



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения



RegЛек

Рекомендации по изложению в нормативной документации на лекарственные средства и в первичных данных отчетов по валидации методик подтверждения подлинности с использованием метода пептидного картирования

Смирнов Роман Сергеевич, главный эксперт.

Ваганова Ольга Александровна, нач. лаб.
Лаборатория биотехнологических препаратов

27 апреля 2022

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



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения



RegLec – ЕАЭС

Метод пептидного картирования



Основной физико-химический метод подтверждения
первичной структуры ЛС белковой природы:

- Моноклональные антитела (МкАТ, mAb)
- Гормоны (инсулин, гормон роста (hGH), эритропоэтин (EPO), фолликуло-стимулирующий гормон (FSH) и другие)
- Цитокины (полипептидный цитокин (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (филграстим) и другие)
- Интерлейкины (IL-2, IL-11 и другие)
- Интерфероны (α -интерферон, β -интерферон, γ -интерферон)
- Факторы роста (эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), инсулиноподобный фактор роста, фактор роста кератиноцитов (KGF) и другие)
- Гибридные и пегилированные (PEG) белки и т.д.



Основной принцип:

Параллельное расщепление стандартного и испытуемого образцов белка для воспроизводимого получения строго определенного набора пептидных фрагментов известной структуры с последующим разделением и детектированием фрагментов, сравнением полученных пептидных карт

Назначение метода:

- Подтверждение первичной аминокислотной последовательности
- Контроль и выявление изменений первичной аминокислотной последовательности, возникающих в результате точечных мутаций, ошибок транскрипции кДНК, окисления, дезамидирования и пр.
- Подтверждение наличия CDR-участков МкАТ

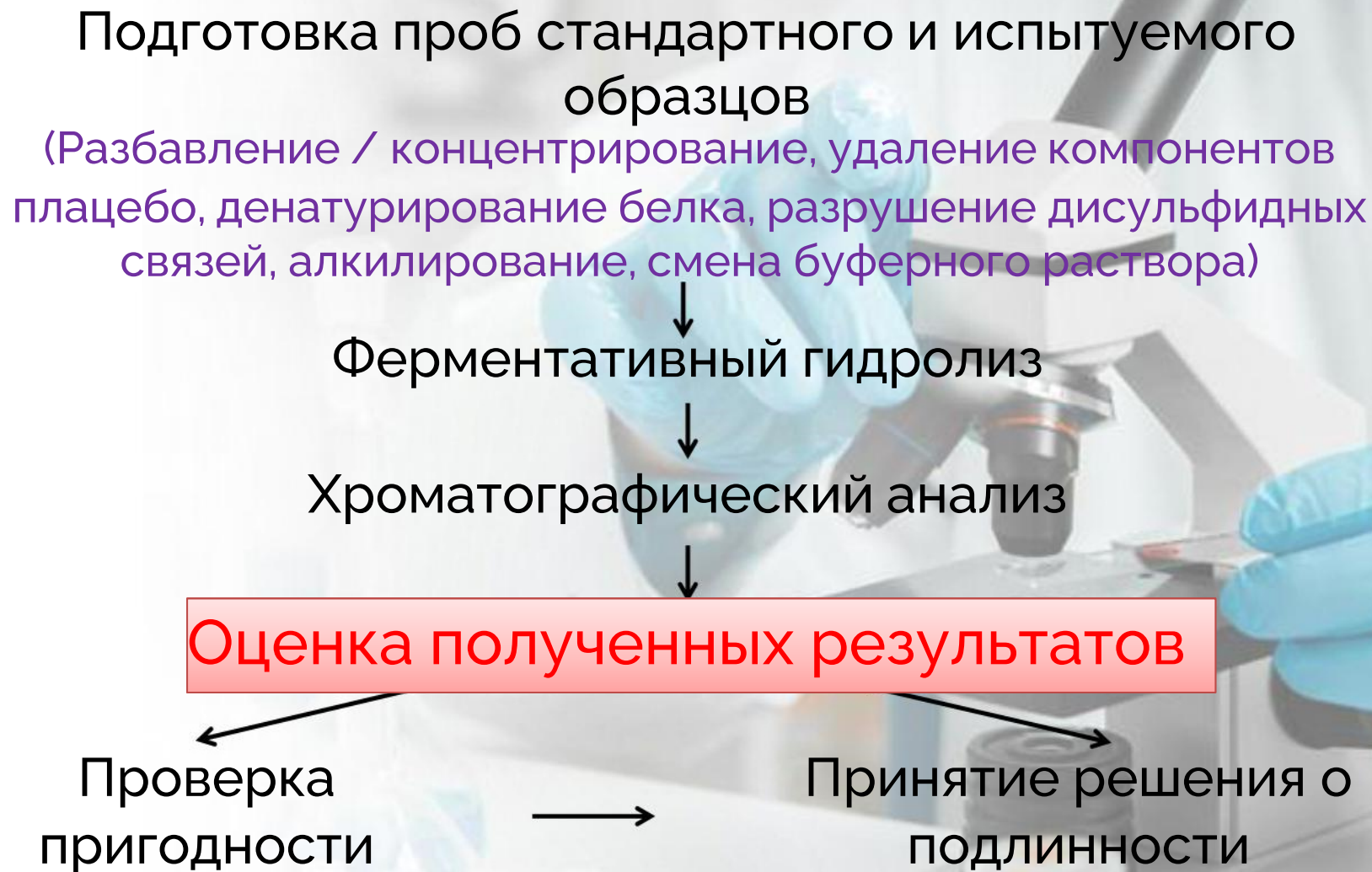


ГФ РФ XIV издания:

- ОФС.1.7.2.0035.18 «Пептидное картирование»
Расширена и детализирована по сравнению с ОФС Евр. Ф. и Амер. Ф.
- ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» (рекомендуемый метод подтверждения подлинности)
- ОФС. 1.7.1.0014.18 «Моноклональные антитела для медицинского применения» (обязательный метод подтверждения подлинности)

Фармакопея ЕАЭС:

- ОФС 2.1.2.39 «Пептидное картирование»
Гармонизирована с ОФС Евр. Ф. и Амер. Ф.





