

Теоретическое обоснование выбора субстанции интерферона альфа-2b для аттестации в качестве стандартного образца для оценки подлинности методом пептидного картирования

О. Б. Устинникова, О. Б. Рунова, Е. О. Голощапова, Л. В. Корсун

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

Поступила 10.08.2016. Принята к публикации 18.08.2016.

В статье представлены результаты теоретических исследований по обоснованию выбора субстанции метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b для аттестации в качестве стандартного образца при оценке подлинности методом пептидного картирования. В настоящее время в России производят как безметиониновые, так и метиониновые формы субстанций интерферонов альфа-2b. Рекомендованный Европейской фармакопеей референтный образец интерферона альфа-2b CRS I0320301 является безметиониновым и подходит для оценки подлинности методом пептидного картирования только безметиониновой формы белка. С целью выбора кандидата в стандартный образец метиониновой формы интерферона альфа-2b в статье проведен сравнительный анализ номенклатуры показателей и методов, используемых отечественными производителями для подтверждения качества субстанций, зарегистрированных в Российской Федерации. Проведенные теоретические исследования позволили выбрать субстанцию интерферона альфа-2b в качестве кандидата в стандартный образец для оценки подлинности методом пептидного картирования.

Ключевые слова: стандартный образец; субстанция рекомбинантного интерферона альфа-2b метиониновая; пептидное картирование; ВЭЖХ.

Библиографическое описание: Устинникова О.Б., Рунова О.Б., Голощапова Е.О., Корсун Л.В. Теоретическое обоснование выбора субстанции интерферона альфа-2b для аттестации в качестве стандартного образца для оценки подлинности методом пептидного картирования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16 (3): 161–165.

Российское законодательство в области обращения лекарственных средств (ЛС) устанавливает приоритет государственного контроля их безопасности, качества и эффективности [1]. К сфере государственного регулирования, в соответствии с Федеральным законом Российской Федерации № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений», относится и деятельность, связанная с производством, регистрацией и контролем качества ЛС, что в свою очередь приводит к необходимости наличия стандартных образцов (СО), используемых в качестве меры сравнения при подтверждении подлинности, активности и некоторых других показателей качества ЛС [2, 3].

В случае отсутствия соответствующих образцов (эталонов), хранимых национальными метрологическими институтами, СО являются единственным средством, обеспечивающим необходимую точность и правильность измерений, а также позволяющим оценивать сопоставимость полученных результатов [4].

Действующая в России нормативная документация (НД) определяет общие требования к процедуре создания и аттестации СО без учета специфических особенностей показателей качества ЛС, в том числе биологического происхождения [5]. В связи с этим, в процессе выбора кандидата в СО и планировании экспериментальных работ по его аттестации, применяют различные подходы, обусловленные природой необходимого СО и спецификой его применения.

Таким образом, наряду с разработкой нормативно-методических документов, необходимых для обеспечения функционирования системы СО, актуальной задачей является установление процедуры выбора и аттестации

возможных кандидатов в СО для оценки качества ЛС, в том числе биологических препаратов.

Анализ методических подходов к оценке качества биологических препаратов выявил необходимость разработки СО для ряда ЛП, одним из которых является интерферон альфа-2b (ИФН).

ИФН альфа-2b представляет собой негликозилированный белок с молекулярной массой около 19240 Да, молекула которого должна состоять из 165 аминокислот, где в положении 23 находится аргинин, N-концевым аминокислотным остатком должен являться цистеин, связанный дисульфидной связью с цистеином, находящимся в положении 98 (рис. 1).

Важнейшим показателем эффективности и безопасности препарата рекомбинантного ИФН альфа-2b, полученного в результате воспроизведения технологии рекомбинантной ДНК, является подтверждение его структуры.

Существуют различные технологии рекомбинантной ДНК, позволяющие получать как интерферон ИФН альфа-2b максимально приближенный по структуре к эндогенному, где N-концевым аминокислотным остатком яв-

CDLPQTHSG	SRRTLMLLAQ	MRRISLFSCL	KDRHDFGFPQ
EEFGNQFQKA	ETIPVLHEMI	QQIFNLFSTK	DSSAAWDETL
LDKFYTELYQ	QLNDLEACVI	QGVGVTEPL	MKEDSILAVR
KYFQRITLYL	KEKKYSPCAW	EVVRAEIMRS	FSLSTNLQES
LRSKE			

Рис. 1. Аминокислотная последовательность ИФН альфа-2b [6].

ляется цистеин (безметиониновая форма), так и ИФН альфа-2b, где N-концевым аминокислотным остатком является метионин (метиониновая форма) [7].

