (в такой же лекарственной форме и при идентичном способе введения). Принципы сравнительной оценки биоподобных препаратов подробно изложены в отечественных¹ и международных² нормативных документах. Выбранные методы анализа должны максимально выявить возможные различия в сравниваемых препаратах, способные повлиять на эффективность и безопасность.

Цель работы — провести комплексное исследование сопоставимости физико-химических и биологических характеристик лекарственного препарата Ревелиза® и референтного препарата Актилизе® для оценки их биоподобия.

Материалы и методы

Материалы

Все исследования проводили, используя три серии референтного ЛП Актилизе® (серия 606428, дата выпуска: 09.2016, годен до: 09.2019; серия 604030, дата выпуска: 09.2016, годен до: 09.2019; серия 606119, дата выпуска: 09.2016, годен до: 09.2019) и три серии биоподобного ЛП Ревелиза® (серия 011115, дата выпуска: 11.2015, годен до: 12.2017; серия 010116, дата выпуска: 01.2016, годен до: 02.2018; серия 020516, дата выпуска: 05.2016, годен до: 06.2018).

Методы

1. Пептидное картирование ОФ-ВЭЖХ

Хроматографические процедуры проводили, используя хроматографическую систему высокого давления Waters 2695 (США).

Пробоподготовку образцов *алтеплазы* для пептидного картирования проводили согласно методике, описанной

¹ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том IV; М.: Полиграф-Плюс; 2014.

² The European Medicines Agency. Similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMA/CHMP/BMWP/49348/2005).

The European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies — non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010).

Микрогетерогенность tPA (алтеплаза)

Рис. 1. Пространственная структура алтеплазы с указанием сайтов гетерогенности.
Fig 1. Spatial structure of alteplase with indication of heterogeneity sites.

в EP 9.0³. Разделение триптических гидролизатов осуществляли на колонке YMC-Pack ODS-AQ, 100×4,6 мм, 5 мкм, 200 Å (YMC, Япония) с использованием подвижных фаз следующего состава — А: 66,6 мМ NaH₂PO₄×H₂O, pH 2,85; В: 16,6 мМ NaH₂PO₄×H₂O, 75 % ацетонитрил, pH 2,85. Скорость потока составляла 1 мл/мин, градиент 5–40 % В за 90 мин, 40–80 % В за 30 мин. Детекцию осуществляли при 210 нм.

2. Хромато-масс-спектрометрическое пептидное картирование

Образцы анализируемых серий препаратов алтеплазы денатурировали в буферном растворе, содержащем 6 М мочевины и 0,1 % SDS (pH 8,6), затем восстанавливали 5 мМ ДТТ в течение 1 ч при 50 °С. Алкилирование проводили при помощи раствора 20 мМ йодуксусной кислоты при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Восстановленный и алкилированный белок переводили ультрафильтрацией в буферный раствор (50 мМ бикарбонат аммония, pH 8,2) при помощи мембранного микроконцентратора с пределом проницаемости 3 кДа. Дегликозилирование образцов проводили обработкой пептид-N-гликозидазой F (ПНГаз F) при 37 °С в течение 16 ч. Протеолиз проводили при температуре 40 °С в течение 6 ч при соотношении трипсина к алтеплазе 1/40 (w/w). Реакцию останавливали титрованием трифторуксусной кислотой до pH 2,0.

Разделение триптических гидролизатов осуществляли на колонке Waters Acquity UPLC CSH Peptide, 2,1×100 мм, 1,7 мкм, 130 Å (Waters). Применяли элюенты следующего состава: фаза А — 0,1 % муравьиная кислота в воде, фаза В — 0,1 % муравьиная кислота в ацетонитриле. Разделение проводили в градиентном режиме (2–26 % В за 32 мин, 26–35 % В за 2 мин) при скорости потока 0,5 мл/мин.

3. Молекулярная масса

Определение проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС после очистки белков от полимеров и низкомолекулярных примесей при помощи ультрафильтрации и дегликозилирования образца ПНГазой F. Разделение осуществляли на колонке Agilent PLRP-S, 2,1×50 мм, 1000 Å, 5,0 мкм. Применяли элюенты следующего состава: фаза А — 0,1 % муравьиная кислота в воде, фаза В — 0,1 % муравьиная кислота в ацетонитриле. Разделение проводили в градиентном режиме (20–50 % В за 11 мин) при скорости потока 0,25 мл/мин.

