

## Подходы к определению высокомолекулярных агрегатов в глатирамоидах

Ю.В. Олефир, А.И. Лутцева, О.А. Ваганова, А.А. Бендрышев, Т.А. Ефремова

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

**Резюме:** Описаны подходы к выбору оптимальных хроматографических условий, позволяющих оценить содержание высокомолекулярных агрегатов в глатирамоидах — соединениях, относящихся к неббиологическим лекарственным средствам сложного химического строения. Установлено, что ускоренное образование агрегатов протекает в жестких условиях и в этом случае сопровождается изменением молекулярно-массового распределения основного соединения. При этом количество образовавшихся агрегатов относительно невелико. Образцы, не подвергавшиеся ускоренному старению, практически не содержат агрегатов. Уточнение состава и молекулярной массы образовавшихся агрегатов, а также и оценка их стабильности, являются предметом дальнейших исследований, что позволит рекомендовать подходы к стандартизации лекарственных препаратов, содержащих глатирамера ацетат.

**Ключевые слова:** глатирамоиды; глатирамера ацетат; эксклюзионная хроматография; высокомолекулярные соединения; агрегаты.

**Библиографическое описание:** Олефир ЮВ, Лутцева АИ, Ваганова ОА, Бендрышев АА, Ефремова ТА. Подходы к определению высокомолекулярных агрегатов в глатирамоидах. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2015; (4): 16–19.

### APPROACHES TO THE DEFINITION OF MACROMOLECULAR AGGREGATES IN GLATIRAMOIDS

Yu.V. Olefir, A.I. Lutseva, O.A. Vaganova, A.A. Bendryshev, T.A. Efremova

Federal State Budgetary Institution  
«Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products»  
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

**Abstract:** The approaches to the selection of the optimal chromatographic conditions to assess the content of high molecular weight aggregates in glatiramer acetate — compounds belonging to nonbiological medicines of complex chemical structure — are described. It is found that accelerated aggregate formation occurs under stringent conditions, and in this case it is accompanied by a change in the molecular weight distribution of a basic compound. The number of aggregates formed relatively small. Samples not subjected to accelerated aging are substantially free of aggregates. Clarification of the composition and the molecular weight of the resulting units, as well as an assessment of their stability, is the subject of further research, which will recommend approaches to standardization of pharmaceutical preparations containing glatiramer acetate.

**Key words:** glatiramoids; glatiramer acetate; size-exclusion chromatography; macromolecular compounds; aggregates.

**For citation:** Olefir YuV, Lutseva AI, Vaganova OA, Bendryshev AA, Efremova TA. Approaches to the definition of macromolecular aggregates in glatiramoids. Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin 2015; (4): 16–19.

В последние годы лекарственные средства на основе глатирамера ацетата привлекают к себе пристальное внимание как клиницистов, так и экспертов, оценивающих свойства данного соединения с целью стандартизации подходов к оценке его качества. В настоящее время широкое обсуждение свойств глатирамера ацетата связано с окончанием срока действия патента на референтный препарат, разработкой с целью последующей регистрации/одобрения для медицинского применения лекарственных средств сложного химического строения неббиологического происхождения в качестве воспроизведённых или биоаналогичных лекарственных препаратов — наряду с группами конвенциональных (низкомолекулярных) и биологических лекарственных средств [1].

Группа неббиологических лекарственных средств сложного химического строения довольно малочисленна и включает в себя препараты на основе липосом, углеводсодержащие комплексы (комплексные соединения) оксида железа (III) и глатирамоиды [2].

### СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ГЛАТИРАМЕРА АЦЕТАТА

Глатирамоиды представляют собой близкие по структуре соединения, содержащие в своём составе глатирамера ацетат. Глатирамера ацетат (ГА) представляет собой смесь случайных сополимеров различной длины, в состав которых входят четыре аминокислоты — L-глутаминовая кислота, L-аланин, L-тирозин и L-лизин с приблизительным молярным соотношением 0.14:0.43:0.09:0.34, средняя молекулярная масса ГА составляет 5000–9000 дальтон (Да) [3]. Производимый фирмой Sigma реактив Poly (Ala:Glu:Lys:Tyr) имеет молекулярное соотношение L-глутаминовой кислоты, L-аланина, L-тирозина и L-лизина 0.14:0.42:0.07:0.36 и среднюю молекулярную массу 1000–20000 Да [4].

