

© Коллектив авторов, 2017

Ю. В. Скорняков¹, А. А. Дерябин², О. В. Скорнякова³

АКСОГЛАТИРАН®ФС — ВОСПРОИЗВЕДЕННЫЙ ПРЕПАРАТ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА КОПАКСОН® НА ОСНОВЕ ГЛАТИРАМЕРА АЦЕТАТА

¹ ООО “НордикКемикал”, Россия Минздрава Россия, Москва; e-mail: skorn506@mail.ru

² ООО “Пермская Химическая Компания”, Россия, Пермь.

³ ФГБОУ ВО “Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова”, Россия, Москва.

Приведены общие сведения о синтезе и свойствах субстанции глатирамера ацетата (ГА), а также принципы и средства доказательства фармацевтической идентичности субстанции ГА и препаратов на ее основе — Копаксона® и Аксоглатираана®ФС. Получено регистрационное удостоверение РФ № ЛП-003572 от 18.04.2016 г. на первый отечественный препарат Аксоглатиран®ФС, содержащий ГА.

Ключевые слова: глатирамера ацетат; рассеянный склероз; воспроизведенный препарат; Копаксон®; Аксоглатиран®ФС.

Статистический полипептид глатирамера ацетат (ГА) под торговым наименованием Копаксон® известен почти 20 лет. Использование препаратов ГА в терапии рассеянного склероза (РС) впервые позволило перейти от симптоматического к системному лечению этого заболевания [1, 2]. В 2015 г. US Food and Drug Administration (FDA) зарегистрировала воспроизведенный препарат (дженерик) Glatopa™ [3].

В 2014 г. FDA зарегистрирован диметилфумарат, действие которого вообще трудно поддается оценке [4].

ГА выделен в отдельный класс ЛС специфических иммуномодулирующих препаратов, специально разработанных для лечения РС [5]. Глатирамера ацетат CAS№ 147245-92-9 (Glatiramer acetate, Copolymer 1, Cop-1, Сорахоне, Protiramer, TV 5010), это получаемый синтетическим путем ацетат статистического со-