Проверка пригодности: оценка используемой хроматографической системы, этапов пробоподготовки и ферментативного гидролиза

←
Устаревший субъективный
подход

- визуальное сравнение профиля полученной пептидной карты СО и «эталонного» профиля пептидной карты СО на рисунке типичной хроматограммы
- минимальные требования к пригодности хроматографической системы (или их отсутствие)

←
Современный (фармакопейный!) подход

- визуальное сравнение профилей
- **количественная оценка параметров соответствия профилей с использованием набора «реперных» («референсных») пиков характеристичных пептидных фрагментов (расчет RRT, RI)**
- «стандартные» требования к пригодности хроматографической системы (оценка R_s , воспроизводимости времен удерживания и площадей (высот) реперных пиков, **оценка чувствительности (при необходимости)**)



Принятие решения о подлинности: сравнение полученных пептидных карт испытуемого и стандартного образцов

←
Устаревший субъективный
подход

- визуальное сравнение профилей полученных пептидных карт испытуемого и стандартного образцов

«должны соответствовать»,

«должны быть качественно сопоставимы»,

«должны совпадать»

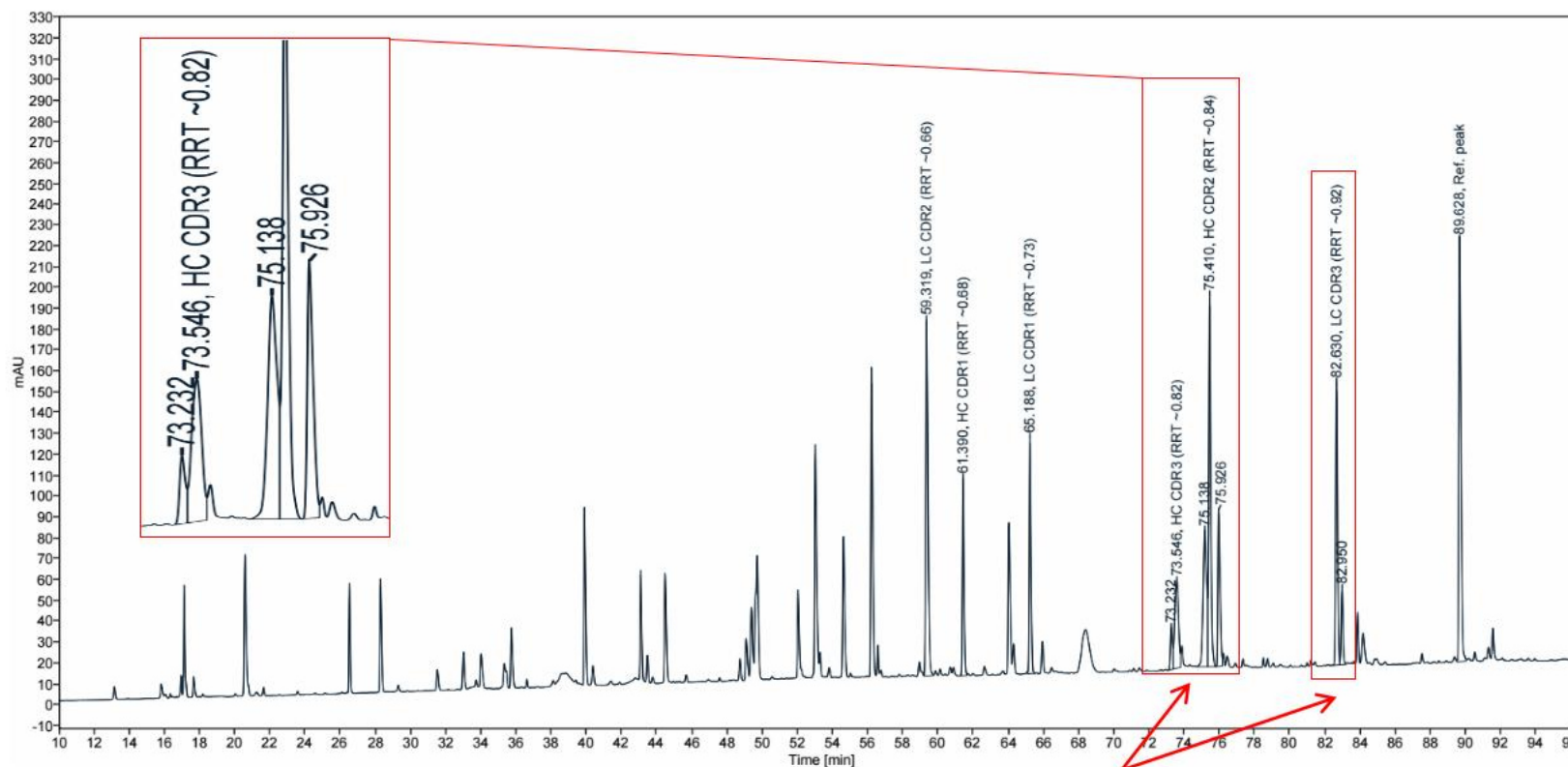
←
Современный (фармакопейный!) подход

- визуальное сравнение профилей
- **количественная оценка параметров соответствия профилей с использованием набора реперных пиков характеристичных пептидных фрагментов (расчет ΔRT , RI)**
- контроль и количественные критерии допустимости изменений хроматографического профиля для пиков остальных пептидных фрагментов (появление «новых пиков»)
- анализ пептидной карты смеси гидролизатов стандартного и испытуемого образцов (1:1)