4. Профиль N-гликозилирования

Подготовку образцов проводили при помощи набора GlykoPrep N-Glycan Sample Preparation kit (ProZyme, #GP96NG-LB). Селективное дегликозилирование модифицированных остатков аспарагина осуществляли при помощи ПНГазы F, затем проводили карбоксилирование образующихся гликозиламинов с образованием флуоресцентных производных N-гликанов. Разделение меченых олигосахаридов проводили при помощи гидрофильной ВЭЖХ с использованием колонки TSKgel Amide-80, 2,0×150 мм, 3 мкм (Tosoh Bioscience) при скорости потока 0,2 мл/мин. Использовали элюенты следующего состава: фаза А — 60 мМ формиат аммония в воде с добавлением 75 % ацетонитрила, фаза В — водный 115 мМ раствор формиата аммония с 54 % ацетонитрила. Для лучшего разделения применяли градиент от 20 до 70 % В в течение 100 мин. Детекцию N-гликанов осуществляли по сигналу флуоресценции при 345 нм в результате возбуждения светом с длиной волны 285 нм.

5. Масс-спектрометрические измерения

Во всех экспериментах для определения *m/z* (отношения массы к заряду) использовали времяпролетный квадруполь-

³ European Pharmacopoeia 9th Edition. 07/2013:1677 Alteplase for injection.

ный масс-детектор Agilent QTOF 6550 с источником ионов Dual Jet Stream в режиме мониторинга положительных ионов. При измерении массы полноразмерного белка деконволюцию спектров выполняли методом максимальной энтропии. Для подтверждения аминокислотной последовательности детектирование проводили, используя фронтально-зависимый tandemный режим сканирования. При соотношении регистрируемых масс пептидов с их возможной структурой учитывались наиболее распространенные посттрансляционные модификации: дезамидирование глутамин и аспарагин, окисление, а также O-гликозилирование. Массу анализируемых N-гликанов вычисляли в виде разницы: $M - 261,14773$, где M — регистрируемое значение массы олигосахаридов, меченных флуорофором InstantPC™.

6. Сиаловые кислоты

Определение общего содержания сиаловых кислот проводили резорциноловым методом Свеннерхольма. Для этого к 100 мкл образцов *алтеплазы* (2 мг/мл) прибавляли 20 мкл 40 мМ йодной кислоты и инкубировали в течение 35 мин на льду, затем прибавляли 250 мкл резорцинолового реагента и после инкубации в течение 5 мин на льду переносили образцы в термостат, нагретый до 95 °C. Через 15 мин образцы охлаждали до комнатной температуры, прибавляли по 250 мкл этанола и инкубировали 3 мин при 37 °C. После охлаждения до комнатной температуры измеряли поглощение при длине волны 600 нм.

7. Нейтральные сахара

Количественное определение нейтральных сахаров в образцах *алтеплазы* проводили согласно методике, описанной в EP 9.0⁴.

8. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ ЭФ)

Анализ образцов *алтеплазы* проводили по методу Лэммли в 10 % полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях, перед анализом образцы прогревали при 100 °C в течение 5 мин в присутствии ДТТ. Окрашивание солями серебра проводили согласно инструкции к набору Silver Stain Plus™ kit (Bio-Rad).

9. Содержание мономера и одноцепочечной формы

Для количественного определения хроматографической чистоты (содержание мономера), а также содержания одноцепочечной формы *алтеплазы* применяли гель-фильтрационную хроматографию на колонке TSK gel G3000SW 7,5×600 мм (Tosoh Bioscience, Германия) с использованием подвижной фазы на основе фосфатного буферного раствора, содержащего 0,1 % SDS. В нативных условиях образцы анализировали без предварительной пробоподготовки; для определения содержания одноцепочечной и двухцепочечной форм *алтеплазы* дисульфидные связи в образцах предварительно восстанавливали при помощи ДТТ.