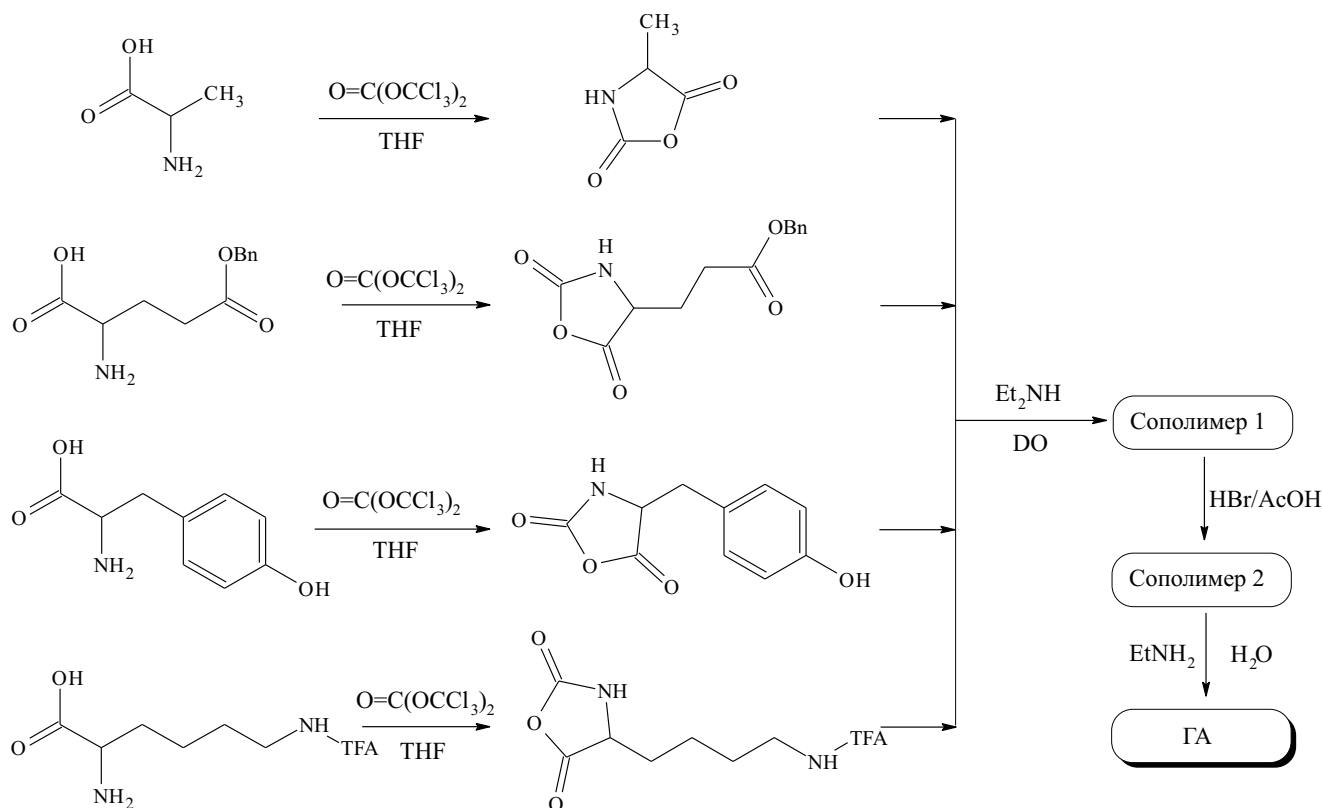


Рис. 1. Схема синтеза ГА.