Пептидное картирование МкАТ

LC-CDR, HC-CDR – комплементарно определяющие области (Complementary Determining Regions) легких (LC) и тяжелых (HC) цепей антитела



Пример, иллюстрирующий необходимость проверки разрешения между пиками пептидных фрагментов



Пример количественной оценки соответствия пептидных карт

«Реперные» CDR – фрагменты МкАТ	Факт. RRT	Критерий приемлемости RRT	Факт. RI	Критерий приемлемости RI	Допустимое отличие RI / RT на хроматограмме испытуемого раствора
HC-CDR 1	0,69	0,68 ± 0,03	0,38	0,40 ± 0,10	± 20 % / ± 0,1 мин
HC-CDR 2	0,84	0,84 ± 0,03	0,92	1,0 ± 0,2	± 20 % / ± 0,1 мин
HC-CDR 3	0,82	0,81 ± 0,03	0,39	0,40 ± 0,10	± 20 % / ± 0,1 мин
LC-CDR 1	0,73	0,72 ± 0,03	0,48	0,50 ± 0,10	± 20 % / ± 0,1 мин
LC-CDR 2	0,66	0,65 ± 0,03	0,96	1,0 ± 0,2	± 20 % / ± 0,1 мин
LC-CDR 3	0,92	0,92 ± 0,03	0,58	0,6 ± 0,05	± 20 % / ± 0,1 мин
Ref. peak	1	RT около 90 мин	1	—————	—————

Проверка соответствия полученной пептидной карты стандартного образца типичной хроматограмме

Проверка соответствия полученных пептидных карт стандартного и испытуемого образцов друг другу



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения



RegLec – EAES

Требования к изложению методики пептидного картирования в НД и валидации



На территории стран-участников ЕАЭС экспертиза в рамках регистрации выполняется в лаборатории государственного экспертного учреждения, поэтому:

- методика НД должна быть воспроизводима на базе любой специализированной контрольной лаборатории; написана максимально подробно и однозначно, с учетом всех особенностей, выявленных в ходе ее валидации. Желательна расширенная валидация, подтверждающая применимость всех «аналогичных» вариантов реактивов и оборудования.

На территории «западных стран» экспертиза выполняется в лаборатории производителя ЛС в присутствии экспертов государственного экспертного учреждения:

- требования методики к реактивам, оборудованию, программному обеспечению и пр. выполняются априори. Валидация выполняется в рамках выбранных рабочих условий.



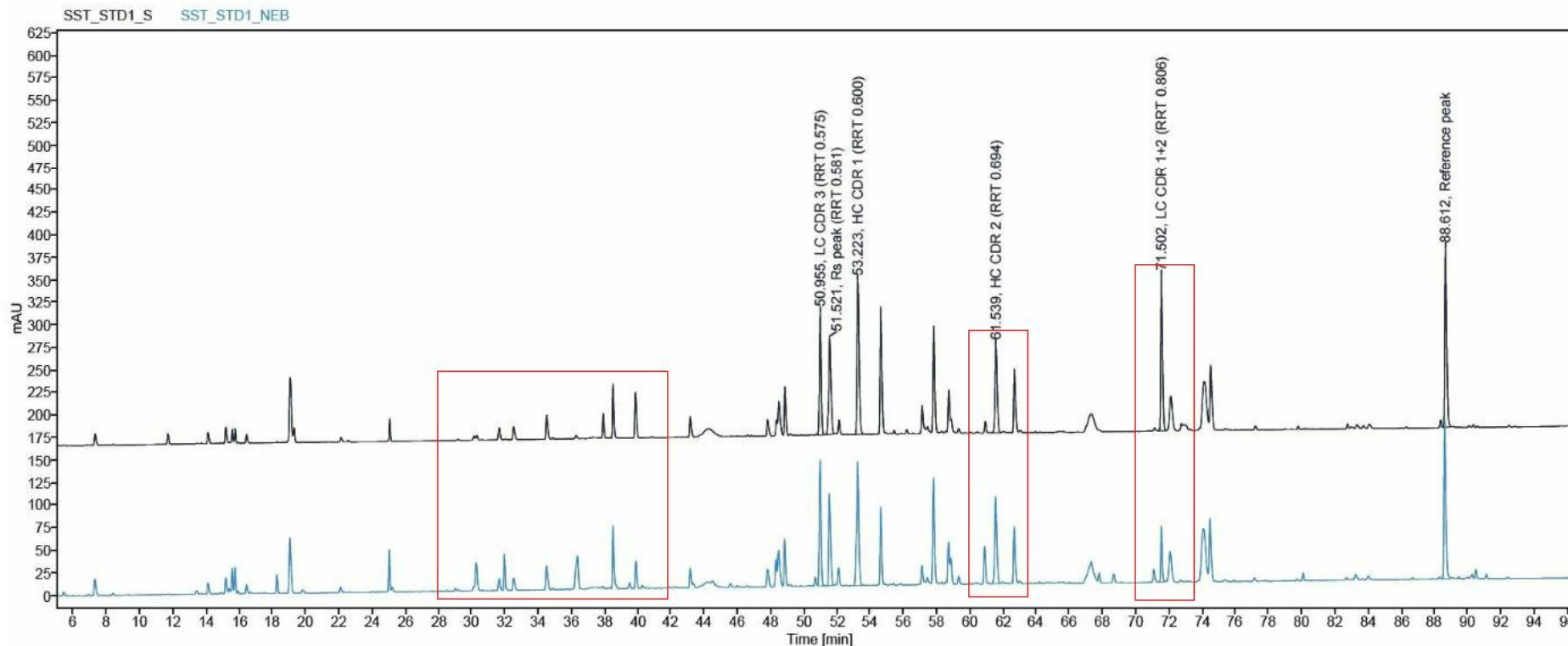
Максимально подробное описание всех значимых реактивов и материалов, используемых в ходе пробоподготовки:

