

РАЗРАБОТКА ПОРЯДКА АТТЕСТАЦИИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА РЕКОМБИНАНТНОГО АКТИВИРОВАННОГО ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VII ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ МЕТОДОМ ПЕПТИДНОГО КАРТИРОВАНИЯ

The development of industry standard sample qualification procedure of recombinant activated blood clotting factor VII for proving of identity by peptide mapping method

Шведова Е. В.¹, Устинникова О. Б.¹, Рунова О. Б.¹, Волкова Р. А.¹,
Бондарев В. П.¹, Смолов М. А.², Шукуров Р. Р.², Вишневский А. Ю.²

¹ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ООО «Международный биотехнологический центр „Генериум“», Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, Российская Федерация

Shvedova E. V.¹, Ustinnikova O. B.¹, Rounova O. B.¹, Volkova R. A.¹,
Bondarev V. P.¹, Smolov M. A.², Shukurov R. R.², Vishnevskiy A. Yu.²

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation

² International Biotechnology Center «Generium», Vladimirskaya oblast, Petushinskiy district, Volginskiy settlement, Russian Federation

РЕЗЮМЕ

Введение. Использование европейского стандартного образца с подтвержденной структурой CRS Human coagulation factor в качестве образца сравнения позволяет подтвердить подлинность первичной структуры вновь производимой серии рекомбинантного белка. Ввиду высокой коммерческой стоимости европейского образца, а также с целью обеспечения независимости отечественного продукта от зарубежного референсного образца производители традиционно используют производственный стандартный образец (СО). Нормативные требования к порядку аттестации СО и полноте его характеристики отсутствуют.

Материалы и методы. В качестве кандидата в СО была выбрана серия препарата рекомбинантного активированного фактора свертывания крови VII (rFVIIa) (Эптакога альфа) «Коагил VII». В ходе анализа применена схема оптимизированного протеолиза с предварительным дегликозилированием молекулы. В качестве референсной аминокислотной последовательности использована последовательность рекомбинантного фактора свертывания VII (rFVII), приведенная в монографии 01/2015:2534 Европейской Фармако-

ABSTRACT

Introduction. The use of European reference standard with the known structure (CRS Human coagulation factor) as a reference allows to confirm identity of the primary structure of new batches of the recombinant protein. Manufacturers normally use an industry standard sample due to the high cost of the European reference standard and to make sure that national samples are independent from the international reference standards. Regulatory requirements for the qualification procedure of an industry standard sample are absent.

Materials and methods. Batch of recombinant activated clotting factor VII (rFVIIa) (Eptacog alpha) («Koagil») was selected as a candidate material. The method of strong hydrolysis with the initial deglycosylation of the molecule was used. Amino acid sequence of rFVIIa, described in the monograph 01/2015:2534 of European Pharmacopoeia (Ed. 9.0) was used as a reference. Peptide mapping and mass-spectrometric assay were used in the study.

Results. Qualification procedure of industry standard sample of rFVIIa was developed. The standard sample was used for the proof of identity of rFVIIa by RP-HPLC peptide mapping. Qualification procedure of an industry standard

пеи (издание 9.0). Исследование проводилось с применением методов пептидного картирования и масс-спектрометрического анализа.

Результаты. Разработан порядок аттестации производственного СО rFVIIa. Образец предназначен для подтверждения подлинности rFVIIa методом пептидного картирования с последующим детектированием результатов методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Представленный порядок аттестации производственного СО rFVIIa позволяет получить полностью охарактеризованный образец сравнения с подтвержденной первичной структурой. Применение данного СО гарантирует достоверную оценку подлинности методом пептидного картирования вновь производимого rFVIIa, как при наличии европейского образца CRS, так и при его отсутствии.

Заключение. Исследование позволило подтвердить аминокислотную последовательность тяжелой и легкой цепей rFVIIa. Для кандидата в СО, в сравнении с образцом CRS и оригинальным препаратом «НовоСэвен», получена характерная пептидная карта и обоснован выбор опорных пиков.

Ключевые слова: Эптаког альфа; rFVIIa; порядок аттестации; подлинность; пептидное картирование; масс-спектрометрический анализ; реперные пики

Для цитирования: Шведова Е. В., Устинникова О. Б., Рунова О. Б., Волкова Р. А., Бондарев В. П., Смолов М. А., Шукуров Р. Р., Вишнеvский А. Ю. Разработка порядка аттестации стандартного образца рекомбинантного активированного фактора свертывания крови VII для подтверждения подлинности методом пептидного картирования, включающего масс-спектрометрическое исследование первичной структуры. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(4): 334–342 doi: 10.25837/HAT.2019.68.74.002

Для корреспонденции: Шведова Евгения Владимировна, эксперт лаборатории биохимии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения России, 127051, г. Москва, Российская Федерация. Электронная почта: novikovaev@expmed.ru

Финансирование: Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы Смолов М. А., Шукуров Р. Р., Вишнеvский А. Ю. являются сотрудниками ООО «Международный биотехнологический центр „Генериум“».

Поступила 16.05.2018

Принята к печати 24.12.2018

sample of rFVIIa allows to obtain fully characterized reference sample with the established structure. The use of this standard sample guarantees accurate assessment of the identification by peptide mapping of the new batches of rFVIIa with or without European reference standard.

Conclusion. Peptide mapping and mass-spectrometric assay allows us to confirm amino acid sequence of light and heavy chains of rFVIIa with 100 % coverage. The peptide map was established for the candidate material in comparison with the original drug NovoSeven and the selection of characteristic peaks was justified. These peaks were characterized by stability and symmetry factors. Amino acid sequence of peptides corresponding to the reference peaks and their primary localization in the molecule were established by the use of tandem mass-spectrometry.

