

Е. О. Голощапова, О. Б. Рунова, О. Б. Устинникова

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ИНТЕРФЕРОНЫ БЕТА-1а И БЕТА-1b: ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ БЕЛКА И ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ЕЕ ПОДЛИННОСТИ

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Россия, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2; e-mail: Goloshapova@exrmed.ru

Препараты на основе рекомбинантных интерферонов бета высоко востребованы в клинической практике в качестве первой линии терапии при рассеянном склерозе. В Российской Федерации зарегистрированы препараты на основе рекомбинантных интерферонов β -1a и β -1b. Данные белки отличаются технологией производства и, как следствие, структурой. Рекомбинантный интерферон β -1a — гликозилированный белок, близкий по структуре к эндогенному интерферону человека. Рекомбинантный интерферон β -1b — негликозилированный белок, на 2 аминокислотных остатка отличающийся от интерферона β -1a. Существующие структурные особенности влияют на клиническую эффективность, побочное действие и интенсивность индукции нейтрализующих антител в случае применения интерферона β -1a или β -1b. В связи с этим при проведении лабораторной фармацевтической экспертизы качества препаратов интерферонов β , помимо подтверждения специфической биологической активности, должно быть установлено соответствие молекулы целевого белка заявленной структуре. На сегодняшний день международные и отечественные фармакопейные требования к оценке качества данных препаратов представлены не в полной мере. Формирование отечественных унифицированных требований позволит оптимизировать регистрационный процесс и послужит основой гармонизации отечественных и международных требований.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон β ; оценка качества; подлинность; регистрационное досье.

Эндогенный интерферон β человека (ИФН β) — кислотоустойчивый гликопротеин, отнесенный вместе с интерфероном α к I типу интерферонов. Начало разработки рекомбинантных препаратов на основе ИФН β обусловлено его противоопухолевой активностью [1]. Была отмечена клиническая эффективность ИФН β при терапии стероидоустойчивого язвенного колита, гломерулонефрита, хронического панкреатита [2, 3]. Также известно, что ИФН β регулирует иммунный ответ при вирусных инфекциях, в частности при гепатите С и везикулярном стоматите [4 – 6].

Однако основным показанием к применению препаратов ИФН β являются неврологические заболевания, в первую очередь рассеянный склероз (РС) и другие демиелинизирующие заболевания нервной системы [7, 8].

Распространенность РС постоянно растет, так например, количество людей, болеющих РС, увеличилось с 2,1 млн в 2008 г. [9] до 2,3 млн в 2013 г. [10] и на сегодняшний день в мире насчитывается, по разным оценкам, от 2,5 до 3 млн больных [11, 12].

За последние 120 лет в различных регионах России, в том числе и в Москве, распространенность РС выросла с 29 – 33 до 45 – 50 случаев на 100000 населения. Преобладающее число больных (80 %) — это женщины в возрасте 20 – 35 лет, мужчины — 35 – 45 лет [13]. Средний возраст дебюта заболевания составляет 30 лет, соотношение женщин и мужчин 3:1 [14, 15].

Предполагают, что иммуномодулирующий эффект ИФН β связан со снижением активации лимфоцитов и экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II типа, контролю продукции противовоспалительных цитокинов, активации клеток-супрессоров, индуцированию дифференциации нервных стволовых клеток в олигодендроциты, ингибирование изменений проницаемости гематоэнцефалического барьера и инфильтрации Т-клетками центральной нервной системы [16, 17]. Действие ИФН β проявляется в результате поэтапного взаимодействия с гетерогенным рецептором интерферона, состоящим из IFNAR1 и IFNAR2 субъединиц, с образованием тройного комплекса [18]. Количество Bregs и CD56bright NK-клеток у здоровых людей и у пациентов с РС, не получающих лечение, примерно одинаково; количество данных клеток резко увеличивается при лечении препаратами ИФН β [19, 20].