- фермент;
- реактивы для восстановления и алкилирования дисульфидных связей;
- денатурирующие агенты и компоненты буферных растворов;
- материалы для концентрирования / замены буфера (мембранные концентраторы, диализные кассеты, обессоливающие колонки)

Полное торговое наименование, квалификация,
фирма-производитель, каталожный номер,
указание на возможность / невозможность замены
(возможность замены должна подтверждаться
валидацией)



Пример использования трипсина другого производителя (квалификация та же) для расщепления МкАТ





Приготовление растворов:

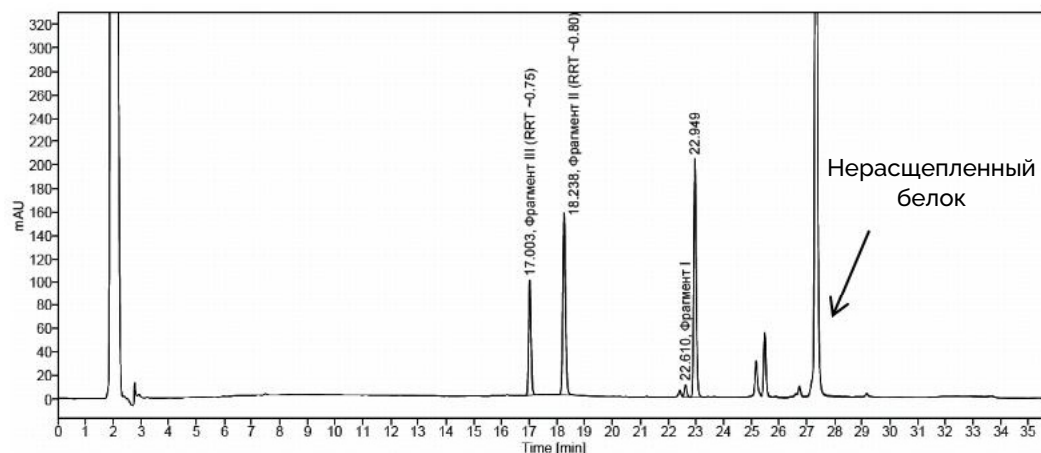
- методики приготовления всех «нефармакопейных» растворов;
- указание концентрации компонентов в конечном растворе (например, «раствор трипсина 1 мг/мл», «раствор ДТТ 0,6 М»), **особое внимание к единицам активности фермента**;
- указание диапазонов приемлемых значений рН буферных растворов (например, «рН 7,5 ± 0,1»);
- указание условий хранения и **объективных** сроков годности растворов

Условия пробоподготовки:

- подробное и последовательное описание всех стадий и их кратности;
- при использовании центрифужных концентраторов и обессоливающих колонок в условиях центрифугирования **указание единиц *g* (или *rcf*), а не об/мин**; указание конечных объемов растворов и температурных условий;
- условия инкубирования в виде валидированных диапазонов («37 ± 2 °С»; «18 ± 2 ч»; «30 ± 5 мин»)

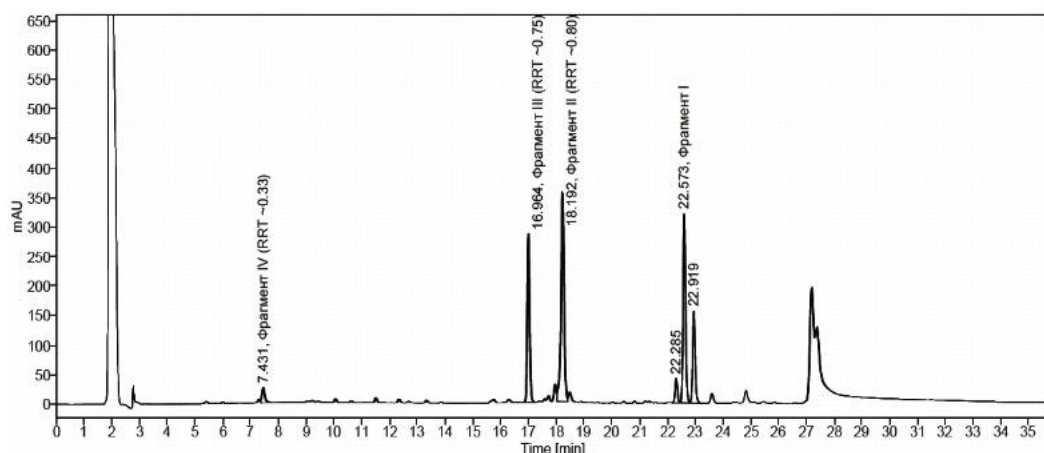


Разные единицы активности фермента, используемые разными производителями



Концентрация Glu-C
20 Sigma units/мл (~0.02 мг/мл)