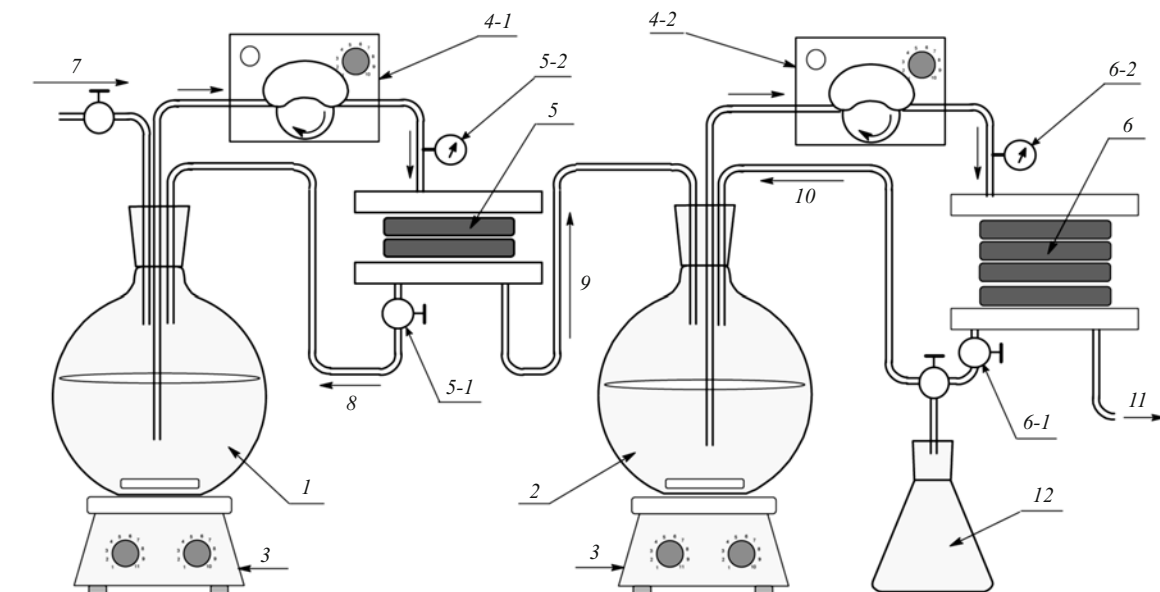


Рис. 2. Схема двухступенчатой ультрафильтрационной очистки раствора ГА: 1 – емкость с исходным неочищенным раствором ГА; 2 – емкость-накопитель очищенного раствора ГА; 3 – магнитная мешалка; 4 – насосы перистальтические; 5 – установка с ультрафильтрационными мембранами с пределом отсеивания по молекулярной массе 100 кДа; 5-1 – регулировочный вентиль установки 5; 5-2 – манометр входного давления раствора установки 5; 6 – ультрафильтрационные мембраны с пределом отсеивания по молекулярной массе 5 кДа; 6-1 – регулировочный вентиль установки 6; 6-2 – манометр входного давления раствора установки 6; 7 – подача воды апирогенной Super-Q Ω 18 МОм/см; 8 – возврат раствора на рециркуляцию в емкость 1; 9 – раствор, прошедший через мембрану 100 кДа в емкость 2; 10 – возврат раствора на рециркуляцию и концентрирование в емкость 2; 11 – сброс воды, прошедшей через мембрану 5 кДа; 12 – сборник концентрированного очищенного раствора ГА.

полимера 4 природных аминокислот — L-аланина, L-глутаминовой кислоты, L-лизина и L-тирозина в соотношении (0,3 – 0,56):(0,12 – 0,16):(0,25 – 0,42):(0,074 – 0,106). Средняя молекулярная масса сополимера, определяемая методом гелепроникающей хроматографии, находится в интервале от 5 до 14 кДа (как правило, около 8 – 11 кДа) и подчиняется статистическому распределению Гаусса. Также ГА характеризуется определенным интервалом времени удерживания многокомпонентного пика на ВЭЖХ хроматограмме с использованием обращенной фазы C-18 [4, 6, 7].

В связи со сложным строением и множественностью разнообразных пептидных молекул в составе ГА (10^{23} – 10^{24} различных молекул в 1 кг) обычный подход к эквивалентности воспроизведенных препаратов недостаточен и недостоверен. Авторы [8, 9] считают воспроизведение субстанции ГА невозможным. В любом случае необходим комплексный подход к сравнению этих препаратов и их свойств. Авторы [10] предложили четырехступенчатую структуру доказательства идентичности для своего воспроизведенного препарата ГА Glatora™. Этот подход позволяет дать исчерпывающее заключение о сходстве и различии таких сложных и многокомпонентных субстанций как ГА:

1. Идентичность исходных материалов и реагентов, а также основ химических превращений.
2. Идентичность и возможность поэтапного контроля протекания реакций полимеризации, деполимеризации и очистки.
3. Идентичность физико-химических свойств.

4. Идентичность иммунологических свойств по действию препарата.

На основании этой системы в данной статье описывается процесс создания и достижения идентичности субстанции ГА и представлены данные, демонстрирующие идентичность препаратов Копаксон® и Аксоглатиран®ФС на основе ГА. В связи с тем, что препарат Аксоглатиран®ФС прошел открытое сравнительное рандомизированное клиническое исследование, отчет о котором опубликован [11], можно считать, что идентичность клинической эффективности указанных препаратов доказана.

Экспериментальная часть

Все лабораторные эксперименты проводились в лаборатории НИОКР ООО “НордикКемикал”, Москва. Технологическая отработка и производство субстанции ГА проведено в ООО “Пермская Химическая Компания”, Пермь. Разработка лекарственной формы и фасовка ГЛС Аксоглатиран®ФС осуществлялась ООО “Натива” Красногорский р-н, с. Петрово-Дальнее.

Анализы по Фармакопее ГФ12 и ГФ13 и НД на ГА и Аксоглатиран®ФС осуществлялись аналитическими лабораториями ООО “Пермская Химическая Компания”, ООО “НордикКемикал” и ООО “Натива”.

Частичная деградация по Эдману осуществлялась на секвенаторе белков Shimadzu PPSQ-33B. Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на Jasco J-815 circular dichroism (CD) spectrometer (Japan). Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 при частоте 100,61 МГц для ядер

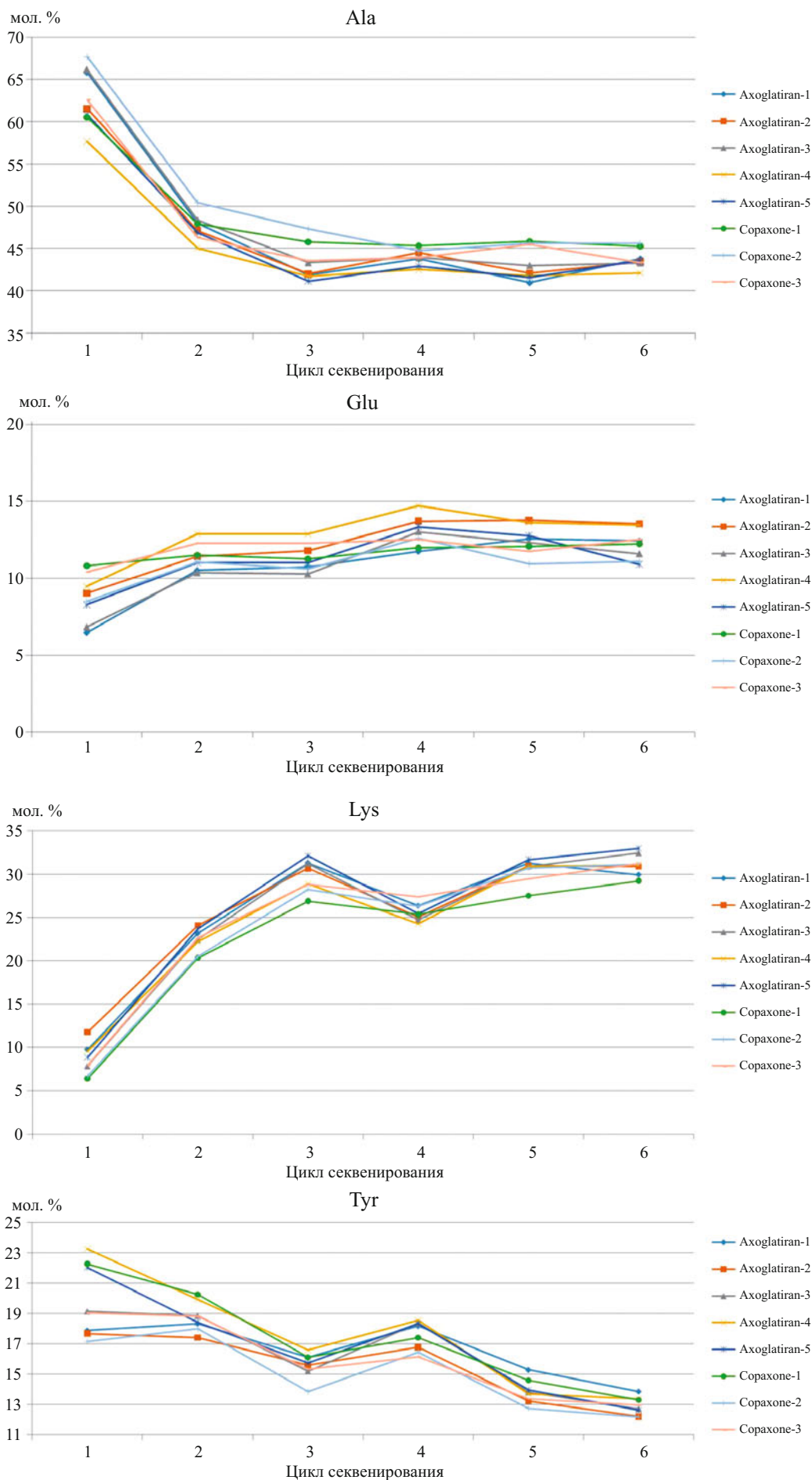


Рис. 3. Частичное секвенирование по Эдману образцов препаратов Копаксон® и Аксогллатиран®ФС на основе ГА. По оси ординат — процентное содержание аминокислоты в смеси.

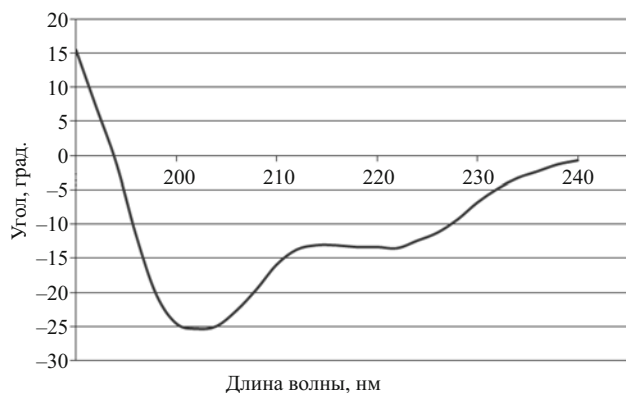


Рис. 4. Спектр КД водных растворов образцов препаратов Копаксон® и Аксоглатиран®ФС на основе ГА.

^{13}C в растворе D_2O . Спектры ИК регистрировали на FT-IR спектрометре Shimadzu IRAffinity-1S и приставкой нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в водном растворе в диапазоне $550 - 4000 \text{ см}^{-1}$.

Результаты и их обсуждение

Идентичность исходных материалов и реагентов, а также основ химических превращений

Все стадии процесса производства ГА хорошо изучены. Основные параметры процесса, включая последовательность стадий, реагенты, растворители и условия известны [12]. Процесс производства ГА включает 7 химических стадий (рис. 1) и очистку, которую нужно считать отдельной технологической стадией.

Первые 4 стадии — это синтез мало стабильных N-карбоксиянгидридов из соответствующих аминокислот (NCA) L-Ala-OH, L-H-Glu(OBn)-OH, L-Tyr-OH и L-(N^εTFA Lys-OH, 5 стадия — иницируемая диэтиламиноом полимеризация NCA, 6 стадия — снятие бензильных защитных групп с остатков глутаминовой кислоты и регулировка средней молекулярной массы пептида (частичная деполимеризация), 7 стадия — удаление TFA-защитных групп с фрагментов лизина. Финальная очистка и концентрирование осуществляется методом двухступенчатой ультрафильтрации (рис. 2) с последующей лиофилизацией концентрированного раствора.

Способ получения поли- α -аминокислот, исходя из NCA, предложенный авторами [13] еще в 1958 г., в дальнейшем развит во многих открытых публикациях [14–16], и отличается тем, что существует только 1 возможность взаимодействия — между растущей цепью полимера и молекулой мономера [17]. За счет этой особенности возможно в узких пределах регулировать среднюю молекулярную массу полученного полимера и интервал (распределение) молекулярных масс. Химизм процесса, а также механизмы роста и обрыва цепи при индуцируемой полимеризации карбоксиянгидридов α -аминокислот описаны в обзорах, первый из которых вышел в 1964 г. [18], а затем в 2009 г. [19]. В последние 20 лет опубликована масса патентов на тему полимеризации и сополимеризации

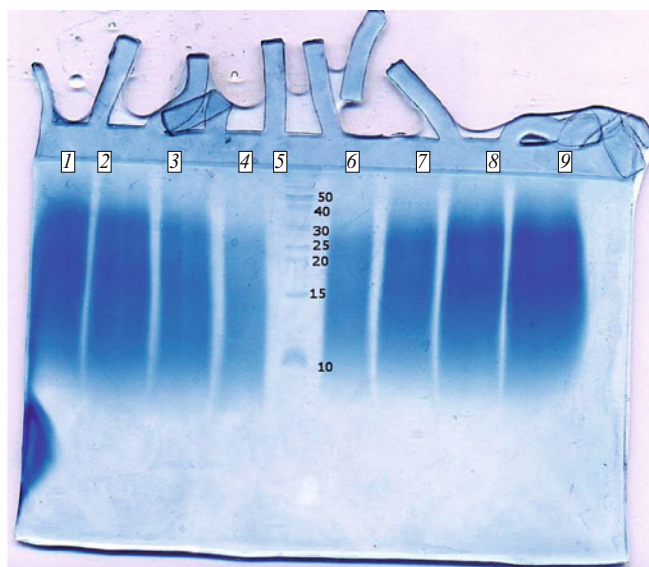


Рис. 5. Электрофореграмма образцов Копаксона® и Аксоглатиран®ФС на основе ГА. Копаксон®: 1 дорожка — 40 мкл, 2 дорожка — 30 мкл, 3 дорожка — 20 мкл, 4 дорожка — 10 мкл; Аксоглатиран®ФС: 6 дорожка — 10 мкл, 7 дорожка — 20 мкл, 8 дорожка — 30 мкл, 9 дорожка — 40 мкл. На дорожке 5 нанесены маркеры молекулярных масс (производитель Fermentas, кат. № SM0661). Окраска геля проводилась раствором Coomassie Brilliant Blue R-250 (производитель Sigma-Aldrich, кат. № 27816).

карбоксиянгидридов α -аминокислот, но химизм и направленность процесса остаются неизменными.

Идентичность и возможность постадийного контроля протекания реакций полимеризации, деполимеризации и очистки

Продукты сополимеризации (т. н. сополимер 1) и первой стадии снятия защитных групп (сополимер 2) в связи с практической нерастворимостью в большинстве растворителей с трудом поддаются физико-химическому анализу, однако из результатов определенных анализов конечного ГА можно получить представление о скорости и направлении протекания этих сложных процессов.

Нами показано, что варьирование пропорций компонентов NCA аминокислот и инициатора приводит к широкому спектру сополимеров различного аминокислотного состава и распределения молекулярных масс. Причем наблюдается явная зависимость характеристик конечного ГА от пропорций и концентраций исходных компонентов и инициатора. Нами показано, что аминокислотный состав ГА, реализуемый в препарате Копаксон®, стабильно достижим и воспроизводим в промышленных масштабах. Проведение полимеризации в идентичных условиях приводит к образованию одинакового продукта. Снятие защитных групп с фрагментов глутаминовой кислоты действием 33 % раствора HBr в ледяной уксусной кислоте приводит к частичному секвенированию пептидной цепи, главным образом, с N-конца, что позволяет корректировать среднюю молекулярную массу конечного сополимера. Снятие трифторацетильных групп с фрагментов

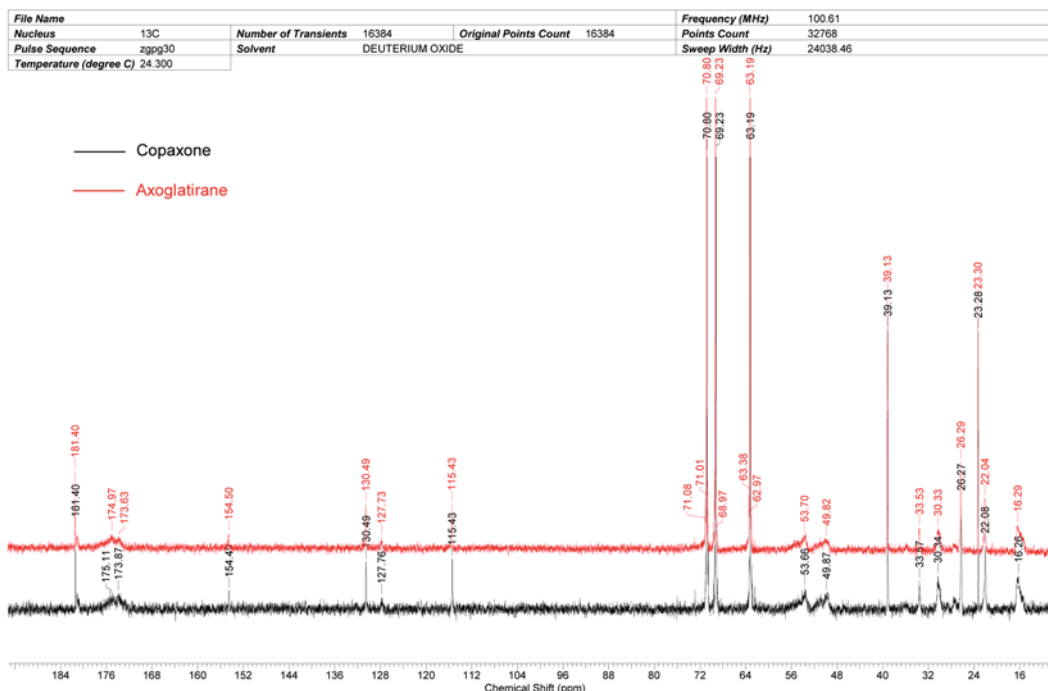


Рис. 6. Общий вид спектра ¹³C образцов ГЛС на основе ГА в D₂O.

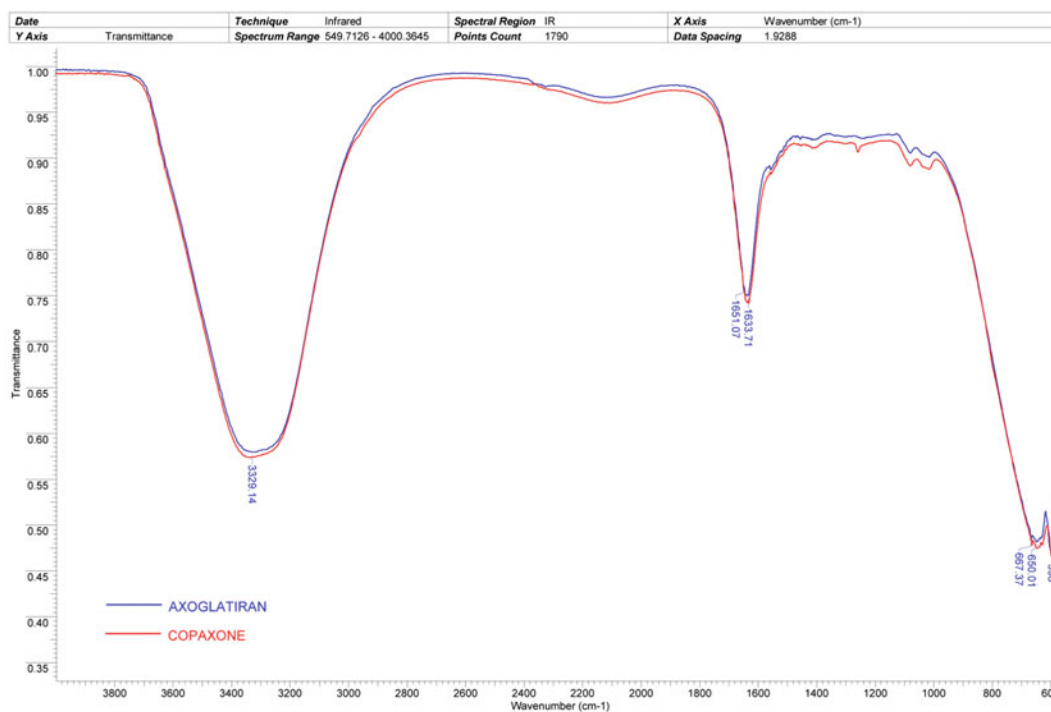


Рис. 7. ИК-Фурье образцов Копаксон® и Аксогллатиран®ФС на основе ГА.

лизина никак не влияет на результирующую молекулярную массу сополимера.

Результаты частичного сквенирования по Эдману образцов активных фармацевтических субстанций Копаксон® и Аксогллатиран®ФС (рис. 3) показали не только полную идентичность относительного содержания аминокислот с N-конца полипептида, но и позволили сделать выводы о некоторой селективности процесса

частичной деполимеризации под действием системы HBr/AcOH.

Видно, что пептидных последовательностей, оканчивающихся с N-конца остатком лизина, более чем в 3 раза меньше, чем среднестатистическое содержание этой аминокислоты в составе полипептида, и наоборот, тирозина и аланина с N-конца заметно больше, чем в среднем по аминокислотному составу. Сходство

поведения полипептидных цепей, взятых из различных промышленных партий препаратов, подтверждает факт, что условия полимеризации и деполимеризации, а также снятия защитных групп идентично и приводит к одинаковым результатам.

Также косвенным свидетельством идентичности протекания технологических процессов является совпадение вторичных структур полипептидов ГА от разных производителей (рис. 4). Исследования проводили методом кругового дихроизма в области УФ от 190 до 240 нм. Показано, что в водном растворе ГА при концентрации 30 мкмоль/л существует заметная упорядоченность — 25 % фрагментов полимерных цепей имеют вторичную структуру α -спиралей и 35 % β -слоев. На рис. 4 приведена типичная кривая КД водного раствора ГА.

Интерпретация кривых проводилась сравнением с эталонными графиками КД для полимеров, содержащих α -спираль, β -слой и разупорядоченные глобулы.

Идентичность физико-химических свойств

В связи с невозможностью сравнения субстанций нами проведен комплексный анализ образцов Копаксон® и Аксоглатиран®ФС.

Официально нормативная документация (НД) на Копаксон® и Аксоглатиран®ФС содержит 18 пунктов определения пригодности продукта. По всем этим пунктам проводится контроль каждой промышленной партии готовой продукции.

Нами дополнительно проведены анализы, подтверждающие распределение по молекулярным массам (в дополнение к гельпроникающей хроматографии, используемой в НД), методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. Общий вид проявленной электрофореграммы (рис. 5).

Получены спектры высокого разрешения ЯМР ^{13}C в D_2O (рис. 6) и ИК-Фурье с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) (рис. 7), позволяющей записывать спектры водных растворов. Спектральные характеристики также ока-

зались идентичны для образцов Копаксон® и Аксоглатиран®ФС.

Таким образом, воспроизведенный препарат на основе субстанции ГА Аксоглатиран®ФС полностью идентичен препарату Копаксон®.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. S. Wolinsky, P. A. Narayana, P. O'Connor, et al., *Ann. Neur.*, **61**(1), 14 – 24 (2007).
2. *Copaxone (glatiramer acetate injection) for subcutaneous use [package insert] Teva Pharmaceuticals*, North Wales, PA, January (2014).
3. *Novel New Drugs 2015 Summary* U. S. Food and drug administration (2016).
4. *Novel New Drugs 2014 Summary* U. S. Food and drug administration (2015).
5. P. H. Lalive, O. Neuhaus, M. Benkhokha, et al., *CNS Drugs*, **25**(5), 401 – 414 (2011).
6. P. L. Vieira, H. C. Heystek, J. Wormmeester, et al., *J. Immunol.*, **170**, 4483 – 4488 (2003).
7. C. Farina, B. F. Then, H. Albrecht, et al., *Brain*, **124**(4), 705 – 719 (2001).
8. Г. Я. Шварц, Г. В. Раменская, *Хим.-фарм. журн.*, **46**(11), 29 – 34 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(11), 656 – 660 (2012).
9. Г. Я. Шварц, Г. В. Раменская, *Хим.-фарм. журн.*, **49**(4), 3 – 10 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(4), 213 – 219 (2015).
10. J. Anderson, C. Bell, J. Bishop, et al., *J. Neurolog. Sci.*, **359**, 24 – 34 (2015).
11. Ф. А. Хабиров, Т. И. Хайбуллин, Е. В. Гранатов и др., *Нервно-мышечные болезни*, **6**(4), 28 – 36 (2016).
12. D. Teitelbaum, A. Meshorer, T. Hirschfeld, et al., *Eur. J. Immunol.*, **1**(4), 242 – 248 (1971).
13. E. Katchalski, M. Sela, *Adv. Protein Chem.*, **13**, 243 – 492 (1958).
14. X. Iwakura, K. Unr, M. Ova, *J. Polym. Sci. A-1*, **6**(8), 2165 – 2177 (1968).
15. H. Fukushima, S. Inoue, *Makromol. Chem. Phis.*, **177**(10), 2807 – 2817 (1976).
16. S. Juliá, J. Masana, J. C. Vega, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **19**, 929 – 931 (1980).
17. M. Sela, A. Berger, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**(7), 1893 – 1898 (1955).
18. E. Katchalski, M. Sela, H. I. Silman, A. Berger, *The Proteins*, Academic Press, New York (1964), pp. 405 – 602.
19. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, and G. Sakellariou, *Chem. Rev.*, **109**, 5528 – 5578 (2009).

Поступила 23.03.17

AKSOGLATIRAN FS: GENERIC OF COPAXONE PREPARATION BASED ON GLATIRAMER ACETATE

Y. V. Skornyakov^{1*}, A. A. Deryabin², and O. V. Skornyakova³

¹ NordicChemical Company, Moscow, 123001 Russia

² PermChemical Company, Perm, 614034 Russia

³ Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

* e-mail: skorn506@mail.ru

This article provides general information about the synthesis and properties of glatiramer acetate (GA) substance, and formulates the principles and methods of verifying pharmaceutical identity of the GA substance and related drugs – INN copaxone and generic aksoglatiran FS. Registration certificate no. LP-003572 of 18.04.2016 was issued for the first domestic GA-based generic drug Aksoglatiran FS.

Keywords: glatiramer acetate; multiple sclerosis; generic; copaxone; aksoglatiran FS.