В клинической практике в качестве первой линии терапии при РС в России применяют рекомбинантные формы ИФН β : ИФН β -1a и ИФН β -1b [21]. При этом все препараты вызывают схожие нежелательные реакции, в том числе приводят к выработке антител, включая нейтрализующие антитела [22].

Зарегистрированные в Российской Федерации препараты ИФН β представлены в таблице [23].

Рекомбинантный ИФН β -1a, синтезируемый клетками яичников китайского хомячка (СНО), идентичен природному ИФН β по аминокислотной последова-

тельности, содержит 166 аминокислотных остатков и характеризуется сходным типом гликозилирования. Молекулярная масса полипептида 22500 Да. Углеводная цепочка связана с азотом остатка аспарагина в положении 80 [24].

Рекомбинантный ИФН β -1a представляет собой смесь фукозилированных гликопротеинов, различающихся разветвленностью и степенью сиалирования углеводной части молекулы [25]. С учетом наличия большого количества гидрофобных остатков, к сайту гликозилирования, было высказано предположение, что углеводная цепь защищает гидрофобные остатки, что препятствует агрегации и увеличению растворимости. Также было показано, что терминальная сиаловая кислота влияет на фармакокинетику и биологическую активность [26 – 28].

Рекомбинантный ИФН β -1b получают, используя в качестве продуцента генномодифицированные клетки *Escherichia coli*. ИФН β -1b представляет собой негликозилированный белок с молекулярной массой 18500 Да, состоящий из 165 аминокислот. В молекуле отсутствует N-концевой метионин, а в позиции 16 вместо цистеина присутствует серин [29].

Несмотря на отсутствие гликозилирования и замену аминокислоты, ИФН β -1b сохраняет биологические свойства природного ИФН β , но, благодаря внесенным изменениям, существенно упрощается технология получения лекарственных препаратов на его основе [30].

Однако исследования показали, что удельная активность ИФН β -1a приблизительно в 10 раз выше, чем удельная активность ИФН β -1b. При попытке идентифицировать структурную основу этих различий в активности, авторы пришли к выводу, что гликозилирование, как единственное существенное из известных структурных отличий между продуктами, оказывает решающее влияние на удельную активность. Стабилизирующий эффект углевода наблюдали в экспериментах по термической денатурации. Отсутствие гликозилирования также коррелировало с усилением агрегации и повышенной чувствительностью к термической денатурации. Ферментативное удаление углевода из

ИФН β -1a с помощью PNGазы F вызывало интенсивное осаждение дегликозилированного продукта [31].

Клиническая эффективность, побочное действие и интенсивность индукции нейтрализующих антител также различны в случае применения ИФН β -1a и ИФН β -1b. Так, в отдельных случаях исследователи отмечают преимущество клинической эффективности ИФН β -1b и меньшую выраженность болевых ощущений и местной реакции на инъекционное введение ИФН β -1b [32, 33].

С другой стороны, более высокая способность к индукции нейтрализующих антител была показана для ИФН β -1b. У около 42 % пациентов, принимающих ИФН β -1b в течение более 3 мес, и около 5 % пациентов, принимающих ИФН β -1a в течение 24 мес, увеличивалась выработка нейтрализующих антител, что приводило к уменьшению восприимчивости к лечению [34 – 39].

Клиническая эффективность и безопасность препаратов ИФН β зависят от структурных особенностей целевого белка (использования гликозилированной и негликозилированной формы) и, вероятно, от индивидуальных особенностей пациента, что необходимо учитывать при выборе лекарственного препарата первой линии терапии. В связи с этим основным этапом лабораторной фармацевтической экспертизы качества препаратов ИФН β , помимо подтверждения специфической биологической активности, должно быть установление соответствия молекулы целевого белка заявленной структуре.

Как правило, максимально достоверно подлинность структуры белка можно оценить на стадии очищенного белка — субстанции до внесения вспомогательных веществ, в том числе стабилизаторов, например человеческого сывороточного альбумина или аминокислот.