В связи со своим строением глатирамера ацетат обладает свойствами и особенностями трех типов соединений. С одной стороны, его получают обычным химическим синтезом — из ангидридов N-карбокси-α-аминокислоты (мономеров) с использованием диэтила-

мина в качестве инициатора полимеризации. Бифункциональные аминокислоты в ГА защищены ( $\delta$ -NH<sub>2</sub> группа лизина защищена трифторацетильной группой, а  $\gamma$ -COOH группа глутаминовой кислоты защищена бензильной группой); полимеризация происходит за счет роста нормальных цепей путем присоединения молекул мономеров, без сшивания полимерных цепей [3]. Поэтому с точки зрения получения ГА относится к синтетическим фармацевтическим препаратам.

С другой стороны, глатирамер ацетат имеет огромное число аминокислотных последовательностей и таким образом не охарактеризован постоянной структурой и молекулярной массой, что объединяет его с полимерными соединениями. Средняя длина гетерогенных пептидов в составе глатирамоидов колеблется от 200 до 20 000 [1].

Для большинства полимеров и сополимеров аминокислот, входящих в состав ГА, характерно молекулярно-массовое распределение в диапазоне от 2500 до 20000 Да [3].

Кроме того, поскольку глатирамер ацетат состоит из последовательности аминокислот, по своей природе он является родственником белковых и пептидных соединений. Аминокислотная последовательность и размер получаемых полипептидов зависят от таких факторов как относительная реакционная способность активированных аминокислотных мономеров и условия проведения реакции, температура и продолжительность процесса расщепления [3].

Такая тройственность природы приводит к необходимости применения комбинации методов для оценки их качества и разработки нестандартных подходов к стандартизации лекарственных препаратов, содержащих в своём составе глатирамера ацетат.

На отечественном фармацевтическом рынке глатирамера ацетат представлен препаратом «Копаксон» фирмы «Тева» двух дозировок — 20 и 40 мг/мл. Указанный препарат одобрен для медицинского применения в развитых странах более 20 лет назад. В настоящее время единственным аналогом Копаксона, зарегистрированным FDA в апреле 2015 г., является препарат «Глатопа», фирмы «Sandoz». Вместе с тем, в связи с окончанием срока патента и высокой востребованностью препарата в ближайшем будущем можно ожидать выхода на рынок других производителей указанного лекарственного средства. Так, в Российской Федерации проводятся или уже завершены клинические испытания лекарственных препаратов, содержащих глатирамера ацетат.

По данным литературы, молекулы глатирамера могут образовывать агрегаты, хотя и не с такой легкостью, как обычные белковые молекулы [3].

Согласно научным публикациям, агрегатам свойственно обладать иммуногенностью, что делает их потенциально опасными примесями, в связи с чем возникает проблема их нормирования как в субстанциях, так и в готовых лекарственных формах [5].

Однако, в настоящий момент публикации, посвященные определению агрегатов в глатирамера ацетате и в его аналогах, практически отсутствуют.

Целью данной работы было обоснование подходов к выбору оптимальных хроматографических условий, позволяющих оценить содержание агрегатов как в исходном глатирамера ацетате (коммерчески доступном реактиве), а также и готовом лекарственном препара-

те, так и в тех же образцах, подверженных воздействию стрессовых условий.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Условия хроматографирования.** Для определения высокомолекулярных агрегатов глатирамера ацетата предпочтительным является метод эксклюзионной хроматографии, как наиболее часто используемый в целях определения агрегатов белковых соединений.

**Неподвижная фаза.** Поскольку глатирамера ацетат не имеет точной молекулярной массы, а является смесью полимеров и по строению несколько отличается от белковых молекул, имея линейную структуру, заранее оценить молярную массу образующихся агрегатов сложно. В связи с этим для определения диапазона масс, в котором необходимо проводить разделение, и выбора разделяющих систем представлялось целесообразным апробировать набор хроматографических колонок, перекрывающих разные диапазоны молекулярных масс. С этой целью использовались колонки TSKgel G2000SWXL, TSKgel G3000SWXL, TSKgel G4000SWXL (300x7.8мм), Superose 12 (300x10мм), Superdex 75 (300x10мм), HSPgel AQ (150x6мм). Колонки TSKgel серии SWXL являются более современными и обладают высокой эффективностью разделения за счет использования более мелкого зерна сорбента. Однако, по литературным данным [6] разделение маркеров молекулярных масс глатирамера ацетата (а следовательно, и агрегатов глатирамера ацетата) оптимально проводить на колонках типа Superdex, Sephacryl, Superose и Sephadex, основой матрицы которых является не силикагель, а декстран или агароза. Таким образом, вышеозначенный набор колонок с одной стороны перекрывает широкий диапазон молекулярных масс, а с другой стороны позволяет оценить влияние матрицы сорбента и выбрать матрицу, на которой неспецифические взаимодействия глатирата и агрегатов минимальны, а разделение между агрегатами и основным пиком наилучшее.