10. Взаимодействие алтеплазы с фибрином

Для количественной характеристики специфического взаимодействия *алтеплазы* с фибрином использовали метод поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore T200 (GE, США). Для этого фибриноген ковалентно иммобилизовали на поверхность сенсора CM5, после чего конвертировали в фибрин в присутствии тромбина, как описано Р. Björquist [1]. Для определения равновесной константы диссоциации (KD) комплекса *алтеплаза*–фибрин использовали одноцикловый анализ, при котором последовательно без промежуточных регенераций на поверхность сенсора с иммобилизованным фибрином подавали разные концентрации

алтеплазы. По достижении равновесия между свободной и связанной формами *алтеплазы* при данной концентрации *алтеплазы* и при равном количестве иммобилизованного на сенсоре фибрина вычисляли равновесную KD образования межмолекулярного комплекса.

11. Взаимодействие алтеплазы с PAI-1

Для количественной характеристики специфического взаимодействия *алтеплазы* с PAI-1 использовали метод поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore T200 (GE, США). PAI-1 (ингибитор активации плазминогена первого типа) относится к классу серпинов, для них характерно практически необратимое взаимодействие с мишенью [2]. В связи с этим для сравнительной характеристики вычисляли кинетические константы скорости ассоциации формирующегося комплекса. Для этого PAI-1 ковалентно иммобилизовали на поверхность сенсора CM5 до уровня 300 RU, после чего подавали возрастающие концентрации *алтеплазы*, наблюдая в реальном времени за скоростью формирования комплекса на поверхности сенсора. Анализ проводили в одноцикловом формате, после чего вычисляли кинетическую константу скорости ассоциации формирующегося на сенсоре комплекса.

12. Определение активности алтеплазы

Определение активности *алтеплазы* в составе референтного лекарственного препарата Актилизе® и активности *алтеплазы* в составе биоаналогичного препарата Ревелиза® проводили согласно методике, описанной в EP 9.0⁵. Для этого в пробирки вносили по 1 мл раствора фибриногена (2 мг/мл) и 20 мкл раствора плазминогена (1 мг/мл). В другой набор пробирок вносили 300 мкл раствора тромбина и по 300 мкл раствора стандартного образца или раствора испытуемых образцов, которые затем добавляли в пробирки, содержащие смесь плазминоген/фибриноген. Время добавления раствора фиксировали. Перемешивали полученную смесь и переносили пробирки в водяную баню, предварительно прогретую до 37 °C. В течение приблизительно 30 с образовывался сгусток. Время лизиса сгустка определяли как время от момента добавления образца в раствор до момента поднятия на поверхность последнего пузырька воздуха.

С помощью калибровочного графика зависимости десятичного логарифма активности стандарта $\lg(U)$ от десятичного логарифма значения времени лизиса $\lg(t)$ определяли специфическую фибринолитическую активность *алтеплазы*.

Результаты и обсуждение

Рекомбинантный белок tPA имеет три сайта N-гликозилирования. Известно, что первый (Asn117) модифицирован преимущественно олигосахаридами и, в меньшей мере, гибридными олигосахаридами [3], в то время как два остальных сайта (Asn184 и Asn448) содержат преимущественно комплексные структуры [4]. Помимо N-гликанов молекула *алтеплазы* также содержит связанную по остатку треонина (Thr61) фукозу [5]. Показано, что вариabельность модификации по сайту Asn184 приводит к образованию форм белка с двумя (тип II) или тремя (тип I) присутствующими олигосахаридными фрагментами. Как правило, рекомбинантный tPA синтезируется в виде смеси молекул обоих типов в соотношении, близком к единице [6]. Функциональные различия между формами выражаются в аффинности к фибрину (II тип связывает лучше), а также на уровне скорости выведения препарата из организма [7–9].

⁴ European Pharmacopoeia 9th Edition. 07/2013:1677 Alteplase for injection.

⁵ Там же.

Рис. 2. Пептидное картирование *алтеплазы* (аминокислотная последовательность пептидов указана в таблице 1).
Fig 2. Peptide mapping of *alteplase* (the amino acid sequence of peptides is shown in Table 1).

Первичная структура

Для подтверждения идентичности первичной структуры *алтеплазы* в сравниваемых препаратах было проведено пептидное картирование триптических гидролизатов методом ОФ-ВЭЖХ. При сравнении пептидных карт референтного и биоаналогичного препаратов (рис. 2) различий выявлено не было, полученные хроматограммы совпадают с пептидной картой *алтеплазы*, приведенной в ЕР 9.0⁶. Идентифицированные таким способом пептидные фрагменты (табл. 1) представляют более 55 % всей последовательности молекулы [10].

