

## РАЗРАБОТКА ПОРЯДКА АТТЕСТАЦИИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА МЕТИОНИНОВОЙ ФОРМЫ ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2b ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ МЕТОДОМ ПЕПТИДНОГО КАРТИРОВАНИЯ

Устинникова О.Б., Голощапова Е.О., Рунова О.Б., Коротков М.Г.,  
Волкова Р.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ,  
Москва, Россия

**Резюме.** Оценка подлинности белков, полученных с помощью технологии рекомбинантной ДНК, является важным этапом подтверждения эффективности и безопасности препаратов, созданных на их основе. Один из основных способов оценки подлинности заключается в сравнении структур молекул испытуемого и стандартного образца с помощью метода пептидного картирования с хроматографическим разделением продуктов ферментализации. В получении достоверных результатов существенную роль играет выбор стандартного образца сравнения. Для субстанции интерферона альфа-2b, содержащей N-концевой метионин, использование образца Interferon CRS (Chemical Reference Substances), рекомендованного Европейским управлением по качеству лекарственных средств, не корректно, поскольку данная субстанция является безметиониновой.

В данной работе представлены результаты разработки порядка аттестации отраслевого стандартного образца (ОСО) метиониновой формы интерферона альфа-2b. Область применения данного ОСО – подтверждение подлинности метиониновой формы субстанции интерферона альфа-2b методом пептидного картирования с обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией.

На начальном этапе аттестации, в связи с изменением области применения субстанции-кандидата ОСО, была изменена форма ее выпуска и проведена оценка качества по всем показателям, предусмотренным спецификацией производителя. Далее в условиях воспроизводимости по валидированной методике ВЭЖХ (с предварительным трипсинолизом белка) было получено 30 пептидных карт кандидата в ОСО.

Было показано, что условия гидролиза, а именно выбор трипсина, существенно влияют на профиль пептидной карты. Таким образом, в описании условий применения ОСО должно быть приведено указание на конкретного производителя и номер по каталогу данного реагента.

На основании анализа пептидных карт и результатов масс-спектрометрии высокого разрешения было приведено обоснование выбора 8-ми реперных пиков (пиков сравнения). В качестве основного пика с установленным абсолютным временем удерживания был выбран пик с максимально стабильным выходом и интенсивностью. В качестве обязательных для оценки пиков с относительными временами удерживания были выбраны 2 пика: пик, содержащий N-концевой метионин, и пик наи-

### Адрес для переписки:

Устинникова Ольга Борисовна  
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств  
медицинского применения» Министерства  
здравоохранения РФ  
127051, Россия, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2  
Тел.: 8 (499) 241-70-69.  
E-mail: ustinnikova@expmed.ru

### Address for correspondence:

Ustinnikova O.B.  
Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological  
Products  
127051, Russian Federation, Moscow, Petrovsky blvd, 8,  
bldg 2.  
Phone: 7 (499) 241-70-69.  
E-mail: ustinnikova@expmed.ru

### Образец цитирования:

О.Б. Устинникова, Е.О. Голощапова, О.Б. Рунова,  
М.Г. Коротков, Р.А. Волкова «Разработка порядка  
аттестации стандартного образца метиониновой формы  
интерферона альфа-2b для подтверждения подлинности  
методом пептидного картирования» // Медицинская  
иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 543–550.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-543-550

© Устинникова О.Б. и соавт., 2018

### For citation:

O.B. Ustinnikova, E.O. Goloshchapova, O.B. Runova,  
M.G. Korotkov, R.A. Volkova "Development of a qualification  
procedure for methionine form of interferon alfa-2b standard to  
confirm its authenticity by means of a peptide mapping method",  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2018, Vol. 20, no. 4, pp. 543–550.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-543-550

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-543-550

большей молекулярной массы с установленной аминокислотной последовательностью, составляющей около 11% покрытия молекулы интерферона.

Установлены аттестованные характеристики ОСО в виде диапазонов абсолютного (для 1-го реперного пика) и относительных (для остальных реперных пиков) времен удерживания.