**Подвижная фаза.** В качестве подвижной фазы для фракционирования глатирамера ацетата могут быть использованы, согласно вышеприведенным литературным данным, ацетатный, фосфатный, цитратный буферные растворы. Применение в качестве подвижной фазы фосфатных буферных растворов представлялось нам наиболее перспективным, поскольку они обеспечивают наибольший диапазон значений pH и являются оптически наименее поглощающими.

Величина pH подвижной фазы оказывает существенное влияние на сорбцию как самого глатирамера ацетата, так и его агрегатов, поэтому выбор оптимального значения pH является критичным для проведения разделения. Для решения данной проблемы было изучено влияние значений pH подвижной фазы в диапазонах от 7.0 до 2,0 для колонок TSKgel, от 7.0 до 1,5 для колонок Superose 12 и Superdex 75, от 7.0 до 2,5 для колонки HSPgel AQ с учетом рекомендаций производителей колонок и собственного опыта работы на данных колонках. Хотя указанные диапазоны pH несколько ниже пределов, рекомендованных производителями для колонок, однако опыт работы с этими колонками показывает возможность работы при данных значениях pH в течение длительного времени.

**Скорость потока.** Поскольку значение скорости потока оказывает влияние на эффективность хромато-

графического разделения, а соответственно на продолжительность анализа, то в процессе исследования скорость потока варьировалась в диапазоне от 0,5 мл/мин до 1 мл/мин.

**Детектирование.** Детектирование проводилось с помощью детектора на диодной матрице в диапазоне длин волн от 200 до 360 нм. В дальнейшем для оценки наличия агрегатов была выбрана длина волны 210 нм. Данная длина волны обеспечивает наилучшее соотношение сигнал/шум для глатирамера ацетата и его агрегатов и близка одному из максимумов их поглощения. Следует отметить, что в зависимости от аналитической длины волны, используемой для детектирования и количественной оценки, варьировалась и нагрузка испытываемого образца на колонку, поскольку интенсивность поглощения глатирамера ацетата на разных длинах волн значительно отличается.

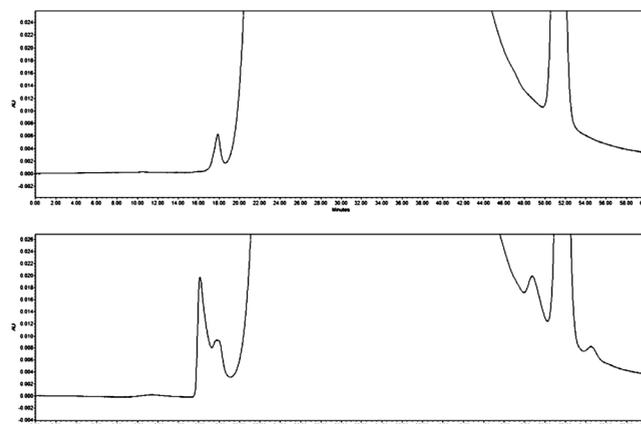
Учитывая, что температура разделяющей колонки может являться одной из причин образования агрегатов в образцах, то было принято решение проводить исследование при комнатной температуре.

**Исследуемые образцы.** В качестве объекта для исследования была выбрана доступная на рынке инъекционная форма глатирамера ацетата 20 мг в 1 мл и реактив Poly (Ala:Glu:Lys:Тур) фирмы Sigma.