Показатели качества, подтверждающие эффективность и безопасность вновь получаемых ИФН альфа-2b на уровне анализа структуры белка и его чистоты по сравнению с СО, наиболее полно можно оценить на стадии очищенного целевого белка до добавления вспомогательных веществ. Таким образом, используемый при анализе структуры СО, должен представлять собой субстанцию, аналогичную исследуемому образцу ИФН альфа-2b (метиониновая, безметиониновая формы).

Цель работы состояла в проведении исследований по теоретическому обоснованию выбора субстанции интерферона альфа-2b для аттестации в качестве стандартного образца для оценки подлинности методом пептидного картирования.

В настоящее время в России субстанции рекомбинантного ИФН альфа-2b (четыре метиониновых и три безметиониновых формы) производят шесть предприятий (табл. 1).

На основе отечественных субстанций ИФН альфа-2b российские предприятия-производители выпускают ряд препаратов в виде различных лекарственных форм (раствор, гель, капли, суппозитории, мазь, спрей, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и т.д.).

В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи, для подтверждения подлинности используют четыре основных метода:

- 1) определение специфической активности биологическим методом на культуре клеток;
- 2) изоэлектрическое фокусирование;
- 3) электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях;
- 4) пептидное картирование с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [6].

Кроме того, отечественные производители для подтверждения подлинности традиционно используют реакцию нейтрализации противовирусной активности, основанную на способности ИФН альфа-2b инактивироваться анти-альфа-интерфероновыми поликлональными антителами аналогично международному стандартному образцу ИФН альфа-2b.

При изоэлектрическом фокусировании положение основных полос в изоэлектрофореграмме ИФН альфа-2b испытуемого образца должно соответствовать положению основных полос в изоэлектрофореграмме стандартного образца ИФН альфа-2b. Значение изоэлектрической точки белка должно находиться в интервале рН от 5,8 до 6,3.

При проведении электрофореза в ПААГ в восстанавливающих условиях положение основной полосы на электрофореграмме испытуемого образца должно соответствовать положению основной полосы на электрофореграмме раствора СО.

При пептидном картировании с использованием метода ВЭЖХ профиль хроматограммы раствора испытуемого образца ИФН альфа-2b после ферментативного гидролиза трипсином должен принципиально соответствовать профилю хроматограммы раствора СО после ферментативного гидролиза трипсином [6].

Наличие специфических и неспецифических примесей необходимо определять методами ВЭЖХ и электрофореза в ПААГ в восстанавливающих условиях [6].

В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи (ЕФ) [6] в субстанции ИФН альфа-2b необходимо контролировать:

- количество бактериальных эндотоксинов (определяется методом ЛАЛ-теста), которых должно быть не более 100 ЕЗ/мг белка;
- содержание ДНК штамма-продуцента *Escherichia coli* — должно быть не более 2,0 пг на 1,0 мкг белка (определяется методом иммуноферментного анализа с использованием Threshold системы);
- количество белков штамма-продуцента *Escherichia coli* — должно составлять не более 0,2 нг на 1,0 мкг белка (определяется методом иммуноферментного анализа (ИФА)).

Только после проведения всех испытаний субстанция ИФН альфа-2b может быть признана соответствующей требуемым параметрам качества, а значит эффективной и безопасной.

Согласно требованиям ЕФ для подтверждения подлинности, чистоты, определения специфических и неспецифических примесей интерферона альфа-2b в качестве стандартного образца возможно использование референтного образца Chemical Reference Substances (CRS) интерферона альфа-2b (CRS I0320301) Европейского директората по качеству лекарственных средств (The European Directorate for the Quality of Medicines) [6]. Данный стандартный образец представляет собой безметиониновую форму ИФН альфа-2b и, при необходимости, может быть использован для оценки качества как метиониновой, так и безметиониновой форм по всем физико-химическим показателям. Однако в случае применения метода пептидного картирования для оценки подлинности метиониновой формы ИФН альфа-2b, использование указанного СО не может быть рекомендовано, поскольку пептидные карты метиониновой и безметиониновой форм различаются в силу структурных различий данных белков [8, 9].

Таким образом, для оценки подлинности метиониновой формы ИФН альфа-2b методом пептидного картирования необходимо наличие соответствующего стандартного образца, а его разработка и аттестация являются актуальной задачей [10, 11].

Для аттестации стандартного образца ИФН альфа-2b необходимо было выбрать субстанцию — кандидат в СО. Данная субстанция должна быть метиониновой, производитель должен наиболее полно оценивать качество субстанции, а также использовать подходящий СО.