**Разница в концентрации (мг/мл)
фермента около 25 раз !**

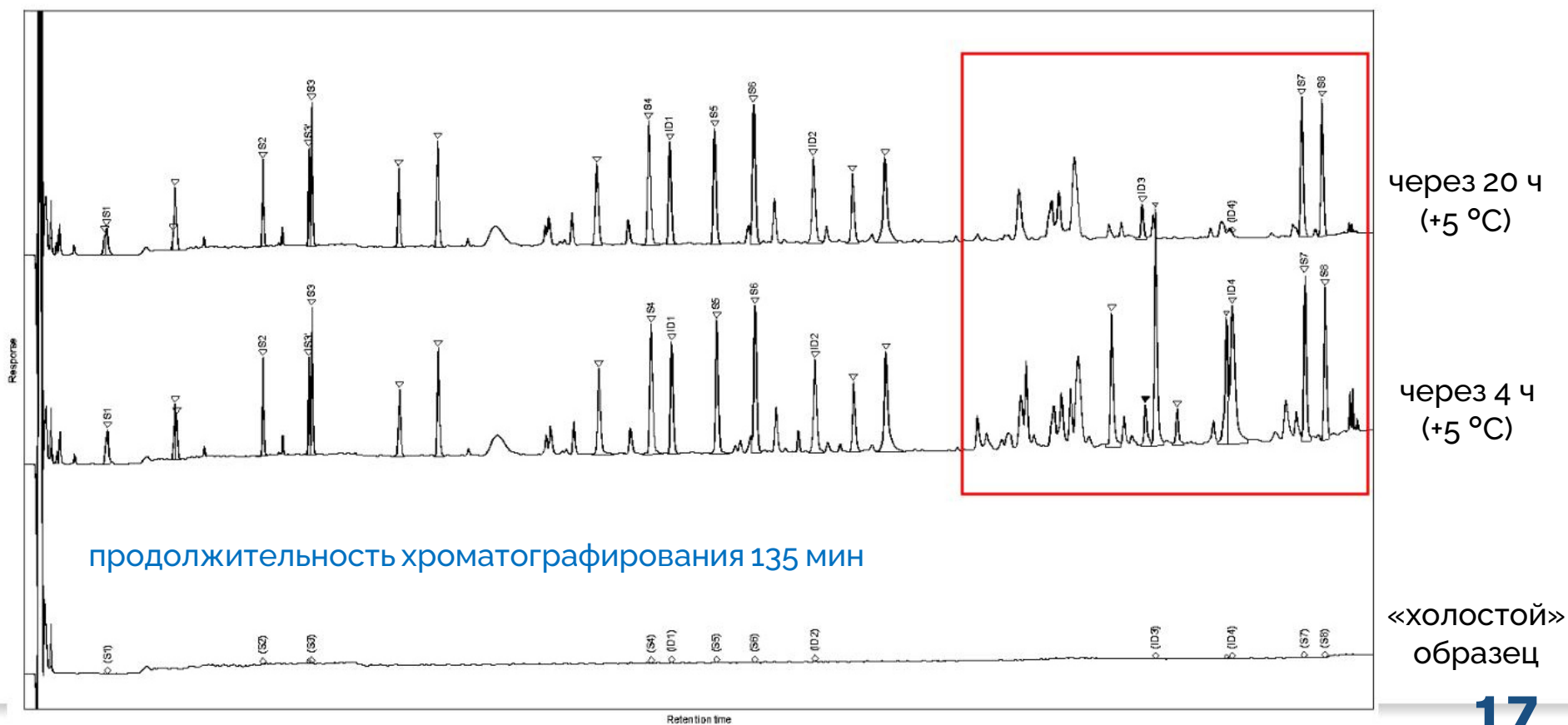


Концентрация Glu-C 20 U/мл
(субстрат Z-Phe-Leu-Glu-4-nitroanilide)
соответствует ~490 Sigma units/мл
(~0.55 мг/мл)



Некорректный срок годности

Пептидные карты стандартного образца МкАТ
(срок годности образца в НД: 72 ч при температуре 2-8 °С)





Детальное описание ВЭЖХ/УЭЖХ-системы, на которой была выполнена валидация:

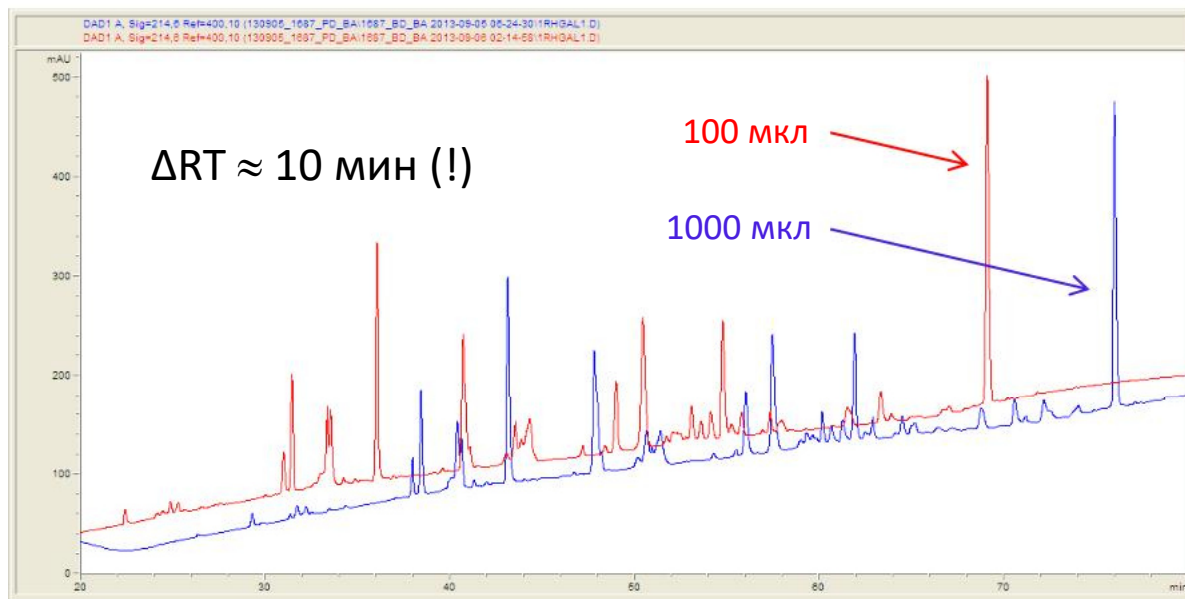
- конкретная модель (модели блоков), конфигурация и модификации (тип смешения (при низком/высоком давлении), объем смесителя, типичный объем задержки градиента, объем дозирующей петли, материал капилляров (биоинертный вариант или нет), объем и длина оптического пути проточной ячейки детектора, наличие предколоночных и постколоночных фильтров и т.д.);
- ВСЕ значимые параметры инструментального метода;
- Возможность / невозможность использования аналогичного по характеристикам оборудования или оборудования в отличающейся конфигурации должна подтверждаться валидационными данными;