Возможность использования разработанного ОСО для оценки подлинности метиониновых интерферонов альфа-2b была подтверждена методом пептидного картирования в сравнении со стандартом CRS: изученные пики совпали, за исключением пика, соответствующего пептиду, содержащему N-концевой метионин, выявленный в результате масс-спектрометрии высокого разрешения.

*Ключевые слова:* субстанция, интерферон альфа-2b, подлинность, пептидное картирование, стандартный образец

## DEVELOPMENT OF A QUALIFICATION PROCEDURE FOR METHIONINE FORM OF INTERFERON ALFA-2b STANDARD TO CONFIRM ITS AUTHENTICITY BY MEANS OF A PEPTIDE MAPPING METHOD

Ustinnikova O.B., Goloshchapova E.O., Runova O.B., Korotkov M.G., Volkova R.A.

*Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Authenticity evaluation of proteins obtained with recombinant DNA technology is an important step in confirming efficacy and safety of the drugs based on them. One of the main ways to assess the authenticity is to compare molecular structure of the test and standard samples using the peptide mapping method with chromatographic separation of the products obtained by enzymatic degradation. Proper selection of a standard reference sample is essential in order to achieve reliable results. A standard sample of Interferon (CRS, Chemical Reference Substances) recommended by the European Agency for the Quality of Medicines for interferon alpha-2b substances containing N-terminal methionine is inappropriate, since the Interferon CRS sample doesn't contain methionine. We present the results of development of qualification procedure for methionine form of Interferon alfa-2b industrial standard sample (ISS). The range of use for this ISS is authenticity confirmation for the methionine form of interferon alpha-2b substance using peptide mapping method with reverse-phase high-performance liquid chromatography (reverse-phase HPLC). The quality assessment was performed for all the parameters specified by the manufacturer of this candidate substance at the initial stage of qualification procedure, due to changed application area, and changed package size. Further, 30 peptide cards of the ISS candidate substance were obtained after pre-trypsinolysis of the protein followed by validated HPLC method with proven repeatability.

It was shown that the hydrolysis conditions, i.e., the choice of trypsin preparations, may significantly affect the peptide map profile. Therefore, a reference to specific manufacturer and the catalog number of the product should be provided in description of application conditions for the ISS proposed.

A set of eight reference peaks (peaks of comparison) has been justified, as based on evaluation of peptide maps and results of high-resolution mass spectrometry. The peak with maximally stable yield and intensity was selected as the main peak with an established absolute retention time. Two peaks with relative retention times were chosen as essential peaks for evaluation, i.e., the 1st peak containing N-terminal methionine, and the 2nd peak of highest molecular weight with an established amino acid sequence covering 11% of the studied interferon molecule.

We have also qualified ISS parameters expressed as absolute (minimum for one reference peak), and relative (for the remaining reference peaks) retention time periods. Authenticity of the ISS candidate was further confirmed by the peptide mapping method, as compared with interferon CRS reference standard. Their peak patterns proved to be near-similar, except of a peak with eluted peptide containing N-terminal methionine as revealed by high-resolution mass spectrometry.

*Keywords:* substance, interferon alfa-2b, authenticity, peptide mapping, standard sample

## Введение

Интерфероны (IFN) — белки, относящиеся к группе цитокинов. Основные биологические свойства интерферонов проявляются в их противовирусном, иммуномодулирующем и противоопухолевом действии [3].

Противовирусный эффект интерферонов заключается в подавлении синтеза вирусной РНК и белков оболочки вируса, иммуномодулирующий эффект — в способности регулировать взаимодействие клеток, участвующих в иммунном ответе, противоопухолевый эффект связан со способностью замедлять или подавлять рост культуры клеток и активировать противоопухолевые механизмы иммунной системы [5, 9].

Наиболее широкое применение получили препараты рекомбинантного интерферона альфа-2b — негликозилированного белка с молекулярной массой около 19240 кДа. Молекула интерферона альфа-2b состоит из 165 аминокислот, N-концевым аминокислотным остатком является цистеин, связанный дисульфидной связью с 98 цистеином (рис. 1) [10].