Keywords: Eptacog alfa; rFVIIa; qualification procedure; proof of identity; RP-HPLC peptide mapping; mass-spectrometric assay; characteristic peaks

For citation: Shvedova E. V., Ustinnikova O. B., Rounova O. B., Volkova R. A., Bondarev V. P., Smolov M. A., Shukurov R. R., Vishnevskiy A. Yu. The development of industry standard sample qualification procedure of recombinant activated blood clotting factor VII for the proving of identity by peptide mapping method, including mass-spectrometric determination of the primary structure. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i Transfuziologiya). 2018; 63(4): 334–342 (in Russian).

doi: 10.25837/HAT.2019.68.74.002

For correspondence: Shvedova E. V., expert of laboratory of biochemistry, 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.

Information about authors:

Shvedova E. V.; <https://orcid.org/0000-0002-9229-3677>
Ustinnikova O. B.; <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>
Rounova O. B.; <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>
Volkova R. A.; <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Bondarev V. P.; <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>
Smolov M. A.; <https://orcid.org/0000-0003-2935-7655>
Shukurov R. R.; <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
Vishnevskiy A. Yu.; <https://orcid.org/0000-0002-7865-9361>

Financial disclosure. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors Smolov M. A., Shukurov R. R., Vishnevskiy A. Yu. are the employees of the International Biotechnology Center «Generium».

Received 16 May 2018

Accepted 24 Dec 2018

Введение

Рекомбинантный активированный фактор свертывания крови VII (rFVIIa) (международное непатентованное название – Эптаког альфа [активированный])

представляет собой сложный двухцепочечный гликозилированный белок с молекулярной массой около 50 кДа, получаемый с помощью технологии рекомби-

нантной ДНК и обладающий коагуляционной активностью фактора свертывания крови VII, выделяемого из плазмы крови человека [1]. В фармакологических дозах Эптаког альфа без участия тканевого фактора переводит фактор свертывания крови X в активную форму Xa на поверхности активированных тромбоцитов в зоне повреждения, что в свою очередь инициирует механизм образования тромбина из протромбина. Таким образом, фармакодинамический эффект Эптакога альфа заключается в усиленном местном образовании фактора свертывания крови Xa с последующим ускорением каскада ферментативных реакций свертывающей системы крови [2].

Кальцийзависимая активация рекомбинантного белка происходит в результате внутримолекулярного расщепления связи Arg 152 и Ile 153 с образованием легкой (около 20 кД) и тяжелой (около 30 кД) цепей, соединенных дисульфидной связью, и осуществляется после всех стадий выделения и очистки целевого белка от компонентов, присутствующих в составе культуральной жидкости.

Аминокислотная последовательность и посттрансляционные модификации Эптакога альфа известны и подробно изложены в Европейской Фармакопее (ЕФ) [1].

Согласно современным международным и отечественным регуляторным требованиям, основным критерием эффективности и безопасности лекарственного средства, полученного с применением технологии рекомбинантной ДНК, является подтверждение подлинности очищенного белка, основанное на изучении биологической активности и структуры белковой молекулы в сравнении со стандартным образцом [3,4,5].

Классическим методом подтверждения первичной структуры белка является пептидное картирование, подразумевающее анализ продуктов ферментативного гидролиза с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод предполагает использование стандартного образца сравнения при оценке качества каждой вновь производимой серии субстанции. Данный подход позволяет подтвердить первичную последовательность белка, обнаружить наличие изменений в структуре, оценить устойчивость технологического процесса и генетическую стабильность [6]. Условием соответствия анализируемого белка заявленной структуре является принципиальное совпадение пептидных карт испытуемого и стандартного образцов (СО), а также наличие на хроматограммах испытуемого и стандартного образцов опорных (характеристических) пиков, совпадающих по времени удерживания. Согласно ЕФ физико-химические показатели качества rFVIIa, подтверждающие подлинность рекомбинантного белка, оценивают в сравнении с европейским образцом CRS Human coagulation factor (rDNA) [1]. Отечественный СО для оценки подлинности препаратов rFVIIa методом пептидного картирования отсутствует.

Поскольку коммерческая стоимость образца CRS достаточно высока, а зависимость отечественного продукта от зарубежного референсного образца нежелательна, производители традиционно используют производственный стандартный образец для проведения рутинного анализа подтверждения подлинности очередной серии рекомбинантного белка, в том числе методом пептидного картирования. В качестве производственного стандартного образца, как правило, используют серию субстанции или готового лекарственного препарата (при отсутствии в его составе мешающих веществ).

В настоящее время нормативные международные и отечественные документы содержат общие требования к процедуре аттестации СО и не отражают специфику биологических лекарственных средств, которая требует индивидуального подхода, зависящего от природы биологического объекта, в том числе порядок аттестации СО для оценки подлинности рекомбинантных белков [7-13].

Цель работы – стандартизация метода пептидного картирования, применяемого для подтверждения подлинности rFVIIa, состоящая в разработке порядка аттестации производственного СО, с учетом структурных особенностей данного белка, и установлению аттестованной характеристики СО в конкретных методических условиях.