Интактные молекулярные массы одноцепочечной и двухцепочечной форм *алтеплазы*, определенные масс-спектрометрически, составили 56958 и 34776 Да соответственно при полном совпадении спектров сравниваемых препаратов (рис. 3). Помимо определения молекулярной массы используемая методика позволила провести полное подтверждение аминокислотной последовательности молекулы *алтеплазы* в составе всех сравниваемых образцов. Также была проведена идентификация сайтов посттрансляционных модификаций, в результате которой было подтверждено наличие 11 сайтов дезамидирования (Q_{17} , N_{29} , Q_{42} , N_{140} , N_{205} , Q_{222} , Q_{75} , N_{95} , N_{211} , N_{241} , N_{249}) и трех сайтов окисления (M_{13} , M_{180} , M_{207}). Также в каждом из белков были подтверждены два сайта N- и один сайт O-гликозилирования.

На основании совокупности полученных данных по анализу первичной структуры *алтеплазы* референтного препарата и препарата-аналога можно сделать вывод об идентичности их аминокислотной последовательности и сходстве характера посттрансляционных модификаций.

Гликозилирование

В ходе данного исследования было проведено количественное определение индивидуальных компонентов профиля

N-гликанов методом ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия с одновременным подтверждением их структуры при помощи сканирующего масс-спектрометра. Для этого проводили высокоспецифическое ферментативное отщепление гликанов от молекулы белка с последующей модификацией флуорофором InstantPC™. Основной набор наблюдаемых структур представлен на рисунке 4 и является в значительной мере сходным среди сравниваемых препаратов. Уникальные гликаны обнаружены не были. Хотя Активлизе® и Ревелиза® продемонстрировали небольшие различия в процентном распределении олигосахаридов и их групп, тем не менее везде основной вклад вносили олигоманнозные структуры, а также би-, три- и полиантенные комплексные гликаны, что согласуется с данными литературы [3, 4, 6]. В исследуемых образцах в незначительном количестве были обнаружены остатки N-гликолилнейраминовой кислоты, которые могут входить в гликановый состав белков, синтезируемых клетками CHO. Другой из известных антигенов углеводной природы — мотив Gal(α 1,3)-Gal — зарегистрирован не был. Поскольку часто функциональное влияние оказывается не отдельной модификацией, а целой группой сходных по структуре олигосахаридов, проведение оценки вкладов индивидуальных компонентов гликопрофиля принято осуществлять на комплексном уровне. Ряд таких интегральных характеристик представлен в таблице 2.

Сходство/подобие профилей гликозилирования референтного и исследуемого препаратов является основанием для заключения на этапе оценки качества вопроса о рассмотрении разработанного препарата как биоподобного. В ходе исследования были установлены отличия в процентном содержании мультантенных комплексных гликанов. Нужно отметить, что все структуры этой группы содержат до четырех остатков N-ацетилнейраминовой кислоты одновременно и являются наиболее весомыми носителями отрицательного заряда. Таким

⁶ European Pharmacopoeia 9th Edition. 07/2013:1677 Alteplase for injection.

Таблица 1. Список идентифицированных пептидных фрагментов *алтеплазы* (пептидное картирование ОФ-ВЭЖХ)
Table 1. The list of identified peptide fragments of *alteplase* (peptide mapping by RP-HPLC)

Пик	Триптический пептид	Фрагмент	Последовательность
1	T7	50–55	SCSEPR
2	T20	229–233	HNYSR
3	T12	130–135	RPDAIR
4	T36	357–361	YIVHK
5	T3a	11–23	TQMIYQQHQSLR
	T3c	22–27	LRPVLR
	T18a	208–212	ILIGK
	T49	506–513	DVPGVYTK
6	T25	268–275	QYSQPQFR
7	T1	1–7	SYQVICR
8	T10	90–101	ATCYEDQGISYR
9	T13	136–145	LGLGNHNYCR
10	T34	343–351	VVPGEEEEQK
	T35	352–356	FEVEK
11	T46	450–462	TVTDNMLCAGDTR
12	T4	28–30	SNR
	T5	31–40	VEYCWNSGR
13	T41	417–427	HEALSPFYSER
	T19	213–228	VYTAQNPSAQUALGLGK
14	T32a	328–339	FPPHHLTVILGR
	T47	463–489	SGGPQANLHDACQGDSSGPLVCLNDGR
15	T50	514–522	VTNYLDWIR
16	T37	362–378	EFDDDTYDNDIALQLK
17	T8	56–82	CFNGGTCQQALYFSDFCQCPEGFAGK
18	T18	190–212	GTHSLTESGASCLPWNSMILIGK
19	T27	278–291	GGLFADIASHPWQAAIFAK
20	T48	490–505	MTLVGIISWGLGCGQK