Поскольку синтез белка рибосомой бактериальной клетки инициируется АТГ-кодоном и N-конец бактериального белка представлен формилметионином, а эффективная экспрессия рекомбинантного белка в системах прокариот приводит к накоплению в клетках большого количества белка, в результате чего отщепление формилметионина идет неэффективно, рекомбинантный белок может содержать дополнительный метионин на N-конце молекулы [8, 12].

Таким образом, в зависимости от технологии и условий производства возможно получение как безметиониновой формы интерферона альфа-2b (идентичной эндогенному), так и его метиониновой формы, где N-концевым аминокислотным остатком является метионин. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрированы семь субстанций рекомбинантного интерферона альфа-2b: четыре метиониновые и три безметиониновые формы.

Согласно Европейской фармакопее физико-химические показатели качества, подтверждающие подлинность и чистоту субстанции IFN $\alpha$ -2b оценивают в сравнении с безметиониновой субстанцией интерферона альфа-2b — Interferon CRS (Chemical Reference Substances), рекомендованной Европейским управлением по качеству лекарственных средств (the European Directorate for the Quality of Medicines) (EDQM) [10].

Одним из основных методов подтверждения подлинности структуры белка, полученного в результате воспроизведения технологии рекомбинантной ДНК, является метод пептидного картирования (ВЭЖХ) [4]. Условием признания подлинности анализируемой субстанции является принципиальное совпадение пептидных карт испытуемого и стандартного образцов, полученных в ходе одного хроматографического цикла, а также наличие на хроматограмме испытуемого образца характеристических (реперных) пиков, установленных для стандартного образца.

В связи со структурными различиями метиониновой и безметиониновой форм IFN использование при анализе метиониновой субстанции в качестве образца сравнения IFN CRS не корректно, а разработка и аттестация отраслевого стандартного образца для оценки качества метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b методом пептидного картирования представляется актуальной задачей [4].

На основании результатов теоретического анализа нормативной документации на отечественные метиониновые субстанции интерферона альфа-2b в качестве кандидата в ОСО была выбрана субстанция с наиболее полной оценкой качества [6].

## Материалы и методы

### Методы

1. Метод пептидного картирования с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ): хроматографическая колонка YMC размером 100 × 4,6 мм, заполненная октадецилсилил (C18) модифицированным силикагелем, диаметр ча-

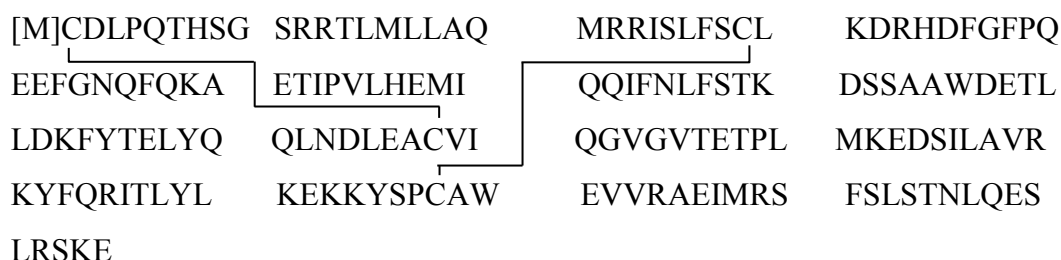


Рисунок 1. Аминокислотная последовательность интерферона альфа-2b

Figure 1. Formula of interferon alfa-2b

стиц 5 мкм, размер пор 300А (температура колонки 30 °С); спектрофотометрический детектор (длина волны 214 нм); градиентный режим с использованием двух подвижных фаз. Фаза 1: 0,1% трифторуксусная кислота в воде. Фаза 2: 0,1% трифторуксусная кислота в ацетонитриле-воде, 9:1. Скорость потока 1 мл/мин.