Материалы и методы

- метод пептидного картирования с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ): хроматограф Nexera X2 с детектором SPD M-30A (Shimadzu) и масс-детектором 6500 iFunnel QTOF LC/MS (Agilent Technologies);

- метод оптимизированного протеолиза: испытуемый образец в количестве 500 мкг помещают в устройство для ультрафильтрации, добавляют денатурирующий буфер (8М мочевины, 4мМ ЭДТА, 0.36М Трис-HCl, 8.6рН) и проводят ультрафильтрацию в течение 10 минут. Процедуру повторяют трижды. По окончании объем доводят до 0,5 мл. Затем к образцу добавляют 5 мкл 1 М раствора дитиотреита и инкубируют при 50 °С в течение 1 ч. После этого охлаждают пробирку до комнатной температуры и вносят 5 мкл 2,5 М раствора йодуксусной кислоты, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в темноте на 1 ч. Полученный раствор помещают в ультрафильтрационную пробирку, прибавляют 50 мМ бикарбонат аммония до метки и центрифугируют при 13400 об/мин в течение 10 мин. Процедуру повторяют четыре раза. После окончания центрифугирования супернатант переносят в пробирку вместимостью до 1,5 мл, доводят его объем 50 мМ бикарбонатом аммония до 500 мкл и добавляют 10 ед пептид-N-гликозидазы F в 5 мкл воды. Инкубируют при 37 °С в течение

16 ч. Затем к раствору добавляют 5 мкл раствора высокоочищенного трипсина. Инкубируют смесь при 38 °C в течение 6 ч. Реакцию останавливают добавлением 2 мкл трифторуксусной кислоты;

- колонка Acquity UPLC peptide BEH C18, 130 Å, 2,1 × 100 мм, 1,7 мкм, кат. № 02513608316819 (Waters);

- программное обеспечение MassHunterQualitativeAnalysis в. В.07.00 SP2 с модулем BioConfirm В.08.00 (Agilent Technologies);

- исследуемый образец – кандидат в СО: препарат «Коагил-VII» производства АО «Генериум», Россия, серия 050614, дозировка 1,2 мг;

- стандартный образец EDQM Human coagulation factor VIIa (rDNA) CRS (1,37 мг/0,8 мл), Y0001663;

- препарат РФСК VIIa «НовоСэвен» производства компании «Ново Нордиск А/С», Дания, серия DU60473, дозировка 1 мг;

- трипсин бычий производства Sigma-Aldrich, кат. № T1426, серия SLB F1700V;

- трипсин бычий высокоочищенный производства Promega, кат. № V511A, серия 0000143194.

Результаты

В результате исследования была достоверно подтверждена полная аминокислотная последовательность rFVIIa (рис. 1). Таким образом, была показана пригодность выбранной схемы оптимизированного протеолиза с применением высокоочищенного трипсина

для полного подтверждения аминокислотной последовательности кандидата в СО.

Для установления аттестованной характеристики были проведены испытания образцов — CRS, испытуемого (кандидата в СО) и препарата НовоСэвен (в трех повторях каждый) (рис. 2) методом, описанным в ЕФ [1].

Как следует из рис. 2, пептидные карты всех образцов имеют сходные профили, совпадают по основным пикам и не имеют принципиальных расхождений в части минорных пиков.

На всех хроматограммах можно выделить три отдельные области: до 20 мин, 20–27,5 мин и больше 27,5 мин. Первая и третья области содержат хорошо разрешенные пики, в то время как в средней части наблюдается их сильное перекрытие. При хромато-масс-спектрометрическом изучении состава пептидных гидролизатов (рис. 3) было установлено, что в области от 27,5 мин все основные пики соответствуют пептидным конъюгатам, содержащим внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи. То есть для данных пиков невозможно установить соответствие отдельным пептидным фрагментам, образованным в результате расщепления молекул rFVIIa трипсином. Кроме того, наблюдаемые в этой области пептидные конъюгаты демонстрируют более широкие пики по сравнению с областью до 20 мин. Поэтому далее в качестве потенциальных опорных рассматривались пики в интервале с 10 до 20 мин, как наиболее разрешенной

Рисунок 1. Карта аминокислотной последовательности испытуемого образца. Подтвержденные участки выделены зеленым цветом. Заливкой обозначены области, охарактеризованные дополнительно тандемными масс-спектрами. LC — легкая цепь; HC — тяжелая цепь.

Figure 1. Map of the amino acid sequence of the candidate material sample. Confirmed areas are highlighted in green. The areas characterized by additional tandem mass-spectrometric assay are indicated by the fill. LC — light chain; HC — heavy chain.

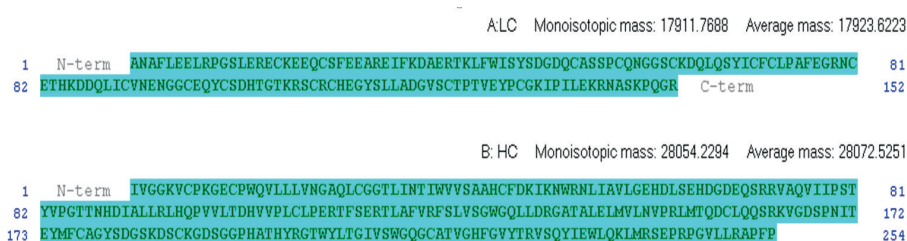
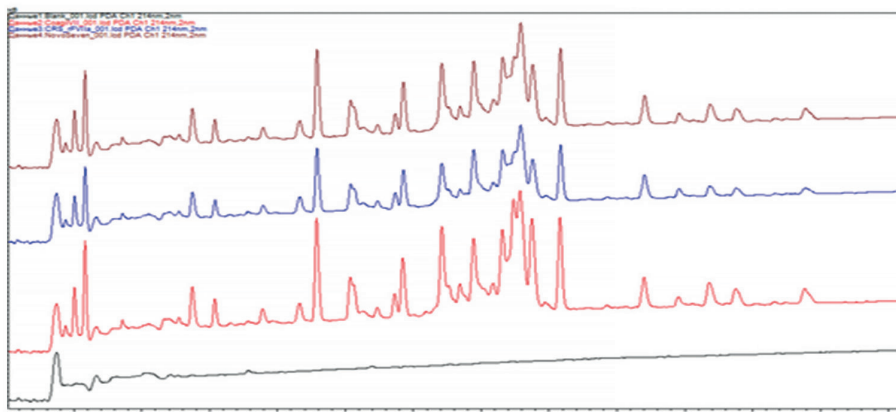