Согласно Европейской фармакопее необходимо подтверждение подлинности субстанций ИФН β -1a методом пептидного картирования в сравнении со стандартным образцом CRS (Chemical Reference Substances), рекомендованного Европейским директором по качеству лекарственных средств (EDQM). Условием признания подлинности является соответствие хроматографического профиля образца препарата профилю стандартного образца. Также для подтверждения подлинности предусмотрена оценка распределения изоформ методом масс-спектрометрии. Типичный спектр ИФН β -1a должен состоять из 6 основных гликоформ, спектр должен соответствовать масс-спектру ИФН β -1a CRS.

Помимо подлинности структуры белка, для выявления примесей с молекулярной массой, отличающейся от ИФН β -1a, предусмотрен метод электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях в сравнении со стандартным образцом CRS, для окисленного интерферона β -1a — методом ВЭЖХ одновременно с испытанием на подлинность методом пептидного картирования. При этом определяют пики фрагментов пептидов, соответствующие аминокислотам 35 – 45 и их окисленным формам, по хромато-

Препараты ИФН β

Наименование препарата	Действующее вещество	Производитель
Интерферон бета-1b	Интерферон β -1b	ЗАО “Биокад”, Россия
Ронбетал	Интерферон β -1b	ЗАО “Биокад”, Россия
Инфибета	Интерферон β -1b	АО “Генериум”, Россия
Бетаферон	Интерферон β -1b	Байер Фарма АГ, Германия
Экставиа	Интерферон β -1b	Новартис Фарма, Швейцария
Ребиф	Интерферона β -1a	Мерк Сероно, Италия
Авонекс	Интерферона β -1a	Биоген Айдек Лимитед, Великобритания
Генфаксон	Интерферона β -1a	Лабораторию Тюттор, Аргентина
Синновекс	Интерферона β -1a	СиннаГен Ко, Иран
Тебериф	Интерферона β -1a	ЗАО “Биокад”, Россия

грамме продуктов разложения окисленного интерферона β -1a, прилагаемой к ИФН β -1a CRS. Кроме того, предусмотрен молекулярно-массовый анализ содержания димеров и родственных веществ с большей молекулярной массой и количественное определение целевого белка.

Однако данные требования справедливы для очищенного белка/субстанции/белка для хранения. Для готовых лекарственных форм препаратов ИФН β -1a определенного формата спецификации не существует, что приводит к различию в перечне показателей, методов их оценки и нормам у разных производителей. Так, например, не все производители оценивают родственные примеси на стадии готового продукта. Оценка подлинности структуры в случае использования в качестве стабилизатора человеческого сывороточного альбумина становится методически невозможной, и в данном случае необходимо представление сведений о подтверждении подлинности структуры белка на уровне субстанции. Только один производитель ИФН β -1a оценивает наличие биантеннальных сиалированных N-гликанов в готовом продукте, и не все производители оценивают гликановый профиль на стадии субстанции. Несмотря на наличие европейского образца CRS, производители используют стандартный образец предприятия во всех случаях, где необходимо использование стандартного образца сравнения. Необходимо отметить, что полная унификация требований в данном случае невозможна из-за различий в составе готовых форм разных производителей, но формирование отечественных фармакопейных требований к готовой лекарственной форме, субстанции и стандартному образцу сравнения представляется актуальной задачей.

Что касается ИФН β -1b, то международные и отечественные фармакопейные требования к оценке качества данной субстанции и международный (европейский) стандартный образец отсутствуют. Использование стандартного образца CRS интерферона β -1a не корректно из-за структурных различий белков. Таким образом, в качестве основных документов, определяющих формат спецификации на субстанцию ИФН β -1b, в настоящее время могут рассматриваться только общие международные и отечественные фармакопейные требования к белкам, полученным с применением технологии рекомбинантной ДНК, а в качестве стандартного образца сравнения — стандартный образец предприятия.