2. Метод масс-спектрометрии высокого разрешения: нанопоточный хроматограф с обращенно-фазовой колонкой на основе C18 с электроспрейным эмиттером; tandemный масс-спектрометр LTQ FT Ultra в 2-стадийном режиме автоматического измерения спектров. На первой стадии в ИЦР ячейке масс-спектрометра измерялись точные массы пептидов в диапазоне  $m/z$  300–1600 с разрешением  $R = 50\,000$  для  $m/z$  400 (число ионов в ячейке ИЦР  $5 \times 10^6$ ). На второй стадии в линейной ионной ловушке детектировали ионы фрагментов образующихся при столкновительно-индуцированной фрагментации (CID) пяти пиков с максимальной интенсивностью. Контроль результатов ВЭЖХ-МС проводили с помощью программы QualBrowser. С помощью программы Raw2msm из масс-хроматограмм были получены списки точных масс пептидов и масс их фрагментов и использованы для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Mascot.

III. При расчете результатов использовали статистические методы анализа:

среднее арифметическое вычисляли по формуле

$$X_{\text{ср}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [1]$$

стандартное отклонение  $S$  определяли по формуле:

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

### Материалы

1. Исследуемый образец — кандидат в ОСО: субстанция интерферона альфа-2b (метиониновая форма) производства ООО «Фармапарк».

2. Стандартный образец предприятия интерферона альфа-2b производства ООО «Фармапарк» (метиониновая форма), серия 220915.

3. Международный стандарт интерферона альфа-2b CRS от EDQM, кат № I0320301, серия 6.0.

4. Трипсин-1. Производитель Sigma-Aldrich, кат № 8658, серия SLBB2403V (активность 8868 ЕД/мг).

5. Трипсин-2. Производитель Sigma-Aldrich, кат № 8658, серия SLBL8393V (активность 9146 ЕД/мг).

6. Трипсин-3. Производитель ПанЭко, кат №П052, серия 3094С216 (активность 3203 ЕД/мг)

7. Трипсин-4. Производитель Sigma-Aldrich, кат № 1426, серия SLB F1700V (активность 13165 ЕД/мг).

8. Образцы для МС. 8 фракций объемом 100–200 мкл, полученные в результате трипсинолиза и последующего хроматографического разделения кандидата в ОСО. Состав фракции: 0,5–1 мкг пептида в элюэнте (4,5% об. до 45% об. ацетонитрила в воде с добавлением трифторуксусной кислоты с содержанием 0,06% об.)

## Результаты и обсуждение

В качестве начального этапа разработки СО метиониновой формы интерферона альфа-2b был проведен анализ всех показателей качества кандидата в СО в соответствии со спецификацией. Анализ подтвердил соответствие данной субстанции установленным требованиям [7, 10].

Кроме того, для удобства применения была изменена форма выпуска субстанции: вместо флаконов вместимостью от 2 до 250 мл или стерильных контейнеров вместимостью от 5 до 125 мл из полиэтилентерефталатгликоля, предусмотренных нормативной документацией, были выбраны стерильные полипропиленовые криопробирки вместимостью 1 мл, соответствующие требованиям USP VI. Объем розлива составил 0,5 мл.

Для аттестации СО, применяемого при контроле качества биологических лекарственных препаратов, как правило, используется та же методика, для которой предназначен СО. Таким образом, характеристика СО, по сути, это комплекс образца и методики [1].

Аттестация СО для определения подлинности рекомбинантного интерферона методом пептидного картирования (ВЭЖХ) не является исключением и предполагает использование вышеуказанного метода. Основным фактором, влияющим на стабильность получаемых результатов, является стадия ферментативного гидролиза (трипсинолиза). Для выявления возможного влияния различных производителей и серий трипсина на хроматографический профиль пептидной карты был проведен ряд анализов с использованием 4-х различных трипсинов. При воспроизведении единой для всех схемы эксперимента были задействованы 4 оператора и 4 хроматографа из двух лабораторий. В результате были получены 30 хроматограмм: 8 хроматограмм с трипсином-1; 9 хроматограмм с трипсином-2; 8 хроматограмм с трипсином-2; 8 хроматограмм с трипсином-3 и 5 хроматограмм с трипсином-4 (рис. 2–5).