Рисунок 2. Типичная сводная хроматограмма пептидного картирования. Черная линия — плацебо, красная линия — испытуемый образец (кандидат в СО), синяя линия — образец CRS rFVIIa, коричневая линия — «НовоСэвен».

Figure 2. Summary of the typical chromatogram of peptide mapping. The black line is placebo; the red line is Candidate material (test sample), blue line — sample standard CRS rFVIIa, brown line — NovoSeven.



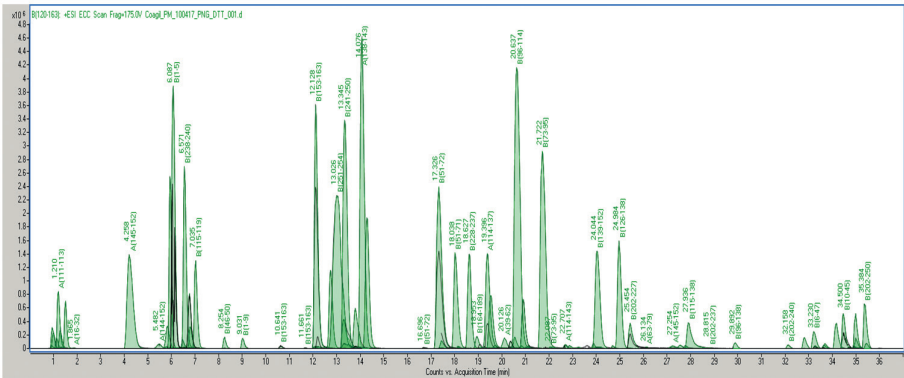


Рисунок 3. Хроматограмма выделенных токов компонентных ионов испытуемого образца, идентифицированных в порядке принадлежности пептидным фрагментам rFVIIa.
Figure 3. Chromatogram of isolated currents of component ions of the candidate material (test sample) identified in the order of belonging to peptide fragments of rFVIIa.

области пептидной карты. В качестве наиболее интенсивных были выбраны пики с временами удерживания около 10; 10,4; 14,3; 15,1; 19 мин. В результате трех экспериментов, проводимых в условиях воспроизводимости [ГОСТ Р ИСО 5725], для указанных пиков был проведен анализ следующих хроматографических параметров [6, 15, 16]:

- стабильность удерживания пика по времени выхода (RSD не более 2 %);
- стабильность удерживания пика по площади (RSD не более 2 %);
- фактор симметрии пика (не более 1,5) (табл. 1).

Из представленных в табл. 1 данных следует, что установленным критериям соответствовали три наиболее стабильных пика с временами удерживания 14,3, 15,1 и 19 мин.

Представленные на рис. 4 и 5 данные показывают, как соотносятся между собой хроматограммы ультрафиолетового (УФ) поглощения и выделенные токи ком-

понентных ионов продуктов расщепления трипсином кандидата в СО. Видно, что каждый из трех отобранных пиков соответствует либо простому пептиду, либо их смеси, т. е. имеет известный и определяемый состав. Также среди этих пептидов отсутствуют пропущенные сайты протеолиза, что говорит о полноте и специфичности расщепления. Кроме того, выбранные пики соответствуют пептидам, содержащим участки последовательностей для обеих цепей белка.

Три пика (около 14,3, 15,1 и 19 мин) на хроматограмме гидролизата кандидата в СО соответствуют всем обозначенным требованиям. При этом пик около 19 мин обладает наибольшей интенсивностью и может рассматриваться в качестве основного пика, охарактеризованного по абсолютному времени удерживания.

Хроматограммы, полученные в результате шести экспериментов по пептидному картированию кандидата в СО, проведенные в условиях воспроизводи-

Таблица 1. Оценка стабильности предполагаемых опорных пиков
Table 1. Evaluation of stability of probable reference peaks

Критерий (среднее значение при n = 3) Criterion (mean value at n = 3)	Образец CRS CRS standard					Образец кандидат в СО Candidate material				
	Время удерживания пика, мин The retention time of the peak, min									
	10	10,4	14,3	15,1	19	10	10,4	14,3	15,1	19
RSD по времени, % RSD at the time, %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
RSD по площади, % RSD by area, %	3,1	5,2	2,1	1,3	1,3	1,1	3,8	1,8	0,6	0,7
Фактор симметрии Symmetry factor	1,55	1,06	1,1	1,06	1,4	1,9	1,06	1,19	1,06	1,1
Соответствует, да/нет Answer, yes/no	Нет No	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Нет No	Нет No	Да Yes	Да Yes	Да Yes

RSD — относительное стандартное отклонение.
RSD — relative standard deviation.

Рисунок 4. Хроматограмма выделенных токов компонентных ионов испытуемого препарата, идентифицированных в порядке принадлежности пептидным фрагментам rFVIIa после обработки трипсином. Одновременно наложена хроматограмма УФ-поглощения.