Следующими проблемными моментами подтверждения подлинности структуры рекомбинантных ИФН β являются наличие стабилизатора (белка) в составе субстанции и использование стандартных образцов предприятия в качестве образцов сравнения. В первом случае включение показателя “подлинность структуры” (аминокислотной последовательности и гликанового профиля — для ИФН β -1a) в спецификацию на субстанцию невозможно. В качестве решения этого вопроса можно рассматривать предоставление в рамках регистрационного досье сведений об анализе структуры белка на технологической стадии до добав-

ления стабилизатора, в так называемой “контрольной точке” производственного процесса. В случае использования стандартного образца предприятия данные, представляемые в регистрационном досье на препарат, должны содержать информацию об исследовании структуры такого стандартного образца в прослеживаемости к стандарту CRS или свидетельствовать о полном подтверждении структуры заявленного целевого белка при отсутствии такого стандарта.

В заключение можно отметить, что ИФН β в настоящее время являются высоко востребованными препаратами первой линии терапии при лечении рассеянного склероза. Формирование отечественных унифицированных требований к номенклатуре показателей качества, учитывающих структурные особенности рекомбинантных ИФН β , методам их оценки, стандартным образцам сравнения и формату данных, представляемых в рамках регистрационного досье, позволит оптимизировать регистрационный процесс и послужит основой при необходимости гармонизации отечественных и международных требований.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. Angelucci, F. Iacopino, S. Ferracuti, *J. Interferon Cytokine Res*, **27**(8), 643 – 652 (2007).
2. S. C. Satchell, O. Buchatska, S. B. Khan, *J. Am. Soc. Nephrol*, **18**(11), 2875 – 2884 (2007).
3. R. Talukdar, R. K. Tandon, *Gastroenterol. Hepatol*, **23**(1), 34 – 41 (2008).
4. I. M. Pedersen, et al., *Nature*, **449**(7164), 919 – 922 (2007).
5. J. Feher, G. Lengyel, *Orv. Hetil*, **148**(33), 1539 – 1543 (2007).
6. M. D. Trotter, D. S. Lyles, *J. Neurovirol*, **13**(5), 433 – 445 (2007).
7. M. Kremenchutzky, S. Morrow, and C. Rush, *Expert Opin. Drug Saf*, **6**(3), 279 – 288 (2007).
8. S. Pay, I. Simsek, H. Erdem, *Clin. Exp. Rheumatol*, **25**, 34 – 40 (2007).
9. *Atlas: Multiple Sclerosis Resources in the World 2008*, World Health Organisation, Geneva, Switzerland (2008); Available at: <http://www.msif.org/about-ms/publications-and-resources/>. Accessed October 10, 2013.
10. *Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World*. London: Multiple Sclerosis International Federation; 2013. Available at: <http://www.msif.org/about-ms/publications-and-resources/>, Accessed October 10, 2013.
11. Н. Н. Спирина, А. Н. Бойко, И. О. Степанова, Т. Е. Шмидт, *Ведение больных с рассеянным склерозом: методические рекомендации*, РООИ “Здоровье человека”, Москва (2015), сс. 7 – 8.
12. И. Э. Есауленко, *Вестник неврол., психиатрии и нейрохирургии*, № 7, 37 – 41 (2016).
13. *Протокол ведения больных. Рассеянный склероз*. Утв. Минздрава России РФ 18.04.2005, Москва (2005).
14. И. А. Завалишина, М. А. Пирадова, А. Н. Бойко, *Аутоиммунные заболевания в неврологии. Клиническое руководство*, Здоровье человека, Москва (2014), сс. 10 – 11.
15. Е. И. Гусева, А. Н. Коновалова, *Клинические рекомендации. Неврология и нейрохирургия*, ГЭОТАР, Москва (2015), сс. 13 – 14.
16. *Руководство по экспертизе лекарственных средств*, том 14, гл. 8, Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции интерферон бета, Полиграф-плюс, Москва (2014), сс. 128 – 144.
17. Z. Hojati, M. Kay, F. Dehghanian, *Multiple Sclerosis. A Mechanistic View*, Academic press, Shreveport (2016).