Как следует из представленных рисунков, для пептидных карт с трипсинами 1 и 2 характерен стабильный профиль, позволяющий выделить 8 характеристических, хорошо разрешенных пиков (пик 1 — время удерживания

около 22,5 мин, пик 2 – время удерживания около 26,9 мин, пик 3 – время удерживания около 32,7 мин, пик 4 – время удерживания около 35,4 мин, пик 5 – время удерживания около 36,3 мин, пик 6 – время удерживания около 36,7 мин, пик 7 – время удерживания около 49,6 мин, пик 8 – время удерживания около 54,8 мин).

При использовании трипсина-3 и -4 профили пептидных карт были менее стабильны, полученные пики имели кластерную форму (трипсин-3), смещены, более интенсивны и хуже разрешены в диапазоне времен удерживания 33,817–38,236 (трипсин-4).

Кластерная форма пиков, характерная для трипсина-3, предположительно обусловлена недостаточной степенью гидролиза белка, связанной с низкой исходной активностью данного фермента (3203 ЕД/мг). Интенсивность и смещение центральных пиков на пептидной карте трипсина-4 по сравнению с трипсинами-1 и -2, напротив, могут быть вызваны более глубокой степенью гидролиза (активность трипсина-4 –

13165 ЕД/мг). Поскольку основное требование к пептидной карте – это ее информативность (наличие характерных пептидов), слишком большое количество фрагментов и более глубокое расщепление могут привести к потере специфичности. Таким образом, специфичность пептидной карты, полученной с применением трипсина-4, требует дополнительного исследования.

Таким образом, порядок аттестации ОСО, а также инструкция к его применению должны содержать информацию не только о производителе трипсина, но и указание конкретного каталожного номера данного реагента.

Процедура применения СО интерферона для пептидного картирования, в качестве подтверждения стабильности хроматографической системы, предполагает наличие установленных реперных (характеристических) пиков, 1 из которых должен быть охарактеризован по абсолютному времени удерживания, а минимум 4 пика охарактеризованы по относительному времени удерживания. Выбор данных пиков должен быть