Figure 4. Chromatogram of selected currents of the component ions of Candidate material (test sample) identified in order of belonging to peptide fragments of rFVIIa after treatment with trypsin. At the same time imposed chromatogram of UV-absorption.

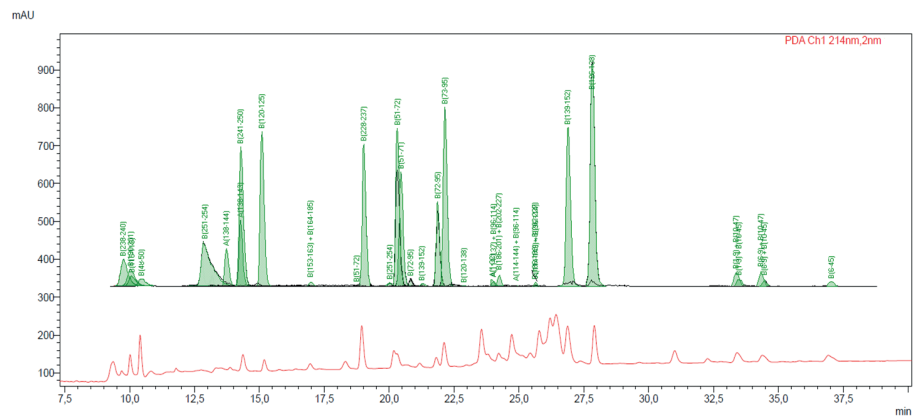


Рисунок 5. Типичные данные структурного анализа.

Figure 5. Typical structural analysis data.

Время удерж., мин	Положение	Модифицированные участки	Мол. масса, Да	Разница теор. и изм. масс, ppm	Площадь пика	Площадь пика, %	Аминокислотная последовательность	Пропущенные сайты протеолиза
5,67	B(238-240)		418,24	2,1	1666961	2,6%	LVR	0
5,69	B(190-201)		1253,56	1,8	1086540	1,7%	GDGGGPHATHYR	0
10,02	B(115-119)		638,30	-0,2	590111	0,9%	TFSEK	0
10,40	B(48-50)		474,23	1,5	441209	0,7%	NVPR	0
10,16	B(46-50)		715,41	0,3	15068	0,0%	IKNWR	1
12,96	B(251-254)		430,22	-0,5	4080642	6,4%	APFP	0
13,79	A(138-144)		867,55	0,8	1379090	2,2%	IPLEKR	1
14,32	A(138-143)		711,45	0,6	2152062	3,4%	IPLEK	0
14,34	B(241-250)		1122,65	1,6	5214442	8,2%	SEPRPGVLLR	0
15,14	B(120-125)		705,42	0,6	5198331	8,2%	TLAFVR	0
17,02	B(153-163) + B(164-185)	A2F(B170); Cysteine disulfide bond(B158-B177)	6038,46	-0,7	152312	0,2%	LMTQDCLQDSR + KYGDSNITEYMFCAYSQSGSK	0 + 1
18,80	B(51-72)		2489,19	0,4	43323	0,1%	NIUAVLGEHDLSEHDGDEQSR	1
19,06	B(228-237)		1292,68	1,7	4767214	7,5%	VSQVIEWLQK	0
20,05	B(251-254)		430,22	-8,6	136978	0,2%	APFP	0
20,35	B(51-72)		2489,19	1,5	5449278	8,6%	NIUAVLGEHDLSEHDGDEQSR	1
20,49	B(51-71)		2333,09	1,0	3950300	6,2%	NIUAVLGEHDLSEHDGDEQSR	0
20,86	B(72-95)		2633,46	-0,4	216564	0,3%	RVAQVPIPTSTYVPGTTNHDIALLR	1
21,29	B(139-152)	1*Oxidation (M)(+15.994915)B146	1498,82	-0,8	104766	0,2%	GATALEMLVNLVPR	0
21,90	B(72-95)		2633,47	0,6	2757991	4,3%	RVAQVPIPTSTYVPGTTNHDIALLR	1
22,18	B(73-95)		2477,37	1,1	6235618	9,8%	VAQVPIPTSTYVPGTTNHDIALLR	0
22,91	B(126-138)		2164,17	-4,8	34071	0,1%	TLAFVRFSLVSGWGQLDLR	1
23,99	A(1-32)	Gamma-carboxylation(A14); Gamma-cysteine disulfide bond(A114-A127); Cysteine disulfide bond(A135-B110)	4180,69	0,2	391512	0,6%	ANAFLEELRPGSLERCKEEQCSFEAREIFK	3
24,05	A(114-137) + B(96-114)		4688,26	0,7	192489	0,3%	CHEGYSLLADGVSTCTPTVEYPCGK + LHQPVLTDHVVPLD	0 + 0
24,25	B(186-201) + B(202-227)	Cysteine disulfide bond(B188-B216); Cysteine disulfide bond(A114-A127); Cysteine disulfide bond(A135-B110)	4500,05	-0,3	364845	0,6%	DSCKGDSGGPHATHYR + GTWYLTGVSWGQCGATGVH	1 + 0
24,90	A(114-144) + B(96-114)		5537,81	1,7	23069	0,0%	CHEGYSLLADGVSTCTPTVEYPCGKIPLEK + LHQPVLTDH	2 + 0
25,64	B(186-189) + B(202-227)	Cysteine disulfide bond(B188-B216); Cysteine disulfide bond(A114-A127); Cysteine disulfide bond(A135-B110)	3264,50	-2,7	51543	0,1%	DSCK + GTWYLTGVSWGQCGATGVHFGVYTR	0 + 0
25,65	A(114-143) + B(96-114)		5381,69	-1,3	105517	0,2%	CHEGYSLLADGVSTCTPTVEYPCGKIPLEK + LHQPVLTDH	1 + 0
26,90	B(139-152)		1482,82	0,9	6174660	9,7%	GATALEMLVNLVPR	0
27,82	B(126-138)		1476,77	-0,6	8708507	13,7%	FSLVSGWGQLDLR	0
33,35	B(1-9) + B(10-47)	Cysteine disulfide bond(B7-B12); Cysteine disulfide bond(B26-B42)	4991,60	-0,5	645899	1,0%	IVGGKVCCK + GECPWQVLLVNGAQLCGGTUNTWVVS	1 + 1
34,47	B(1-9) + B(10-45)	Cysteine disulfide bond(B7-B12); Cysteine disulfide bond(B26-B42)	4750,42	-0,7	317468	0,5%	IVGGKVCCK + GECPWQVLLVNGAQLCGGTUNTWVVS	1 + 0
34,29	B(6-9) + B(10-47)	Cysteine disulfide bond(B7-B12); Cysteine disulfide bond(B26-B42)	4537,32	0,3	577495	0,9%	VCCK + GECPWQVLLVNGAQLCGGTUNTWVVSAAHC	0 + 1
34,44	B(6-9) + B(10-45)	Cysteine disulfide bond(B7-B12); Cysteine disulfide bond(B26-B42)	4296,13	-1,3	237140	0,4%	VCCK + GECPWQVLLVNGAQLCGGTUNTWVVSAAHC	0 + 0
37,00	B(6-45)	Cysteine disulfide bond(B7-B12)	4278,12	-0,3	260130	0,4%	VCCKGECPWQVLLVNGAQLCGGTUNTWVVSAAHCFE	1