Таблица 2. Процентная площадь пиков гликанов по данным ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия
Table 2. Percentage peak area of glycans determined by hydrophilic interaction HPLC

Группа N-гликанов	ЛП Актилизе®			ЛП Ревелиза®		
	606428	604030	606119	011115	010116	020516
1. Заряженные	62,2	66,4	64,2	61,9	62,9	64,3
Среднее значение	64±2			63±1		
2. Олигоманнозные	31,1	28,6	29,7	28,6	32,1	29,9
Среднее значение	30±1			30±2		
3. Фукозилированные	65,1	58,9	63,1	58,4	63,9	60,2
Среднее значение	62±3			61±3		
4. Галактозилированные	69,3	66,6	64,9	68,5	67,8	70,9
Среднее значение	67±2			69±2		
5. Комплексные биантенные	42,6	37,2	34,8	32,2	28,3	33,6
Среднее значение	38±4			31±3		
6. Комплексные мультиантенные	26,4	30,1	27,4	40,1	34,8	39,1
Среднее значение	28±2			38±3		
7. С N-гликолилнйраминово́й кислотой	Не более 2	Не более 4	Не более 2	Не более 1	Не более 2	Не более 1
Среднее значение	Не более 4			Не более 2		

Одноцепочечная форма

Двухцепочечная форма

Рис. 3. Определение молекулярной массы алтеплазы.
Fig. 3. Determination of alteplase molecular weight.

образом, несмотря на сходные значения общих сумм площадей всех заряженных N-гликанов, для ЛП Ревелиза® стоило ожидать несколько большего абсолютного содержания сиаловой кислоты. Это предположение подтверждается результатом прямого определения сиаловых кислот (табл. 3), однако полученные значения не выходят за пределы рекомендуемых ЕР 9.0 норм.

Вместе с оценкой общего содержания нейтральных сахаров полученные данные позволяют считать исследованные препараты сопоставимыми, так как различия в количестве комплексных мультиантенных гликанов между препаратами могут быть отнесены к незначительным и не сказываются на биологических свойствах алтеплазы *in vitro* (табл. 4–6).

Чистота

Помимо вариаций паттерна гликозилирования нормируемым показателем качества ЛП алтеплазы является соотношение одноцепочечной (интактной) и двухцепочечной (рас-

щепленной) форм молекулы. Интактная форма алтеплазы (1–527 аминокислотные остатки) при переходе в активную форму расщепляется между остатками R₂₇₅ и I₂₇₆, что приводит к образованию двух отдельных цепей 1–275 и 276–527, которые удерживаются вместе посредством дисульфидных связей (рис. 1). Среди продуктов расщепления пептид 276–527 обладает меньшей молекулярной массой и содержит единственный сайт N-гликозилирования (N₄₄₈), в то время как второй из пептидов (1–275) обычно полностью гликозилирован по положению N₁₁₇ и частично по положению N₁₈₄. В том случае если последний из сайтов модифицирован (тип I), алтеплаза проявляет пониженную специфическую активность и сродство к фибрину [7, 8]. Кроме того, эта форма отличается от негликозилированной (тип II) по молекулярной массе. Это позволяет идентифицировать их методом ПААГ ЭФ (рис. 5). Две близкие по интенсивности полосы в области 37 кДа свидетельствуют

Рис. 4. Профиль N-гликозилирования алтеплазы.
Fig. 4. N-Glycosylation profile of alteplase.