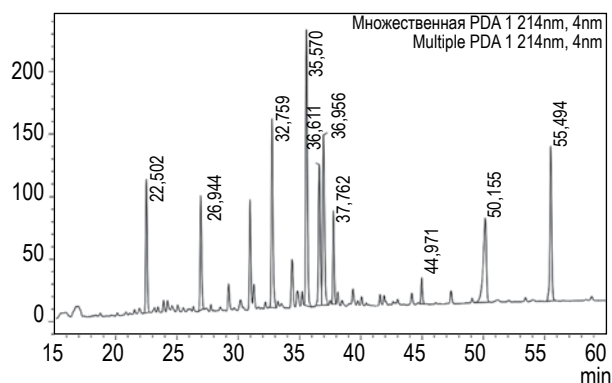


Рисунок 2. Типичная хроматограмма, получаемая с трипсином-1

Figure 2. A typical chromatogram obtained with the trypsin-1

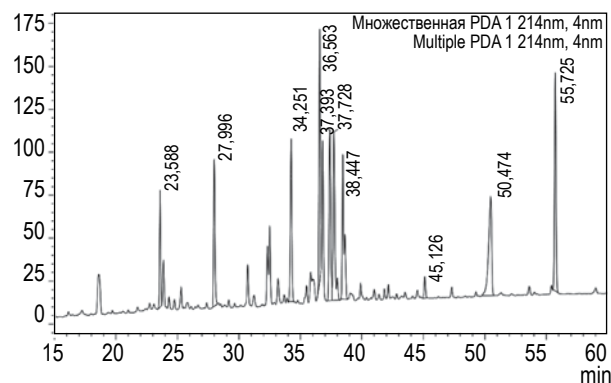


Рисунок 3. Типичная хроматограмма, получаемая с трипсином-2

Figure 3. A typical chromatogram obtained with the trypsin-2

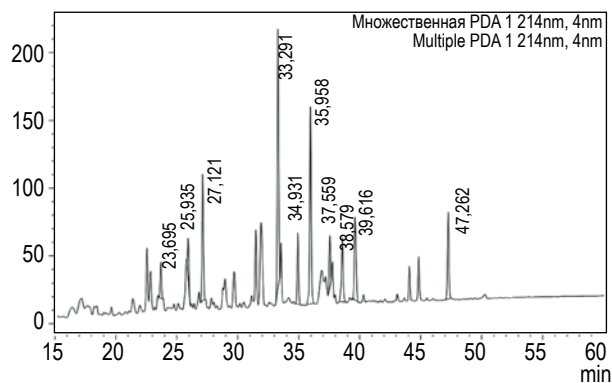


Рисунок 4. Типичная хроматограмма, получаемая с трипсином-3

Figure 4. A typical chromatogram obtained with the trypsin-3

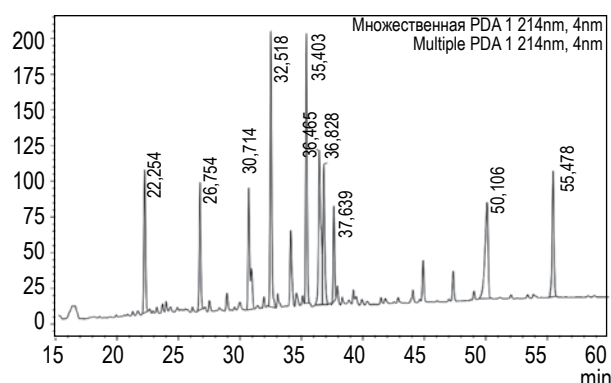


Рисунок 5. Типичная хроматограмма, получаемая с трипсином-4

Figure 5. A typical chromatogram obtained with the trypsin-4

**ТАБЛИЦА 1. АБСОЛЮТНОЕ И ОТНОСИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ УДЕРЖИВАНИЯ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ПИКОВ**

**TABLE 1. ABSOLUTE AND RELATIVE RETENTION TIMES OF THE CHARACTERISTIC PEAKS**

Пик Peak	Абсолютное время удерживания, мин Absolute retention time, min	Относительное время удерживания Relative retention time
1	–	0,61-0,66
2	–	0,74-0,78
3	–	0,90-0,95
4	33,8-37,0	–
5	–	1,02-1,03
6	–	1,03-1,04
7	–	1,37-1,43
8	–	1,51-1,59

**ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПИКОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

**TABLE 2. THE RESULTS OF THE STUDY THE AMINO ACID SEQUENCE OF PEAKS BY MASS SPECTROMETRY**

Пик Peak	Фрагмент последовательности Fragment of the sequence	Аминокислотная последовательность пептида Amino acid sequence of the peptide
1	146-150	AEIMR
2	1-8	MCDLPQTH
3	136-141	YSPCAW
4	72-84	DSSAAWDETLLDK
5	33-50	DRHDFGFPQEEFGNQFQK
6	35-50	HDFGFPQEEFGNQFQK
7	51-65	AETIPVLHEMIQQIF
8	85-113	FYTELYQQLNDLEACVIQGVGVGTETPLMK

обоснован, а времена удерживания в данном случае можно рассматривать как аттестуемые характеристики стандартного образца.

Поскольку наиболее информативными являются хроматограммы, полученные с трипсином-1 и -2, полученные результаты были объединены в одну выборку и проанализированы с помощью статистических расчетов: стандартное отклонение для абсолютных времен удерживания 8-ми характеристических пиков при  $n = 17$  составило 0,87; 0,78; 1,05; 0,79; 0,77; 0,77; 0,80 и 0,85 соответственно. Таким образом, наиболее стабильными являются пики 2, 4, 5 и 6, из которых пик 4 обладает наибольшей интенсивностью и может рассматриваться в качестве основного пика, охарактеризованного по абсолютному времени удерживания.