Рисунок 6. Хроматографические профили. Характерные пептидные пики — a, b и c — приведены на верхней хроматограмме.

Figure 6. Chromatographic profiles. Characteristic peptide peaks — a, b and c — are shown on the upper chromatogram.

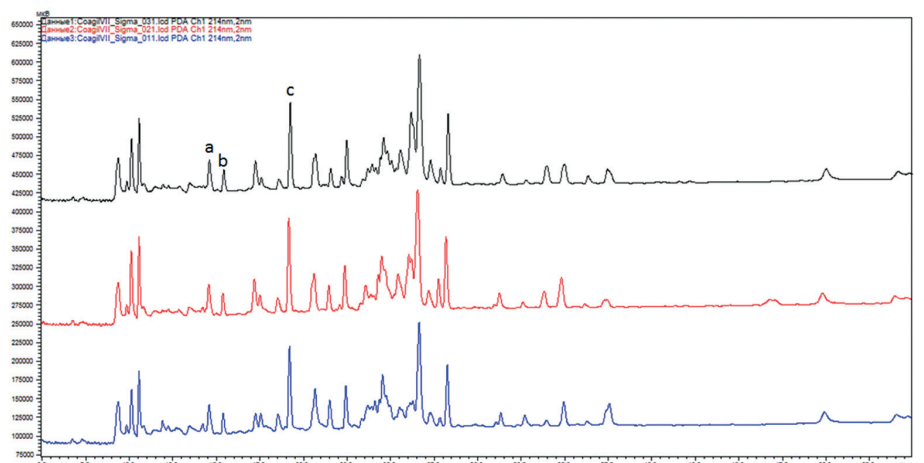


Таблица 2. Диапазоны абсолютного и относительного времен удерживания опорных пиков
Table 2. Ranges of absolute and relative retention times of reference peaks

Пик Peak	Диапазон абсолютного времени удерживания, мин The range of absolute retention time, min	Диапазон относительного времени удерживания, мин The range of relative retention time, min
a	14,4–15,5	0,68–0,75
b	15,7–16,7	0,73–0,82
c	19,15–22,8	—

сти, имели одинаковый профиль, а соответствующие времена удерживания опорных пиков совпадали между собой (рис. 6). На основании этих данных были рассчитаны диапазоны абсолютного и относительного времен удерживания опорных пиков, как среднее арифметическое (при $n = 6$) ± 2 СКО (табл. 2). Видно, что наблюдаемый разброс времен удерживания пиков a, b и c лежит в допустимых пределах ($<10\%$).

Было выявлено практически полное (без восьми АК) покрытие последовательности тяжелой цепи rFVIIa и около 40% легкой цепи молекулы (рис. 7), что суммарно составило 76,1% от общей последовательности белка.

В результате проведенных исследований разработан следующий порядок аттестации СО, подтверждающий подлинность rFVIIa:

1. Оценка качества кандидата в СО по всем показателям спецификации. Перечень показателей качества, приведенный в спецификации на кандидат в СО, должен соответствовать требованиям монографии ЕФ 01/2015:2534;
2. Подтверждение подлинности структуры молекулы белка с применением протокола пробоподготовки, включающего стадии восстановления, дегликозилирования и последующего трипсинолиза для обеспечения покрытия аминокислотной последовательности не менее, чем на 95%;
3. Получение не менее 3 пептидных карт кандидата в СО в условиях воспроизводимости в сравнении со стандартным образцом CRS rFVIIa;

4. Выбор опорных пиков на основании анализа данных МС-картирования и хроматограммы УФ-поглощения в соответствии с установленными критериями стабильности и разрешения, а также локализации соответствующих пептидов в аминокислотной последовательности.
5. Подтверждение наличия опорных пиков, установленных для белка rFVIIa и соответствующих критериям стабильности и разрешения при воспроизведении методики рутинного анализа.