Таблица 3. Содержание нейтральных сахаров и сиаловых кислот в ЛП Актилизе® и ЛП Ревелиза®
Table 3. The content of neutral sugars and sialic acids in Actilyse® and Revelyse®

Модификация	Содержание модификаций, моль, на моль алтеплазы						Норма по EP 9.0
	ЛП Актилизе®			ЛП Ревелиза®			
	606428	604030	606119	011115	010116	020516	
1. Нейтральные сахара	13,69	14,19	14,12	12,89	13,10	13,92	8,4–15,6
Среднее значение	14,00±0,27			13,30±0,54			
2. Сиаловые кислоты	2,85	2,84	2,72	3,02	3,15	2,96	2,1–3,9
Среднее значение	2,80±0,07			3,04±0,10			

Таблица 4. Сравнение вычисленных равновесных констант диссоциации комплекса алтеплаза–фибрин
Table 4. Comparison of the calculated equilibrium dissociation constants of the alteplase–fibrin complex

Алтеплаза	Серия	KD, M		Критерий сопоставимости, %
		измеренное	среднее по сериям	
ЛП Актилизе®	606428	$4,59 \cdot 10^{-7}$	$(4,35 \pm 0,22) \cdot 10^{-7}$	100,0
	604030	$4,32 \cdot 10^{-7}$		
	606119	$4,15 \cdot 10^{-7}$		
ЛП Ревелиза®	011115	$4,42 \cdot 10^{-7}$	$(4,20 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	103,5
	010116	$4,14 \cdot 10^{-7}$		
	020516	$4,03 \cdot 10^{-7}$		

Таблица 5. Сравнение вычисленных кинетических констант скоростей ассоциации комплекса алтеплаза–PAI-1
Table 5. Comparison of the calculated kinetic rate constants of association of the alteplase–PAI-1 complex

Алтеплаза	Серия	Ka (1/Ms)		Критерий сопоставимости, %
		измеренное	среднее по сериям	
ЛП Актилизе®	606428	$2,13 \cdot 10^6$	$(2,20 \pm 0,09) \cdot 10^6$	100,0
	604030	$2,27 \cdot 10^6$		
	606119	$2,20 \cdot 10^6$		
ЛП Ревелиза®	011115	$2,10 \cdot 10^6$	$(2,12 \pm 0,02) \cdot 10^6$	103,8
	010116	$2,14 \cdot 10^6$		
	020516	$2,12 \cdot 10^6$		

Таблица 6. Специфическая активность *алтеплазы*. Лизис фибринового сгустка
Table 6. *Alteplase* specific activity. Fibrin clot lysis

Алтеплаза	Серия	Активность, МЕ/мг		Критерий сопоставимости, %
		измеренное	среднее по сериям	
ЛП Актилизе®	606428	624166,8	625162±9589	106–109
	604030	616108,4		
	606119	635209,5		
ЛП Ревелиза®	011115	615216,2	610424±17740	102–108
	010116	590779,9		
	020516	625276,0		

Таблица 7. Хроматографическая чистота и содержание одноцепочечной формы в препаратах *алтеплазы*
Table 7. Chromatographic purity and the content of single-stranded form in *alteplase* products

Форма <i>алтеплазы</i>	Содержание формы, %		
	ЛП Актилизе®	ЛП Ревелиза®	Норма по ЕР 9.0
Мономер	97,90±0,17	96,80±0,36	Не менее 95
Одноцепочечная форма	82,2±0,4	80,6±1,9	Не менее 60

о сопоставимом количестве молекул *алтеплазы* обоих типов. Также на электрофореграмме идентифицируется одноцепочечная форма 1–527, представляющая собой широкую полосу с молекулярной массой около 60 кДа, которая не разделяется на ПААГ ЭФ в силу избыточного гликозилирования.

Количественное соотношение одноцепочечной и двухцепочечной форм *алтеплазы* в референтном и биоаналогичном препаратах было определено при помощи гель-фильтрации одновременно с определением хроматографической чистоты (рис. 6). Предварительное расщепление дисульфидных связей при помощи ДТТ приводит к диссоциации двухцепочечной формы на два отдельных фрагмента с молекулярными массами около 30 кДа, один из которых содержит крингл-домен, другой — протеазный домен. Как следует из полученных данных (табл. 7), сравниваемые препараты сопоставимы как по хроматографической чистоте (содержание мономера), так и по содержанию одноцепочечной формы.