Характеристики реперных пиков были рассчитаны как среднее арифметическое абсолютного и относительного времен удерживания (при

$n = 17$ ) + 2 СКО и представлены в виде диапазона минимума и максимума (табл. 1).

Для обоснования выбора реперных пиков, помимо стабильности выхода, интенсивности и удовлетворительного разрешения, необходима характеристика отдельных пептидов [11]. Наиболее информативным исследованием в данном случае является определение аминокислотной последовательности пептидов методом масс-спектрометрии высокого разрешения с последующим покрытием известной последовательности белка (табл. 2).

В результате анализа с помощью масс-спектрометрии получаемых в процессе гидролиза пептидов было подтверждено 56% аминокислотной последовательности кандидата в СО. При этом второй пик характеризует N-концевую последовательность метионинового белка, а 8 пик характеризует наибольший участок молекулы (29 АК).

**ТАБЛИЦА 3. ВРЕМЕНА УДЕРЖИВАНИЯ ОСНОВНЫХ ПИКОВ НА ХРОМАТОГРАММАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ДЛЯ МЕЖДУНАРОДНОГО СТАНДАРТА CRS И КАНДИДАТА В ОСО**

TABLE 3. RETENTION TIMES OF THE MAJOR PEAKS OBTAINED FOR INTERNATIONAL STANDARD CRS AND CANDIDATE TO INDUSTRY STANDARD

Пик Peak	Стандарт CRS, время удерживания (мин) International standard CRS Retention times (min)	Кандидат в ОСО, время удерживания (мин) Candidate to industry standard Retention times (min)
1	21,696	21,723
2	22,500	26,008
3	30,224	30,220
4	31,895	31,896
5	34,482	34,472
6	35,451	35,448
7	35,776	35,769
8	36,519	36,513
9	48,672	48,664
10	53,904	53,892

Также в ходе работы был проведен сравнительный анализ пептидных карт кандидата в СО и международного стандарта интерферона альфа-2b CRS. Результаты представлены в таблице 3.

На полученных хроматограммах время удерживания первого пика и времена удерживания основных пиков кандидата в СО в диапазоне 30–55 минут практически совпадают с временами удерживания основных пиков стандарта CRS, а профиль минорных пиков не содержит принципиальных расхождений. При этом наблюдается различие времен удерживания второго пика в диапазоне 22–27 мин, обусловленное N-концевым метионином.

Полученные результаты позволяют сделать вывод об идентичности молекул кандидата в СО и стандарта CRS за исключением области N-конца интерферона альфа-2b и возможности его использования для оценки подлинности метиониновых интерферонов альфа-2b.

## Заключение

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод о том, что разработанный порядок аттестации ОСО метионинового интерферона альфа-2b должен состоять из следующих этапов:

1. Выбор формы выпуска ОСО.
2. Оценка качества кандидата в ОСО по всем показателям качества в соответствии с нормативной документацией.
3. Получение не менее 15-ти пептидных карт кандидата в СО в условиях воспроизводимости [2] по валидированной методике ВЭЖХ,

с предварительным гидролизом белка трипсином Sigma-Aldrich, кат № 8658.

4. Выбор реперных пиков на основании анализа пептидных карт и результатов масс-спектрометрического исследования.

5. Установление аттестованной характеристики СО в виде абсолютного (минимум для 1-го реперного пика) и относительных (для остальных реперных пиков) времен удерживания.

6. Подтверждение подлинности кандидата в СО методом пептидного картирования в сравнении со стандартом CRS.

7. В инструкции по применению ОСО должны быть указаны производитель и каталожный номер трипсина, с которым проводилась аттестация, а также 4 пика для оценки пригодности хроматографической системы.