18. J. J. Strunk, I. Gregor, Y. Becker, *J. Mol. Biol.*, **377**, 725 – 739 (2008).
19. Е. И. Гусев, *Рассеянный склероз. Справочник*, Реал Тайм, Москва (2009).
20. S. Martire, *ECTRIMS Online Library*, 200795 (2017).
21. В. В. Мирошникова, А. А. Саранов, А. С. Аракелян, *Лекарственный вестник*, ВолГМУ, **1**(49), 20 – 35 (2013).
22. P. Perini, A. Facchinetti, and P. Bulian, *Eur. Cytokine Network*, **12**, 56 – 61 (2001).
23. *Государственный реестр зарегистрированных лекарственных средств*, <http://www.grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
24. Европейская фармакопея 8.0.
25. S. Orru, d A. Amoresano, R. Siciliano, *Biol Chem*, **381**, 7 – 17 (2000).
26. M. Karpusas, M. Nolte, and C. B. Benton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11813 – 11818 (1997).
27. H. S. Conradt, H. Egge, and J. Peter-Katalinic, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14600 – 14605 (1987).
28. K. Kasama, J. Utsumi, *J. Interferon Cytokine Res.*, **15**, 407 – 415 (1995).
29. Патент РФ 2473696 (2013).
30. Патент РФ 2261913 (2004).
31. L. Runkel, W. Meier, R. B. Pepinsky, *Goetz SPharm Res.*, **15**(4), 641 – 649 (1998).
32. P. Barbero, M. Bergui, E. Versino, *Mult. Scler.*, **12**(1), 72 – 76 (2006).
33. K. Baum, C. O’Leary, F. Coret Ferrer, *Mult. Scler.*, **13**(9), 1153 – 1160 (2007).
34. P. Kivisakk, G. V. Alm, *Mult. Scler.*, **3**, 184 – 190 (1997).
35. R. A. Rudick, N. A. Simonian, J. A. Alam, *Neurology*, **50**, 1266 – 1272 (1998).
36. F. Deisenhammer, M. Reindl, J. Harvey, *Neurology*, **52**, 1239 – 1243 (1999).
37. M. Maurelli, R. Bergamaschi, A. Antonini, *J. Dermatol. Treat.*, **7**, 1 – 4 (2018).
38. A. Adams, W. Tyor, K. Holden, *Pediatric Neurology*, **21**(1), 481 – 483 (1999).
39. Е. В. Попова, А. Н. Бойко, О. В. Быкова, *Ж. неврол. и псих.*, **6**, 73 – 75 (2016).

Поступила 30.05.18

RECOMBINANT HUMAN INTERFERONS BETA-1a AND BETA-1b: PROTEIN STRUCTURE FEATURES AND PROBLEMATIC ISSUES OF IDENTITY CONFIRMATION

E. O. Goloshchapova*, O. B. Runova, and O. B. Ustinnikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

* e-mail: Goloshchapova@expmed.ru

Medicinal preparations based on recombinant interferons beta are of high demand in clinical practice as the first-line therapy of multiple sclerosis. Drugs based on recombinant interferons beta-1a and beta-1b have been registered in the Russian Federation. These proteins have different production technologies and, hence, structures. Recombinant interferon beta-1a is a glycosylated protein with a structure close to that of endogenous human interferon. Recombinant interferon beta-1b is a non-glycosylated protein, different by two amino acid residues from interferon beta-1a. These structural features influence the biological properties of preparations based on interferons beta-1a and beta-1b and, in particular, their clinical efficacy, side effects, and intensity of neutralizing antibody induction. For this reason, a necessary step in the laboratory pharmaceutical examination of the quality of interferon beta based drugs is, besides confirmation of their specific biological activity, to establish correspondence of the target protein molecule to the claimed structure. However, at present, the domestic and international pharmacopoeial requirements to assessing the quality of interferon beta based drugs are not fully adequate. The proper development of unified domestic requirements will allow optimizing the registration process and provide a basis for harmonization of the domestic and international pharmacopoeias.

Keywords: recombinant interferon beta, quality assessment, authenticity, drug master file.