Сродство к фибрину и PAI-1

Специфическое сродство *алтеплазы* к фибрину и PAI-1 проявляется в процессе регуляции фибринолиза путем активации плазминогена в присутствии фибринового сгустка. При этом природный ингибитор *алтеплазы* PAI-1 осуществляет контроль за количеством *алтеплазы*, способным активировать плазминоген. Для сравнительной характеристики специфического сродства ЛП Актилизе® и ЛП Ревелиза® в реальном времени сравнивали скорости формирования межмолекулярных комплексов *алтеплазы* как с фибрином, так и с PAI-1. Данные результатов анализа трех серий каждого препарата представлены в таблицах 4 и 5. Полученные данные позволяют считать ЛП биоподобными при критерии сопоставимости (отношение значений серии референтного препарата к остальным измеренным данным, выраженным в процентах), не выходящем за диапазон 80–125 %.

Определение активности *алтеплазы*

Тканевой активатор плазминогена (tPA, *алтеплаза*) — один из ключевых компонентов системы лизиса фибринового сгустка (фибринолиза). После системного введения препарата tPA находится в плазме в неактивной форме до связывания с фибрином (нерастворимый белок, образующийся в процессе свертывания крови). tPA активирует переход плазминогена

Рис. 5. Электрофореграмма *алтеплазы* в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.
Fig. 5. Electrophoregram of *alteplase* in polyacrylamide gel under denaturing conditions.

в плазмин, который, в свою очередь, осуществляет деградацию фибрина, что ведет к растворению фибринового сгустка и повышает тромболизис (растворение сгустка крови) только в ткани тромба.

Как следует из данных, представленных в таблице 6, специфическая активность ЛП Ревелиза® сопоставима с активностью референтного препарата Актилизе®. Данные значения входят в рекомендуемый ЕР 9.0 диапазон 90–110 % от установленной эталонной активности 580000 МЕ/мг.

Рис. 6. Содержание мономера (а) и одноцепочечной формы (б), определенное методом гель-фильтрации.
Fig. 6. The content of monomer (a) and single-chain form (b) determined by gel filtration.

Заключение

В ходе данного исследования была проведена комплексная сравнительная характеристика *алтеплазы* в составе референтного лекарственного препарата Активлизе® и биоаналогичного препарата Ревелиза®. В случае сложных белковых молекул, таких как *алтеплаза*, необходимо подтвердить как идентичность первичной аминокислотной последовательности, так и детально характеризовать участки молекулы, влияющие на биологическую активность и потенциальную безопасность.

Одним из факторов, влияющих на активность *алтеплазы* (лизис сгустка), является профиль гликозилирования, который незначительно различается у сравниваемых препаратов. Содержание индивидуальных гликанов, определенное при помощи ВЭЖХ гидрофильного взаимодействия, в случае ЛП Ревелиза® по отношению к референтному ЛП Активлизе® сдвинуто в сторону комплексных разветвленных структур, содержащих сиаловую кислоту, что подтверждается анализом общего ее количества, а также анализом содержания нейтральных сахаров.

Тем не менее препараты продемонстрировали высокую степень сходства/подобия при исследовании специфичности и активности *алтеплазы*, несмотря на различия в количестве комплексных мультиантенных гликанов между препаратами.

Известно, что при попадании в организм пациента вся одноцепочечная форма практически мгновенно переходит

в активную двухцепочечную, в связи с чем ЕР 9.0 регламентирует содержание одноцепочечной формы в количестве не менее 60 %. Определение содержания соотношения одноцепочечной/двухцепочечной форм было проведено двумя независимыми методами: ПААГ ЭФ и гель-фильтрационной ВЭЖХ. Электрофоретические профили сравниваемых препаратов демонстрируют высокую степень сходства; количественное содержание одноцепочечной формы близко к 80 %. Также при помощи выбранных методик была продемонстрирована сопоставимая степень чистоты препаратов.

Показано, что специфическая активность сравниваемых препаратов, а также их сродство к фибрину и PAI-1 (необходимое для регуляции фибринолиза) статистически сопоставимы.

На основании полученных данных, указывающих на отсутствие различий в структуре, выявленной незначительной гетерогенности в зарядах и содержании примесей, а также сопоставимой специфической активности, может быть сделано заключение о том, что лекарственный препарат Ревелиза® биоаналогичен референтному препарату Активлизе® по физико-химическим и биологическим свойствам.