Проведенные исследования позволили аттестовать 8 реперных пиков. Из них в качестве обязательных пиков могут быть указаны пик 4 (основной), а также пик 2, характеризующий N-концевой метионин, и пик 8, как пик с наибольшей молекулярной массой, составляющей около 11% покрытия молекулы интерферона. Четвертым пиком может быть любой из оставшихся аттестованных пиков, выбор которого может быть сделан производителями субстанций метионинового интерферона альфа-2b.

Авторы выражают благодарность фармацевтической компании ООО «Фармапарк» за методическую поддержку при проведении экспериментов и участие в обсуждении результатов.

## Список литературы / References

1. Бондарев В.П., Борисевич И.В., Волкова Р.А., Фадейкина О.В. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов // Вedomosti научного центра экспертизы средств медицинского применения, 2013. Т. 2. С. 28-32. [Bondarev V.P., Borisevich I.V., Volkova R.A., Fadeykina O.V. The problems of certification of industry standard samples for quality control of immunobiological medicinal products. *Vedomosti nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical Applications*, 2013, Vol. 2, pp. 28-32. (In Russ.)]
2. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [GOST R ISO 5725-1-2002].
3. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 356 с. [Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferons and their inducers (from molecules to drugs)]. Moscow: GEOTAR-Media, 2005. 356 p.
4. Климов В.И., Саканян Е.И., Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Мовсесянц А.А., Лебединская Е.В., Шестакова А.П. Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2017. Т. 17, № 2. С. 87-92. [Klimov V.I., Sakanyan E.I., Volkova R.A., Fadeykina O.B., Movsesyants A.A., Lebedinskaya E.V., Shestakova A.P. Analysis of requirements for standard samples intended to assess the quality of biological medicinal products. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2017, Vol. 17, no. 2, pp. 87-92. (In Russ.)]
5. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М.: Медицина, 1981. 400 с. [Soloviev V.D., Bektemirov T.A. Interferons in theory and practice of medicine]. Moscow: Medicine, 1981. 400 p.
6. 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. Т. 16, № 3. С. 161-165. [Ustinnikova O.B., Runova O.B., Goloshchapova E.O., Korsun L.V. The theoretical substantiation of the choice of interferon alfa-2b substance for certification as a standard for authenticating peptide mapping. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2016, Vol. 16, no. 3, pp. 161-165. (In Russ.)]
7. Фармакопейная статья предприятия PN 003726/01-180515 [Pharmacopoeia article of the company PN 003726/01-180515].
8. Ben-Bassat A. Amino-terminal processing of proteins. *Nature*, 1987, pp. 315-326.
9. Dianzani F. Biological basis for the clinical use of interferon. *Gut*, 1993, Vol. 34, p. 76.
10. European Pharmacopoeia 9.0, 07/2015:1110 "Interferon alfa-2 concentrated solution".
11. European Pharmacopoeia 9.0, 01/2010:20255 "Peptide mapping".
12. Kamionka M. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2011, Vol. 12, pp. 268-274.

### Авторы:

**Устинникова О.Б.** — к.б.н., начальник лаборатории биохимии МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Голощапова Е.О.** — эксперт 2 категории лаборатории биохимии МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Рунова О.Б.** — к.х.н., главный эксперт лаборатории биохимии МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Коротков М.Г.** — к.б.н., ведущий эксперт лаборатории биохимии МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Волкова Р.А.** — д.б.н., начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

### Authors:

**Ustinnikova O.B.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of MIBP Biochemistry, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

**Goloshchapova E.O.**, Licensed Expert, Laboratory of MIBP Biochemistry, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

**Rounova O.B.**, PhD (Chemistry), Main Licensed Expert, Laboratory of MIBP Biochemistry, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

**Korotkov M.G.**, PhD (Biology), Leading Expert, Laboratory of MIBP Biochemistry, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

**Volkova R.A.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biology and Genetic Testing, Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.10.2017

Отправлена на доработку 10.10.2017

Принята к печати 25.10.2017

Received 05.10.2017

Revision received 10.10.2017

Accepted 25.10.2017