**Оценка подлинности структуры ОФС**

**рекомбинантного**

**интерферона альфа-2b методом**

**пептидного картирования Вводится впервые**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для оценки подлинности структуры рекомбинантного интерферона альфа-2b методом пептидного картирования с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Профиль хроматограммы испытуемого раствора после ферментативного гидролиза трипсином должен принципиально соответствовать профилю хроматограммы стандартного раствора после ферментативного гидролиза трипсином. Активность и чистота различных серий и производителей трипсина может отличаться и, соответственно, влиять на степень и характер гидролиза. Необходимо использовать свободный от химотрипсина трипсин достаточной активности (рекомендуемая активность не менее 8000 МЕ/мг). Пептидная карта должна быть информативной и содержать пептиды, специфически характеризующие исследуемый белок. В случае использования стандартного образца, охарактеризованного по временам удерживания реперных пиков, процедура его применения должна содержать информацию о трипсине, использованном при его аттестации.

Хроматограммы метиониновой и безметиониновой форм интерферона альфа-2b различаются. Для оценки подлинности безметиониновой формы интерферона рекомендуется использовать соответствующий международный стандартный образец интерферона альфа-2b CRS . Для оценки подлинности метиониновой формы интерферона альфа-2b рекомендуется использовать отраслевой/национальный стандартный образец или стандартный образец предприятия, аттестованный соответствующим образом.

**Пептидное картирование**

Концентрации испытуемого и стандартного раствора должны быть одинаковыми в диапазоне 0,3-1,0 мг/мл. Допустимую концентрацию данных растворов определяют при валидации методики.

К 0,050 мл испытуемого и стандартного раствора прибавляют 0,016 мл раствора для протеолитического расщепления, перемешивают и помещают в термостат при температуре (37±1) 0С. Через 18 ч прибавляют 0,2 мл 6М раствора гуанидина гидрохлорида, перемешивают и прибавляют 0,007 мл 2М раствора дитиотреитола и 0,007 мл воды, перемешивают и помещают пробирку в термостат при температуре (99±1) 0С на 1 мин. Через 1 мин пробирку вынимают из термостата, охлаждают до температуры (2-8) 0С. Срок годности раствора 7 сут при хранении при температуре от 2 до 8 0С.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 100 × 4,6 мм, заполненная октадецилсилил (C18) силикагелем, диаметр частиц 5 мкм, размер пор 300Å. |
| Скорость потока | 1 мл/мин |
| Температура колонки | (30 ± 1) °С |
| Детектор | УФ детектор, длина волны 214 нм  |
| Объем пробы  | 100 мкл |
| Порядок проведения анализа | По одной инжекции: стандартный раствор, испытуемый раствор, стандартный раствор  |

Программа градиента:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Интервал, мин | Элюент А, % об./об. | Элюент В, % об./об. |
| 0→8 | 100 | 0 |
| 8→68 | 100→40 | 0→60 |
| 68→72 | 40 | 60 |
| 72→75 | 40→100 | 60→0 |
| 75→80 | 100 | 0 |

Критерии пригодности хроматографической системы*.* Для оценки пригодности хроматографической системы необходимо выполнение требований ОФС.1.7.2.0035.18 «Пептидное картирование», а также следующих условий:

- абсолютное (для 1-го или 2-х характеристических пиков) и относительное (для остальных характеристических пиков) время удерживания на хроматограмме стандартного раствора должно соответствовать установленным величинам\*;

- различие времен удерживания любого из пиков на хроматограмме стандартного раствора в начале и в конце серии измерений не должно быть более величины, обоснованной материалами по валидации.

Учет результатов.

Профиль хроматограммы испытуемого раствора после ферментативного гидролиза трипсином должен принципиально соответствовать профилю хроматограммы стандартного раствора. Характеристические пики на хроматограмме испытуемого образца должны соответствовать требованиям*,* установленным на основании валидации методики. Различие времен удерживания характеристических пиков на хроматограмме испытуемого и стандартного растворов должны быть не более величины, обоснованной материалами по валидации.

**Примечания.**

1*.* Элюент А*.*50 - 80 мл воды помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 1 мл (1,48 г) трифторуксусной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Перед использованием раствор дегазируют любым удобным способом. Срок годности раствора - 7 сут при хранении при температуре от 15 до 25 °С плотно укупоренном флаконе.

2. Элюент В*.* 50 - 80 мл воды помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл (1,48 г) трифторуксусной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивают. Перед использованием раствор дегазируют любым удобным способом. Срок годности раствора - 7 сут при хранении при температуре от 15 до 30 °С в плотно укупоренном флаконе.

3. 0,01 М раствор кислоты хлористоводородной*.* 50 - 70 мл воды помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 8 мл
37 % хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора - 6 мес. при хранении при температуре от 15 до 30 °С.

4. Раствор трипсина с концентрацией 1 мг/мл*.* 13,5 мл воды помещают в пробирку, прибавляют 1,5 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты и перемешивают. Растворяют трипсин в данном растворе для получения раствора с концентрацией 1 мг/мл. Срок годности раствора - 1 год при хранении при температуре не выше минус 18 0С. Перед применением раствор размораживают при температуре от 15 до 30 0С. Повторное замораживание не допускается.

5. 1 М фосфатный буферный раствор рН 8,0. 13,61 г дигидрофосфата калия помещают в стеклянный стакан вместимостью 100 мл, прибавляют 60 мл воды и растворяют при перемешивании на магнитной мешалке и нагревании до 40 – 70°С. Доводят рН (потенциометрически) до значения 8,0 раствором натрия гидроксида 5М. Помещают раствор в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор годен в течение 1 месяца при хранении при температуре от 2 до 8 ºС.

6. Раствор для протеолитического расщепления*.* 0,016 мл
1 М фосфатного буферного раствора рН 8,0 помещают в пробирку вместимостью 0,6 мл, прибавляют 0,028 мл раствора трипсина с концентрацией 1 мг/мл, 0,036 мл воды и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

7. 2 М раствор дитиотреитола (ДТТ).0,308 г дитиотреитола помещают в пробирку центрифужную вместимостью 1,7 мл, прибавляют воду до массы 1,0 г и перемешивают. Срок годности раствора - 6 мес. при хранении при температуре не выше минус 18 °С.

8. 6 М раствор гуанидина гидрохлорида*.* 57,3 г гуанидина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды и перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора - 6 мес. при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

\*Поскольку профиль пептидной карты может меняться в зависимости от чистоты и активности трипсина, времена удерживания характеристических пиков должны быть указаны в нормативной документации производителя. Рекомендованное количество обоснованных характеристических пиков не менее 4-х.