Сравнительный анализ подходов к оценке качества субстанций ИФН альфа-2b разных производителей представлен в таблице 2.

Как следует из данных, представленных в таблице 2, все отечественные производители достаточно полно ха-

Таблица 1. Перечень отечественных субстанций ИФН альфа-2b

Производитель	Субстанция
1	Интерферон альфа-2b (безметиониновая форма)
2	Интерферон альфа-2b (метиониновая форма)
3	Интерферон альфа-2b (метиониновая форма) Интерферон альфа-2b (безметиониновая форма)
4	Интерферон альфа-2b (метиониновая форма)
5	Интерферон альфа-2b (безметиониновая форма)
6	Интерферон альфа-2b (метиониновая форма)

Таблица 2. Показатели качества, характеризующие качество субстанций ИФН альфа-2b отечественных производителей

№ п/п	Показатель качества	Производитель 1	Производитель 2	Производитель 3		Производитель 4	Производитель 5	Производитель 6
		Безметиониновая форма	Метиониновая форма	Метиониновая форма	Безметиониновая форма	Метиониновая форма	Безметиониновая форма	Метиониновая форма
1.	Подлинность							
	Реакция нейтрализации биологической активности	+	+	+	+	+	+	+
	Пептидное картирование (ВЭЖХ) и используемый СО	+	+	+	+	+	+	-
	Изоэлектрическое фокусирование	-	+	+	+	-	+	-
	Электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях	+	+	+	+	+	+	+
2.	Количественное определение							
	Специфическая биологическая активность	+	+	+	+	+	+	+
	Содержание белка	+	+	+	+	+	+	+
3.	Чистота. Специфические и неспецифические примеси							
	Электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях	+	+	+	+	+	+	+
	Электрофорез в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях	+	+	+	+	+	+	+
	Метод ВЭЖХ (выявление суммарного количества продуктов деградации: димеров, олигомеров, окисленных форм, высокомолекулярных соединений и т.д.)	+	+	+	+	+	+	+
	Остаточная ДНК штамма-производителя	+	+	+	+	+	+	+
	Остаточные белки штамма-производителя	+	+	+	+	+	+	+
	Бактериальные эндотоксины	+	+	+	+	+	+	-

рактически характеризуют качество выпускаемых субстанций. Пять производителей для подтверждения подлинности наряду с другими методами применяют метод пептидного картирования. Однако применение в качестве СО субстанции Interferon alpha-2b CRS, рекомендованной EDQM, оправдано только в случае оценки качества субстанций производителя 1, 3 и 5 (безметиониновые формы). Таким образом, только производитель 3 для оценки подлинности методом пептидного картирования использует субстанцию аналогичной структуры — стандартный образец предприятия (СОП ИФН альфа-2b), что обосновано отсутствием на рынке международного СО метиониновой формы ИФН альфа-2b.

Таким образом, результаты исследований по теоретическому обоснованию выбора субстанций интерферона альфа-2b в качестве кандидата в СО для оценки подлинности метионинового рекомбинантного ИФН альфа-2b методом пептидного картирования показали, что произво-

дители субстанции для определения ее подлинности используют различные методы оценки качества. На начальном этапе разработки порядка аттестации СО оценки подлинности метионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b методом пептидного картирования в качестве кандидата целесообразно рассматривать субстанцию производителя 3, так как данная субстанция наиболее полно охарактеризована по показателю качества «Подлинность».

Экспериментальные результаты аттестации в качестве СО выбранной субстанции метиониновой формы ИФН альфа-2b будут приведены в последующих публикациях.

Литература

1. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Федеральный закон от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

3. Постановление Правительства Российской Федерации от 02.11.2009 № 884 «Положение о Государственной службе стандартных образцов состава и свойств веществ и материалов».
4. Осинцева ЕВ, Медведевских СВ, Кремлева ОН. и др. Мировые тенденции в области стандартных образцов и концепция развития государственной службы стандартных образцов. *Стандартные образцы 2014*; (1): 6–26.
5. ISO Guide 32:1997. *Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials*.
6. European Pharmacopoeia. 8th ed. EDQM; 2014 [cited 2015 March 14]. Available from: <http://online.edqm.eu/entry.htm>.
7. Ben-Bassat A, Bauer K. Amino-terminal processing of proteins. *Nature* 1987; (326): 315.
8. Стратонова НВ, Леонов ВС, Литвинова НА. Разработка промышленного способа культивирования штамма-продуцента гибридного белка-предшественника безметионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b. *Ветеринарная медицина 2012*; (12): 22–3.
9. Гайдерова ЛА, Никитина ТН, Фадейкина ОВ, Байкова МЛ, Устинникова ОБ, Климов ВИ, Шведов ДВ. Аттестация отраслевого стандартного образца активности лейкоцитарного интерферона альфа типа. *Биопрепараты 2014*; (2): 31–6.
10. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Климов ВИ, Шемерянкина ТБ, Яшкир ВА, Бармин АВ. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций. *Химико-фармацевтический журнал 2015*; **49**(11): 54–6.
11. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Волкова РА, Климов ВИ, Шемерянкина ТБ, Яшкир ВА. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал 2016*; **50**(4): 40–3.