Описание хроматографической колонки (и предколонки) :

- Полное наименование согласно каталогу фирмы-производителя, кат. №;
- Геометрические размеры, диаметр зерна сорбента и размер пор;
- Возможность / невозможность замены (валидированная)

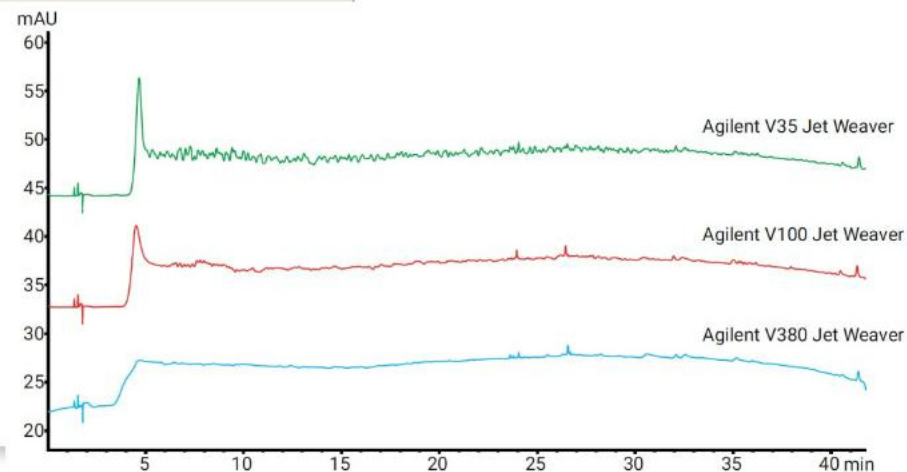


Влияние конфигурации системы на получаемую пептидную карту



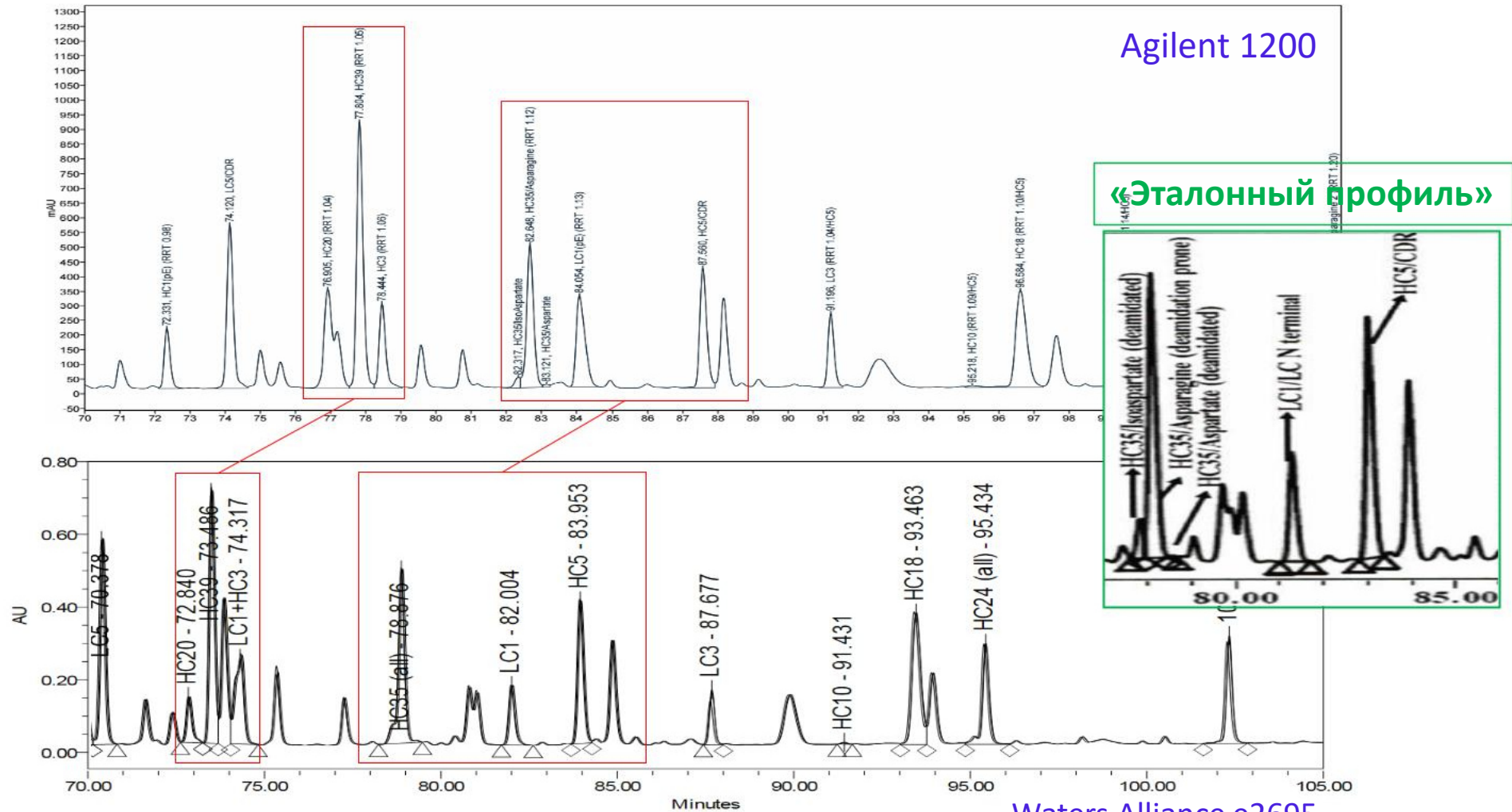
← Влияние объема дозирующей петли на времена удерживания пиков фрагментов (F = 0,2 мл/мин)