Благодарности. Выражаем благодарность всему коллективу отдела аналитических методов МБЦ «ГЕНЕРИУМ» за советы и поддержку в работе над проектом. Научному сотруднику М.А. Смолову за разработку методов анализа

гликанов и важные замечания к статье. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the entire team of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM» for their advice and support with regard to this project; and to the researcher M.A. Smolov for the development of methods of glycan analysis and important comments on the paper. The study was performed without external funding.

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

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Guzzetta AW, Basa LJ, Hancock WS, Keyt BA, Bennett WF. Identification of carbohydrate structures in glycoprotein peptide maps by the use of LC/MS with selected ion extraction with special reference to tissue plasminogen activator and a glycosylation variant produced by site directed mutagenesis. *Anal Chem.* 1993;65(21):2953–62.
2. Spellman MW, Basa LJ, Leonard CK, Chakel JA, O'Connor JV, Wilson S, van Halbeek H. Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989;264(24):14100–11.
3. Harris RJ, Leonard CK, Guzzetta AW, Spellman MW. Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry.* 1991;30(9):2311–4.

4. Parekh RB, Dwek RA, Thomas JR, Opdenakker G, Rademacher TW, Wittwer AJ, et al. Cell-type-specific and site-specific N-glycosylation of type I and type II human tissue plasminogen activator. *Biochemistry.* 1989;28(19):7644–62.
5. Wittwer AJ, Howard SC, Carr LS, Harakas NK, Feder J, Parekh RB, et al. Effects of N-glycosylation on *in vitro* activity of Bowes melanoma and human colon fibroblast derived tissue plasminogen activator. *Biochemistry.* 1989;28(19):7662–9.
6. Berg DT, Burck PJ, Berg DH, Grinnell BW. Kringly glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator improves functional properties. *Blood.* 1993;81(5):1312–22.
7. Cole ES, Nichols EH, Poisson L, Harnois ML, Livingston DJ. *In vivo* clearance of tissue plasminogen activator: The complex role of sites of glycosylation and level of sialylation. *Fibrinolysis.* 1993;7(1):15–22. [https://doi.org/10.1016/0268-9499\(93\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0268-9499(93)90050-6)
8. Chloupek RC, Harris RJ, Leonard CK, Keck RG, Keyt BA, Spellman MW, et al. Study of the primary structure of recombinant tissue plasminogen activator by reversed-phase high-performance liquid chromatographic tryptic mapping. *J Chromatogr.* 1989;463(2):375–96.
9. Kim PY, Tieu LD, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JL. A high affinity interaction of plasminogen with fibrin is not essential for efficient activation by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 2012;287(7):4652–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.317719>
10. Björquist P, Brohlin M, Ehneborn J, Ericsson M, Kristansen C, Pohl G, Deinum J. Plasminogen activator inhibitor type-1 interacts exclusively with the proteinase domain of tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1209(2):191–202.

Об авторах

Гусарова Валентина Дмитриевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»

Пантюшенко Мария Семеновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»

Симонов Владимир Михайлович, научный сотрудник отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

Шукуров Рахим Рахманкулович, канд. биол. наук, начальник лаборатории физико-химических методов отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, профессор, генеральный директор ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Вишневский Александр Юрьевич, канд. биол. наук, начальник отдела аналитических методов ООО «Международный биотехнологический центр «ГЕНЕРИУМ»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7865-9361>

Authors

Valentina D. Gusarova, Candidate of Biological Sciences, Senior Scientist of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM»

Maria S. Pantyushenko, Candidate of Biological Sciences, Senior Scientist of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM»

Vladimir M. Simonov, Scientist of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

Rakhim R. Shukurov, Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory of Physicochemical Methods, Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

Ravil A. Khamitov, Doctor of Medical Science, Professor, General Director of the International Biotechnology Center «GENERIUM», **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

Aleksandr Yu. Vishnevskiy, Candidate of Biological Sciences, Head of the Analytical Methods Department of the International Biotechnology Center «GENERIUM»,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7865-9361>

Поступила 07.02.2019
После доработки 13.02.2019
Принята к публикации 14.02.2019

Received 7 February 2019
Revised 13 February 2019
Accepted 14 February 2019