Об авторах

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

Устинникова Ольга Борисовна. Начальник лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Рунова Ольга Борисовна. Ведущий эксперт лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. хим. наук.

Голощапова Евгения Олеговна. Эксперт 2-й категории лаборатории биохимии МИБП Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Корсун Лилия Владимировна. Начальник отдела редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации НИР, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Устинникова Ольга Борисовна; Ustinnikova@expmed.ru

Theoretical rationale for the choice of interferon alfa-2b substance to be certified as a reference standard for identification test by peptide mapping

O. B. Ustinnikova, O. B. Runova, E. O. Goloschapova, L. V. Korsun

Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The article provides with the results of theoretical research on justification of the choice of methionine form of recombinant interferon alfa-2b substance to be certified as a reference standard for identification test by peptide mapping. At present non- methionine and methionine forms of interferon alfa-2b substance are produced in Russia. The reference standard of interferon alfa-2b CRS I0320301, recommended by the European Pharmacopoeia, is a non- methionine standard and is suitable for identification test by peptide mapping only for a non- methionine form of a protein. In order to choose the reference standard candidate for methionine form of interferon alfa-2b, the article provides with the comparative analysis of the range of criteria and methods used by domestic manufacturers to confirm the quality of substances, authorized in the Russian Federation. The theoretical research allowed to choose interferon alfa-2b substance as a reference standard candidate for identification test by peptide mapping.

Key words: reference standard; methionine recombinant interferon alpha-2b substance; peptide mapping; HPLC.

For citation: Ustinnikova OB, Runova OB, Goloschapova EO, Korsun LV. Theoretical rationale for the choice of interferon alfa-2b substance to be certified as a reference standard for identification test by peptide mapping. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (3): 161–165.

References

1. Federal Law of 12.04.2010 № 61-FZ «On Circulation of Medicines» (in Russian).
2. Federal Law of 26.06.2008 № 02-FZ «On ensuring the uniformity of measurements» (in Russian).
3. Russian Federation Government Resolution of 02.11.2009 № 884 «Regulations on the State service of reference materials of composition and properties of substances and materials» (in Russian).
4. Osintseva EV, Medvedevskih SV, Kremleva ON, et al. Global trends in the area of reference materials and the concept of the development of state service of reference materials (Part I). *Standard samples 2014*; (1): 6–26 (in Russian).
5. ISO Guide 32:1997. *Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials*.
6. European Pharmacopoeia. 8th ed. EDQM; 2014 [cited 2015 March 14]. Available from: <http://online.edqm.eu/entry.htm>.
7. Ben-Bassat A, Bauer K. Amino-terminal processing of proteins. *Nature* 1987; (326): 315.

8. Stratonova NV, Leonov VS, Litvinova NA. Development of industrial fermentation of strain producing of hybrid precursor protein recombinant interferon alpha-2b without the N-terminal methionine. *Veterinary medicine* 2012; (12): 22–3 (in Russian).
9. Gaiderova LA, Nikitina TN, Fadeikina OV, Baikova ML, Ustinnikova OB, Klimov VI, Shvedov DV. Evaluation of branch reference standard of leucocyte interferon alpha activity. *Biopreparaty* 2014; (2): 31–6 (in Russian).
10. Merkulov VA, Sakanyan EI, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA, Barmin AB. Modern Approaches to Development of Reference Substances for Evaluation of the Quality of Pharmaceuticals. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 2015; **49**(11): 54–6 (in Russian).
11. Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. Pharmacopoeial Reference Samples and Practice of Their Use in the National System of Standardization of Medical Products. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* 2016; **50**(4): 40–3 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Ustinnikova OB. Head of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Runova OB. Leading expert of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Candidate of Chemical Sciences.

Goloschapova EO. 2nd professional category expert of Laboratory of Biochemistry of medical immunobiological preparations of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Korsun LV. Head of Department of publishing activity and intellectual property protection of Center of planning and coordination of scientific research. Candidate of Biological Sciences.