Обсуждение

В качестве кандидата в производственный СО (далее СО) была выбрана серия лекарственного препарата Коагил VII с дозировкой 1,2 мг. Качество серии было подтверждено по всем показателям спецификации, в том числе по основному показателю, подтверждающему эффективность препарата, – специфической активности методом коагулометрии в сравнении с международным стандартным образцом активности фактора VIIa (2nd International Standard, 2008 NIBSC) [1, 14].

Подтверждение аминокислотной последовательности является независимым доказательством подлинности на уровне первичной структуры белковой молекулы и обеспечивает прослеживаемость к стандартному образцу EDQM CRS. В соответствии с требованиями монографии 2.2.55 «Пептидное картирование» ЕФ 9.0 аминокислотная последовательность белка должна быть подтверждена не менее чем на 95% [6].

С этой целью было проведено испытание по установлению аминокислотных последовательностей легкой и тяжелой цепей молекулы rFVIIa — кандидата в СО. Для чего смесь пептидов, полученная в результате простого триптического расщепления, проведенного по протоколу ЕФ [1], была проанализирована методом хромато-масс-спектрометрии. В качестве референсной была взята аминокислотная последовательность rFVII, приведенная в разделе 01/2015:2534 ЕФ (издание 9.0). Перечень модификаций белка учитывал возможность: дезаминирования глутамина, образования пироглутаминовой кислоты, окисления метионина, N-гликозилирования (145Asn легкой и 170Asn тяжелой цепей), O-гликозилирования (52Ser и 60Ser легкой цепи), гидроксирования 63Asp и гамма-карбокси-



Рисунок 7. Покрытие аминокислотной последовательности. Зеленым цветом выделены подтвержденные участки. Красным цветом выделены модифицированные остатки легкой цепи.
Figure 7. The coating amino acid sequence. Confirmed areas are highlighted in green. Modified light chain residues are highlighted in red.

лирования глутаминовой кислоты (положения 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 35 лёгкой цепи).

Выявлено почти полное покрытие последовательности тяжелой цепи rFVIIa и около 40% легкой цепи молекулы.

Поскольку рассмотренная процедура протеолиза подразумевает обработку интактной молекулы rFVIIa без дополнительной подготовки, внутрицепочечные дисульфидные связи легкой цепи или присутствующие олигосахариды могли послужить препятствием для взаимодействия с активным центром трипсина. Таким образом, рекомендованный ЕФ протокол можно рассматривать только в качестве этапа при рутинном подтверждении подлинности методом пептидного картирования.

Для обеспечения полного покрытия аминокислотной последовательности был рассмотрен метод оптимизированного протеолиза, для чего проводили предварительное восстановление и дегликозилирование белка rFVIIa пептид-N-гликозидазой F и использовали высокочистый трипсин.

При интерпретации хромато-масс-спектрометрических данных помимо описанных выше модификаций были также учтены возможности алкилирования остатков цистеина и дезаминирования 145Asn легкой и 170Asn тяжелой цепей.

Применение СО rFVIIa для пептидного картирования при рутинном контроле выпускаемых серий препарата предполагает воспроизведение аттестованной характеристики СО: характерной пептидной карты с установленными опорными пиками в заданном диапазоне времен удерживания. Соответствующее испытание проводится по методике, используемой при контроле качества готового лекарственного средства или субстанции. Испытание также предполагает использование международного и/или европейского стандартного образца и оригинального препарата (если аттестуется препарат воспроизведенный) [6].

Вместе это позволяет сформировать итоговый перечень опорных пиков пептидной карты кандидата в СО, характеристики которого представлены в табл. 3.

На основании полученных результатов можно установить следующие критерии отбора опорных пиков:

- соответствие пика простому пептиду либо их смеси;
- отсутствие среди пептидов неспецифических продуктов гидролиза;
- наличие подтвержденных участков аминокислотной последовательности для каждой из цепей.

Выбираемое количество опорных пиков достаточно индивидуально и зависит от типа рассматриваемого белка. Нередки ситуации, когда сам отбор представляет собой компромисс между степенью сложности метода и полнотой подтверждения структуры, что принимается во внимание в разделе 2.2.55 монографии [6]. На практике наличие хотя бы двух опорных пиков облегчает оценку эффективности метода пептидного картирования, поскольку позволяет количественно оценивать стадии гидролиза и хроматографического разделения.

Три пика (около 14,3, 15,1 и 19 мин) на хроматограмме гидролизата кандидата в СО соответствуют всем обозначенным требованиям. При этом пик около 19 мин обладает наибольшей интенсивностью и может рассматриваться в качестве основного пика, охарактеризованного по абсолютному времени удерживания.

Видно, что наблюдаемый разброс времен удерживания пиков а, b и с лежит в допустимых пределах (<10%).

Заключение

Представленный порядок аттестации производственного СО rFVIIa позволяет получить полностью охарактеризованный образец сравнения с подтвержденной первичной структурой. Установленная для СО пептидная карта соответствует пептидным картам европейского образца CRS и оригинального препарата «НовоСэвен». Выбор характеристических пиков обоснован экспериментальными данными по стабильности, фактору симметрии и аминокислотной последовательности пептидов. Применение данного СО гарантирует достоверную оценку подлинности методом пептидного картирования вновь производимого rFVIIa как при наличии европейского образца CRS, так и при его отсутствии.