Образование агрегатов у синтетических пептидов протекает в более жестких условиях по сравнению с обычными белковыми молекулами. Для получения значимых количеств агрегатов одна часть испытываемого образца глатирамера ацетата была подвергнута сравнительно длительной обработке в стрессовых условиях, которые заключались в тепловом воздействии при температуре 90 °С в течение 120 часов. Вторую часть испытываемых образцов подвергали воздействию ультрафиолетового облучения в течение 15 часов. Полученные образцы анализировали, последовательно варьируя вышеописанные параметры хроматографических условий разделения и добиваясь детектирования пика или пиков агрегатов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Влияние pH подвижной фазы.** В ходе эксперимента установлено, что очень важным параметром, влияющим на селективность определения агрегатов глатирамера ацетата, является pH. При значениях pH больше 3,5 пик агрегатов глатирамера ацетата не обнаруживался ни на одной хроматограмме, полученной с использованием вышеперечисленных колонок. Пики агрегатов глатирамера ацетата обнаруживались на хроматограммах только в диапазоне pH 3,5–1,5. При этом, при более кислых значениях pH пики были отделены более полно. Влияние pH на селективность требует дальнейшего тщательного исследования. Вероятным фактором, оказывающим влияние на разделение основного пика и агрегатов глатирамера ацетата, является подавление заряда карбоксильных групп, присутствующих во входящих в состав глатирамера ацетата аминокислотах, и, как следствие, некоторое изменение конфигураций молекул агрегатов и основного соединения. Оптимальными значениями pH подвижной фазы являются 3,0–1,5 (в зависимости от используемой хроматографической колонки). Следует, однако, заметить, что для обеспечения сохранности хроматографической колонки она должна быть промыта водой сразу же после окончания серии испытаний.



**Рис. 1.** Хроматограммы коммерчески доступного образца лекарственного препарата до и после стрессового термического воздействия (фрагмент). Колонка Superose 12, pH подвижной фазы 1,5, Длина волны детектирования 210 нм, скорость потока 0,5 мл/мин

**Влияние природы неподвижной фазы.** На колонках TSKgel G2000SWXL, TSKgel G4000SWXL и HSPgel AQ не удалось добиться отделения пика агрегатов от основного пика глатирамера ацетата ни при одном из использованных значений pH даже при последовательно соединении двух хроматографических колонок. При этом, по-видимому, на разделение негативно влияет как неподходящий диапазон размера пор, так и дополнительные взаимодействия, возникающие с силикагельной матрицей сорбентов.

На колонках TSKgel G3000SWXL, Superose 12 и Superdex 75 при использовании элюентов с pH 3,0–1,5 на хроматограммах образцов, подвергнутых стрессовому воздействию, наблюдали появление пика агрегатов, предшествующего основному пику. Спектр поглощения пика агрегатов соответствовал спектру поглощения основного пика. В случае колонки TSKgel G3000SWXL пик агрегатов представлял собой пик-наездник на переднем фронте основного пика, что несколько затрудняло его корректную количественную оценку. На колонках Superose 12 и Superdex 75 наблюдалось более полное отделение пика агрегатов от основного соединения. Вероятнее всего, лучшая разделяющая способность связана с иной природой матрицы неподвижных фаз, колонок Superose 12 и Superdex 75, а также различающимися диапазонами размеров пор. Колонка Superose 12 также показала несколько лучшую разделяющую способность по сравнению с колонкой Superdex 75.

**Влияние скорости потока подвижной фазы.** В ходе экспериментов выяснилось, что влияние скорости потока подвижной фазы в диапазоне 0,5–1,0 мл/мин на разделение глатирамера ацетата и его агрегатов в целом невелико, хотя снижение скорости потока и позволяет добиться увеличения эффективности. Исходя из соображений сокращения продолжительности анализа возможно использование скорости потока 1 мл/мин.

**Оценка необходимой продолжительности анализа.** При проведении экспериментов выяснилось, что на хроматограммах образцов присутствуют небольшие системные пики с временами удерживания больше, чем мертвое время используемых колонок. В связи с этим, во избежание перекрытия данных пиков с пиками агрегатов на начальном участке последующих хроматограмм, необходимо увеличить продолжительность ана-

лиза до трех-четырёхкратного времени удерживания основного пика (в зависимости от типа используемой колонки).

**Выбор температуры образцов в автосэмплере.** Исходя из полученных в ходе эксперимента данных, можно сделать заключение, что образцы глатирамера ацетата стабильны в течение по меньшей мере трех суток при комнатной температуре. Таким образом, температура образцов в автосэмплере может быть установлена как на уровне комнатной температуры, так и на уровне 2–8 °С.

**Исследование состаренных образцов глатирамера ацетата.** В ходе эксперимента установлено, что как длительное воздействие повышенной температуры, так и воздействие ультрафиолетового излучения приводит к образованию агрегатов глатирамера ацетата. Агрегаты могут элюироваться не одним, а несколькими пиками или одним пиком искаженной формы, что говорит о вероятном образовании нескольких форм или соединений агрегатов. Однако, поскольку полного разделения между пиками форм агрегатов наблюдается не всегда, и количественная оценка единичных соединений представляется неточной, целесообразно оценивать суммарное содержание агрегатов.

В образцах, не подвергнутых стрессовому воздействию, агрегаты либо отсутствовали, либо присутствовали в следовых количествах (менее 0,05% — предела количественного определения).