Влияние объема смешения на шум базовой линии ($\lambda=214 \text{ нм}$) →





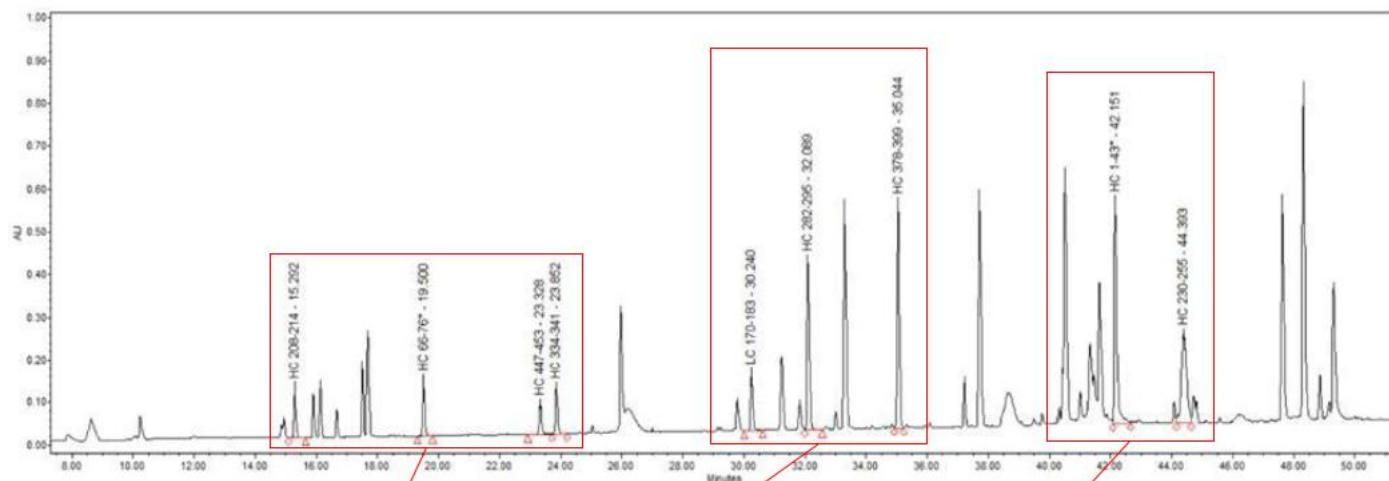
Замена хроматографической системы на «аналогичную»



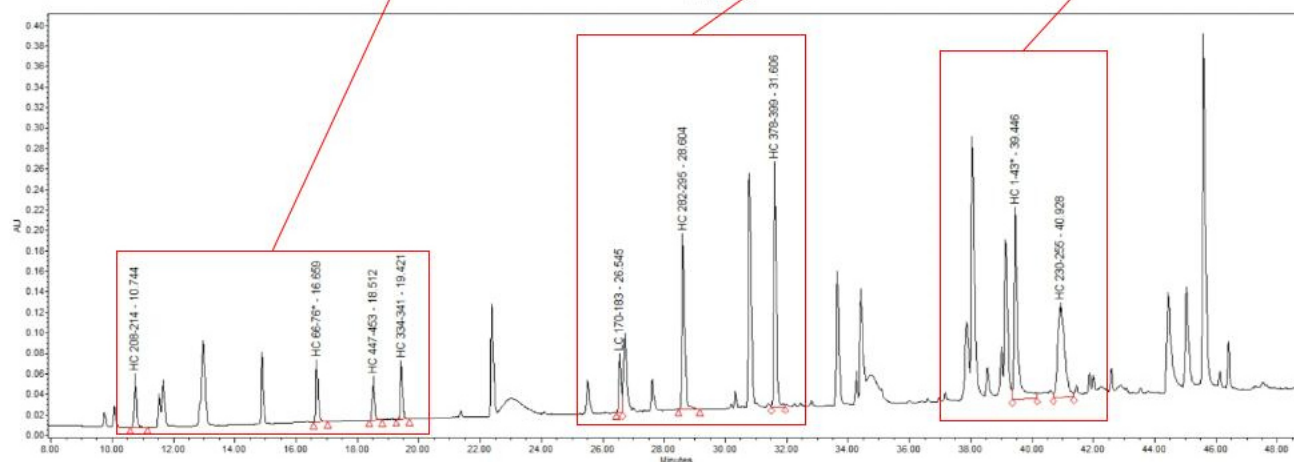
Хроматографическая колонка одна и та же



Влияние хроматографической колонки



Waters Acquity HSS T3 (C18)
100 x 2,1 мм (1,8 мкм)



Agilent Zorbax SB-C18 RRHD
100 x 2,1 мм (1,8 мкм)

Хроматографическая система одна и та же



Что должно быть в НД в рамках ППХС:

- типичная хроматограмма СО – «эталонный» профиль пептидной карты;
- **обоснованный** набор реперных пиков пептидных фрагментов, характерных для данного белка (для МкАТ – пептиды соответствующие CDR-участкам);
- временной интервал, в котором оцениваются пики или группы пиков;
- таблица с **валидированными** диапазонами приемлемых значений RRT и RI реперных пиков, **учитывающими возможную вариативность профиля**;
- описание возможной вариативности профиля пептидной карты, выявленной при валидации: **изменение времен удерживания, изменение интенсивности пика, «двоение» или совместное элюирование пиков, появление дополнительных пиков, изменение порядка выхода пиков и др. (приводят рисунки соответствующих типичных хроматограмм)**;
- «стандартная» проверка пригодности в соответствии с ОФС «Хроматография» (**оценка A_s , R_s , RSD (RI), RSD (RT), S/N**)