Таблица 3. Перечень опорных пиков
Table 3. List of reference peaks

Опорный пик Reference peak	Положение Position	Пептид Peptide	Время удерживания, мин Retention time, min	Вид пика Type of peak
a	A (138–143) B (241–250)	IPILEK SEPRPGVLLR	Около 15 About 15	Относительный Relative
b	B (120–125)	TLAFVR	Около 16 About 16	Относительный Relative
c	B (228–237)	VSQYIEWLQK	Около 20 About 20	Абсолютный Absolute

Сведения об авторах

Шведова Евгения Владимировна (Shvedova E. V.), эксперт 1-й категории лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, novikovaev@expmed.ru

Устинникова Ольга Борисовна (Ustinnikova O. B.), к. б. н., начальник лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, ustinnikova@expmed.ru

Рунова Ольга Борисовна (Runova O. B.), к. х. н., главный эксперт лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, runova@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна (Volkova R. A.), д. б. н., начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», volkova@expmed.ru

Бондарев Владимир Петрович (Bondarev V. P.), д. м. н., профессор, директор Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, bondarev@exmed.ru

Смолов Максим Александрович (Smolov M. A.), к. х. н., н. с. лаборатории физико-химических методов отдела аналитических методов, ООО «МБЦ Генериум», smolov@ibcgenerium.ru

Шукуров Рахим Рахманкулович (Shukurov R. R.), к. б. н., начальник лаборатории физико-химических методов отдела аналитических методов, ООО «МБЦ Генериум», shukurov@ibcgenerium.ru

Вишневский Александр Юрьевич (Vishnevskiy A. Yu.), к. б. н., начальник отдела аналитических методов, ООО «МБЦ Генериум», vishnevskiy@ibcgenerium.ru

Литература

- Инструкция по применению препарата «Коагил II» производства АО «Генериум», Россия [электронный ресурс]. http://www.generium.ru/upload/preparations/manual/%D0%98%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%9A%D0%BE%D0%B0%D0%B3%D0%B8%D0%BB_VII.pdf (дата обращения: 18.01.18).
- Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК: ОФС.1.7.1.0007.15. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том II [Электронный ресурс]. http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#520 (дата обращения: 09.02.2018).
- Фадеекина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. Химико-фармацевтический журнал. 2017;8:80–6.
- Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Волкова РА, Климов ВИ, Шемерянкина ТБ, Яш-кир ВА. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств. Химико-фармацевтический журнал. 2016;50:258–61.
- Волкова РА, Фадеекина ОВ, Климов ВИ и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. БИОпрепараты. 2016;16:229–36.
- Устинникова ОВ, Новикова ЕВ, Рунова ОВ, Шведов ДВ, Жилыева МВ. Гармонизация требований оценки активности рекомбинантного фактора свертывания крови. Химико-фармацевтический журнал. 2017;51:54–7.

- Хроматография: ОФС.1.2.1.2.0001.15. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том I [Электронный ресурс]. http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#446 (дата обращения: 18.01.18).

Остальные источники см. в References.

References

- Human coagulation factor VIIa (rDNA) concentrated solution 01/2015:2534. Available at: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm> (accessed 05.11.2017).
- Instructions for use of the drug «Coagil VII», Generium, Russia. Available at: http://www.generium.ru/upload/preparations/manual/%D0%98%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%9A%D0%BE%D0%B0%D0%B3%D0%B8%D0%BB_VII.pdf (accessed 18.01.18) (in Russian).
- Russia State Pharmacopoeia XIII. GPM. 1.7.1.0007.15. Drugs obtained by recombinant DNA. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#520 (accessed 09.02.2018) (in Russian).
- Biotechnology-derived articles (1045). Available at: http://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_c1045.html (accessed 09.02.2018).
- ICH Q5B Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of R-DNA Derived Protein Products. International Conference on Harmonisation. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5B/Step4/Q5B_Guideline.pdf (accessed 23.01.2018).
- Peptide mapping 2.2.55. Available at: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm> (accessed 05.11.2017).
- Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. Pharmaceutical Chemistry Journal (Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal). 2017;51:44–50 (in Russian).
- Terms and definitions used in connection with reference material. ISO Guide 30:1992 (released: 30:2015). Available at: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=21638 (accessed 19.09.2017).
- Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. Pharmacopoeia standart samples and their practical application in the national drug standardization system. Pharmaceutical Chemical Journal (Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal). 2016;50:258–61 (in Russian).
- Reference material — General and statistical principles for certification. ISO Guide 35:2006. Available at: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber (accessed 19.09.2017).
- Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment (Biopreparaty). 2016;16:229–36 (in Russian).
- WHO. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Report Series. 2006;932, annex 2. Available at: http://www.who.int/bloodproducts/publications/TRS932Annex2_Inter_biolefststandardsrev2004.pdf (accessed 19.09.2017).
- General requirements for the competence of reference material producers. ISO Guide 34:2009 (ISO 17034:2016). Available at: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=50174 (accessed 19.09.2017).
- Ustinnikova OB, Novikova EV, Runova OB, Shvedov DV, Zhilyaeva MV. Harmonization of requirements for determination of the recombinant blood clotting factor (rFVIIa) activity. Pharmaceutical Chemical Journal (Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal). 2017;51:54–7 (in Russian).
- Russia State Pharmacopoeia XIII. GPM.1.2.1.2.0001.15 Chromatography. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#446 (accessed 18.01.18) (in Russian).
- ICH Q2B Validation of analytical procedures: Text and Methodology. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2B//.pdf (accessed 06.11.2017).