При оценке содержания агрегатов в образцах, подвергнутых стрессовым воздействиям, обнаруженное количество агрегатов ни в одном из случаев не превышало 0,1% от площади основного пика. Данный факт свидетельствует о высокой стабильности соединения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шварц ГЯ, Раменская ГВ. Анализ причин практической невозможности создания генериков копаксона. Химико-фармацевтический журнал 2012; 46(11): 24–29.
2. Шварц ГЯ, Раменская ГВ. Некоторые вопросы регулирования обращения небелковых лекарственных средств сложного химического строения. Химико-фармацевтический журнал 2015; 49(4): 3–10.
3. Varkony H, Weinstein V, Klinger E, Sterling J, Cooperman H, Komlash T, Ladkani D, Schwartz R. The glatiramoid class of immunomodulator drugs. Expert Opinion Pharmacother. 2009; 10(4): 657–68.
4. Sigma Aldrich Catalog. Available from: <http://www.Simaldrich.com/catalog/search/P1152>.
5. Rosenberg AS. Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective. The AAPS Journal 2006; 8(3): 501–7.
6. Glatiramer Acetate Molecular Weight Markers. Patent WO/2012/016042.

#### ОБ АВТОРАХ:

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

*Олефир Юрий Витальевич.* Генеральный директор, д-р мед. наук.

*Лутцева Анна Ивановна.* Заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

*Ваганова Ольга Александровна.* Начальник лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. фарм. наук.

*Бендрисhev Александр Александрович.* Главный эксперт лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук.

*Ефремова Татьяна Александровна.* Эксперт 2-й категории лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

#### АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

Ефремова Татьяна Александровна; EfremovaTA@expmed.ru

Следует отметить, что образование агрегатов глатирамера ацетата протекает в гораздо более жестких условиях, менее интенсивно и менее воспроизводимо, чем образование агрегатов у обычных белковых молекул.

В процессе исследования отмечалось искажение формы пика основного соединения после воздействия стрессовых условий по сравнению с исходными образцами, что может свидетельствовать о значительном изменении молекулярно-массового распределения основного соединения.

#### ВЫВОДЫ

При изучении возможности определения агрегатов глатирамера ацетата в различных хроматографических условиях наилучшие результаты разделения глатирамера ацетата и его агрегатов достигаются при рН подвижной 2,0–1,5 и использовании эксклюзионных разделяющих колонок на основе агарозы или декстрана. Установлено, что ускоренное образование агрегатов протекает в жестких условиях и в этом случае сопровождается изменением молекулярно-массового распределения основного соединения. При этом количество образовавшихся агрегатов относительно невелико. Образцы, не подвергавшиеся ускоренному старению, практически не содержат агрегатов. Подробное изучение влияния рН подвижной фазы, уточнение состава и молекулярной массы образовавшихся агрегатов, а также и оценка их стабильности являются предметом дальнейших наших исследований, что позволит рекомендовать подходы к стандартизации лекарственных препаратов, содержащих глатирамера ацетат, а следовательно и оценки их взаимозаменяемости.

#### REFERENCES

1. Shvarts GYA, Ramenskaya GV. An analysis of the causes of the practical impossibility of creating generic Copaxone. Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal 2012; 46(11): 24–29 (in Russian).
2. Shvarts GYA, Ramenskaya GV. Some questions of circulation regulation of nonbiological medicinal products of complex chemical structure. Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal 2015; 49(4): 3–10 (in Russian).
3. Varkony H, Weinstein V, Klinger E, Sterling J, Cooperman H, Komlash T, Ladkani D, Schwartz R. The glatiramoid class of immunomodulator drugs. Expert Opinion Pharmacother. 2009; 10(4): 657–68.
4. Sigma Aldrich Catalog. Available from: <http://www.Simaldrich.com/catalog/search/P1152>.
5. Rosenberg AS. Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective. The AAPS Journal 2006; 8(3): 501–7.
6. Glatiramer Acetate Molecular Weight Markers. Patent WO/2012/016042.

#### AUTHORS:

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

*Olefir YuV.* Director General. Doctor of Medical Sciences.

*Lutseva AI.* Deputy head of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

*Vaganova OA.* Head of Laboratory of biotech drugs of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

*Bendryshev AA.* Chief expert of Laboratory of biotech drugs of Test Center of Quality Expertise of Medicines. Candidate of Chemical Sciences.

*Efremova TA.* 2nd category expert of Laboratory of biotech drugs of Test Center of Quality Expertise of Medicines.