Что должно быть в НД в рамках подтверждения подлинности:

- валидированные диапазоны допустимых отклонений RI и RT пиков реперных пептидов на хроматограммах стандартного и испытуемого образцов;
- **критерий значимости** пиков остальных пептидов в профиле (например, «пики менее 0,5 % от общей площади пиков не учитываются»);
- визуальная оценка сопоставимости профилей пептидных карт стандартного и испытуемого образцов в части всех остальных **значимых** пиков:
 - контроль наличия/отсутствия значимых пиков, искажений профиля;
 - рекомендуется анализ хроматограммы смеси (1:1) стандартного и испытуемого p-ров.

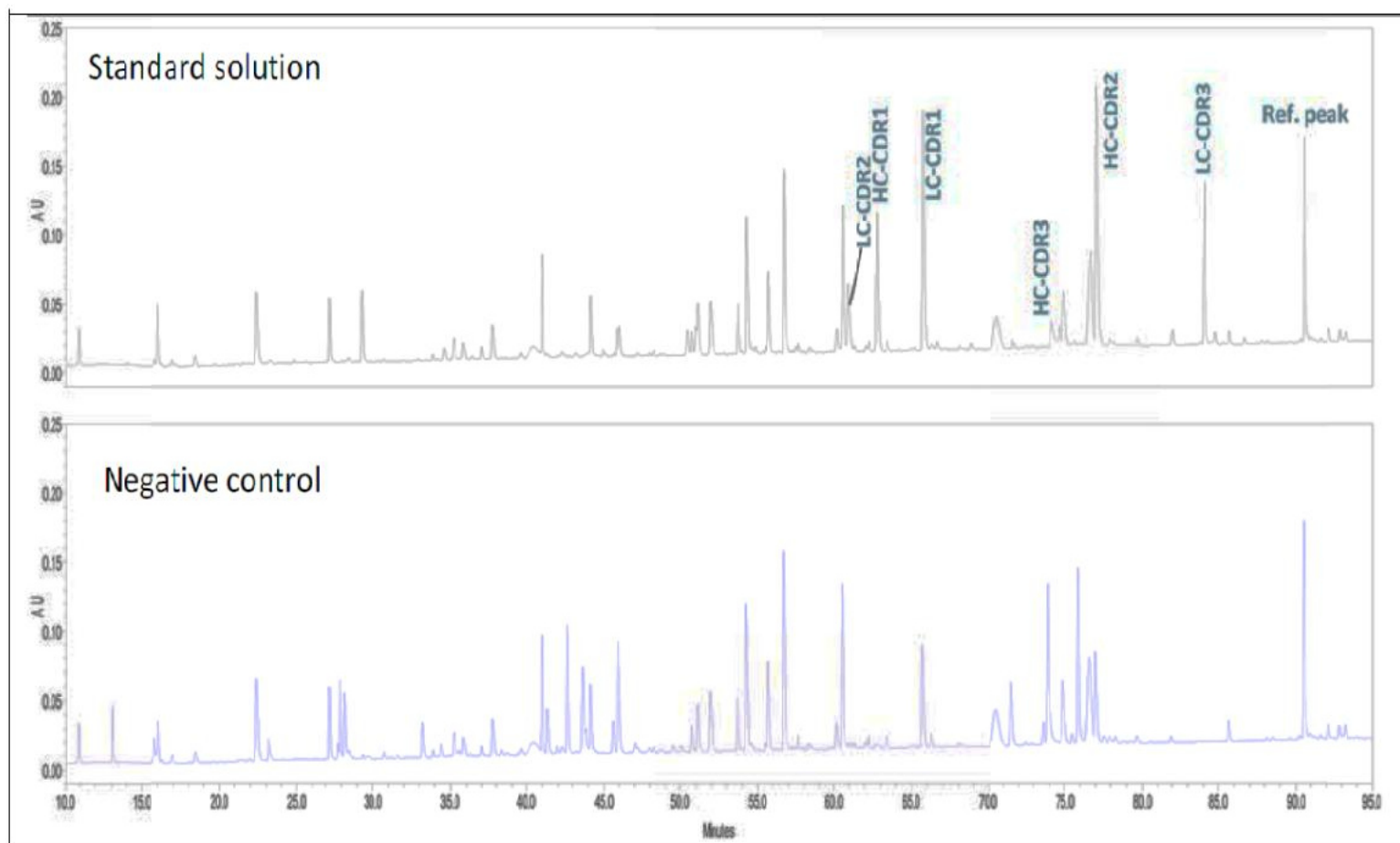


Ключевые моменты:

- подтверждение специфичности методики на примере сравнительного анализа других белков того же класса (например, других МкАТ), а не путём сравнения с плацебо;
- идентификация всех значимых пептидных фрагментов, соответствующих ≥ 95 % первичной аминокислотной последовательности белка;
- полноценное исследование робастности методики в отношении:
 - условий пробоподготовки (время, температура, pH);
 - используемого фермента (разные серии, разные производители), ключевых реактивов и материалов;
 - условий хроматографического разделения (аналогичное оборудование, разные серии колонок, аналогичные колонки);
- тщательное изучение возможной вариативности получаемого профиля и корректный выбор критериев пригодности и подтверждения подлинности



Подтверждение специфичности методики на примере сравнительного анализа МкАТ





RegLec – EAEC

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения