

УДК 616.988.21

Е.Г.Абрамова¹, Н.Н.Кочкалова¹, А.К.Никифоров¹, А.Ю.Бутырский², Ю.В.Иванов¹,
Н.В.Синицына¹, Т.А.Михеева¹, Л.Н.Минаева¹, М.В.Галкина¹, Л.В.Савицкая¹, С.В.Генералов¹,
М.Н.Киреев¹, Н.А.Шарапова¹

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ОСНОВНЫХ СВОЙСТВ

¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;
²Государственный институт стандартизации и контроля им. Л.А.Тарасевича, Москва

Представлены данные по изучению физико-химических и биологических характеристик лиофилизированной формы гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Проведен сравнительный анализ свойств сухой и исходной жидкой формы иммуноглобулина. Установлено, что лиофилизат сохраняет основные свойства в процессе длительного хранения.

Ключевые слова: гетерологичный антирабический иммуноглобулин, лиофилизация, специфическая активность, стабильность.

E.G.Abramova, N.N.Kochkalova, A.K.Nikiforov, A.Yu.Butyrskii, Yu.V.Ivanov, N.V.Sinitsyna, T.A.Mikheeva,
L.N.Minaeva, M.V.Galkina, L.V.Savitskaya, S.V.Generalov, M.N.Kireev, N.A.Sharapova

Production of Lyophilized Preparation of Anti-Rabies Immunoglobulin and Examination of Its Main Properties

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov; L.A.Tarasevich State Institute for Standardization and Control, Moscow

Presented are data on examination of physical, chemical and biological characteristics of lyophilized preparation of heterologous anti-rabies immunoglobulin. Dry and original liquid forms of immunoglobulin were comparatively analyzed. The lyophilized form was shown to preserve main properties during long-term storage.

Key words: heterologous anti-rabies immunoglobulin, lyophilization, specific activity, stability.

Современное многообразие лекарственных средств, их высокая эффективность в лечении и профилактике многих инфекционных заболеваний обуславливает большое внимание исследователей к проблеме обеспечения стабильности медицинских иммунобиологических препаратов в процессе хранения. Одним из способов решения этого вопроса является лиофилизация готового препарата.

В настоящее время РосНИПЧИ «Микроб» выпускает препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ) в жидкой форме. Известно, что жидкая форма иммуноглобулиновых препаратов, применяемых в лечебных целях, наиболее экономична и удобна для использования потребителем. Однако жидкие формы лечебных иммуноглобулинов обладают рядом существенных недостатков: меньшей стабильностью во время длительного хранения, возможным снижением титров специфических антител, опасностью образования агрегатов, более жесткими требованиями к транспортировке [7]. Российская Федерация, в отличие от стран Европы, характеризуется значительной протяженностью транспортных путей до потребителя, и лиофилизация, помимо обеспечения стабильности молекулярных параметров и специфической активности, позволит создать наибо-

лее оптимальные условия для предотвращения агрегации и фрагментации белков в процессе хранения, мало зависящие от способов транспортировки.

В последние годы в мировой практике наблюдается тенденция в сторону увеличения выпуска лиофильно высушенных иммуноглобулиновых препаратов, применяемых для лечебных целей. Так, в США ведущим контрольным медицинским органом – Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA) сертифицировано шесть лиофилизированных внутривенных препаратов против двух в жидкой форме. Трехкратное превышение зарегистрированных лиофилизированных форм над жидкими объясняется очень жесткими международными требованиями, предъявляемыми к стабильности иммуноглобулиновых препаратов.

Согласно Европейской Фармакопее (2004 г.), для лечебных лиофилизированных иммуноглобулинов, в отличие от жидких препаратов, допускается хранение при более высокой температуре – до 25 °С. Кроме того, при хранении лиофилизированного препарата отсутствуют поверхности взаимодействия: воздух-жидкость, твердое тело (стекло) – жидкость, характерные для жидкого МИБП. Высокий негативный

заряд стекла может вызвать усиленную агрегацию иммуноглобулиновых препаратов, которую также можно предупредить лиофилизацией. В иммуноглобулинах, приготовленных путем фракционирования иммунных сывороток спиртом, всегда содержится некоторое количество сывороточных протеаз типа фибринолизина и тканевых катепсинов, которые способны вызывать расщепление иммуноглобулина с образованием низкомолекулярных фрагментов [5, 6, 7]. Установлено, что жидкие иммуноглобулины содержат, как правило, некоторое количество продуктов распада, а лиофилизированные – значительно меньше [7]. Следовательно, лиофилизация считается пока лучшим способом достижения стабильности всех качественных показателей иммуноглобулинов, сохраняющих эффективность препаратов в процессе длительного времени [1, 2].

В соответствии со спецификацией на препарат жидкого антирабического иммуноглобулина, выпускаемого РосНИПЧИ «Микроб», срок его хранения – 1 год 6 месяцев. Разработка лиофилизированной формы препарата, безусловно, позволит увеличить этот срок, что является актуальным в связи с высокой востребованностью препарата на Российском фармацевтическом рынке.

Целью настоящей работы явилось получение лиофилизированной формы антирабического иммуноглобулина и изучение ее качественных характеристик на момент выпуска и в процессе хранения.

Материалы и методы

В ходе выполнения работы были получены и исследованы свойства 11 экспериментальных серий лиофилизированного препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина: 002, 009, 012–014, 019, 031–033, 037, 055. Исходные серии жидкого антирабического иммуноглобулина полностью соответствовали требованиям ФСП на препарат.

Жидкий иммуноглобулин разливали по 1 мл в стеклянные ампулы, замораживали при температуре минус $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$ на холодильной установке NZ-250/75 и лиофильно высушивали на установке LZ-9, «Фригера» (Чехия).

Внешний вид таблетки в ампуле и растворимость сухого препарата оценивали визуальным методом. Определение потери в массе при высушивании (остаточную влажность) проводили весовым методом согласно ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов» [9], pH определяли потенциометрически согласно ГФ XII, вып. 1 [3]. Прозрачность в сухом препарате после растворения определяли спектрофотометрически согласно ФС 42-3874-99 [9]. Содержание белка определяли методом с биуретовым реактивом согласно ФС 42-3874-99 [9].

Уровень специфической активности жидкого и лиофилизированного препарата антирабического

иммуноглобулина определяли двумя способами – *in vivo* биологическим методом в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышках [10] и *in vitro* методом дот-иммуноанализа с применением иммуносуспензионной тест-системы на основе наночастиц коллоидного золота. Определение специфической активности *in vivo* было проведено с введением в опыт одновременно иммуноглобулина исходной жидкой и лиофилизированной форм и отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-200-04 специфической активности антирабического иммуноглобулина ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Статистическую обработку проводили по методу Reed и Muench [10]. Вируснейтрализующую активность лиофилизированного антирабического иммуноглобулина – кандидата в ОСО специфической активности определяли в сравнении с международным стандартом специфической активности антирабического иммуноглобулина.

В качестве стабилизатора, предупреждающего процессы повреждения белка при лиофилизации, использовали гликокол (глицин) в концентрации $(2,25 \pm 0,25)\%$. Данный протектант наиболее широко применяется в биотехнологической практике при лиофилизации лечебных иммуноглобулинов, предполагающих внутримышечное введение [4].

Результаты и обсуждение

Для подбора оптимального режима лиофилизации было высушено 7 экспериментальных образцов 3 серий антирабического иммуноглобулина при различных режимах – 24, 36 и 48 ч (табл. 1). Все лиофилизаты представляли собой хорошо сформированную таблетку белого цвета мелкопористой структуры, потеря в массе при высушивании или остаточная влажность составила в среднем 0,5 %, что соответствует требованиям Европейской Фармакопеи на лиофилизированный лечебный иммуноглобулин, согласно которой данный параметр не должен превышать 3,0 %. Практически все образцы высушенного иммуноглобулина характеризовались хорошей растворимостью – в среднем 2 мин (по Европейской Фармакопее – не более 10 мин). Значение концентрации водородных ионов для всех образцов сухого препарата АИГ соответствовало требованиям ФСП на жидкий препарат – от 6,6 до 7,4.

Прозрачность растворенного после лиофилизации антирабического иммуноглобулина в основном не претерпела значительных изменений по сравнению с жидкой формой. Данный показатель соответствовал требованиям ФСП на жидкий антирабический иммуноглобулин – не более 0,05. Однако в иммуноглобулине, высушенном в течение 24 ч, показатель прозрачности возрос по сравнению с жидкой формой и вышел за пределы нормы в образце экспериментальной серии 033 – соответственно 0,055 и 0,015. Возможно, режим интенсивного высушивания способствует формированию нерастворимых агрегатов, о чем свидетельствуют показатели прозрачности

Таблица 1

Характеристика физико-химических и биологических свойств лиофилизированного антирабического иммуноглобулина, высушенного при различных режимах

Серия препарата АИГ	Описание	Режим лиофилизации, ч	Растворимость, мин	Потеря в массе при высушивании, %	Прозрачность жидкого иммуноглобулина	Прозрачность после растворения сухого препарата	Содержание белка в жидком препарате, %	Содержание белка в сухом препарате, %
031	Однородная мелкопористая масса белого цвета	24	2	0,8	0,022	0,028	9,9	8,9
	«	48	1	0,25	0,022	0,032	9,9	8,9
032	«	24	2	1,03	0,018	0,034	9,9	8,9
	«	36	2	0,125	0,018	0,021	9,9	8,99
	«	48	2	0,125	0,018	0,016	9,9	9,2
033	«	24	1	1,03	0,015	0,055	9,9	8,4
	«	48	2	0,035	0,015	0,022	9,9	8,8

препарата после растворения, и данный режим менее благоприятен для белковой молекулы. Результаты определения белка в лиофилизатах показали, что содержание целевых антител в исследованных образцах антирабического иммуноглобулина после лиофилизации претерпело изменение в сторону снижения в среднем на 10 %, однако наименьший уровень потери белка наблюдали в препаратах, высушенных в течение 36 и 48 ч.

Сравнивая показатели физико-химических и биологических параметров препарата, высушенного при различных режимах, можно сделать предварительный вывод о том, что высушивание иммуноглобулина в течение 24 ч наименее предпочтительно, поскольку показатели прозрачности и содержания белка в таких препаратах уступают аналогичным у препаратов, высушенных в течение 36 и 48 ч. Следовательно, лиофилизация при пониженной скорости удаления воды является более щадящим способом, чем лиофилизация при быстром удалении воды, когда происходит повреждающее воздействие на структуру белковой молекулы за счет столкновений молекул водяного пара с молекулами белков.

Основным биологическим свойством как жидкого, так и лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина является специфическая активность. Данный показатель отражает напряженность создаваемого пассивного иммунитета в организме пациента, получающего антирабическую

помощь в виде комбинированного введения антирабического иммуноглобулина и антирабической вакцины. Согласно ФСП на препарат, этот показатель должен составлять не менее 150 МЕ при исследовании в биологической реакции нейтрализации при участии в ней от 100 до 1000 LD₅₀ вируса бешенства.

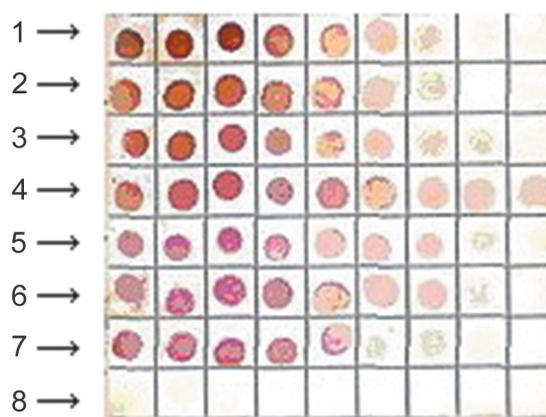
Как показали результаты реакции нейтрализации, лиофилизированный антирабический иммуноглобулин экспериментальных серий 037 и 055 обладает уровнем специфической активности в 419 и 382 МЕ соответственно при титре вируснейтрализующих антител 1:11061 против 632 ЛД₅₀ фиксированного вируса бешенства CVS и 1:11220 против 737,8 ЛД₅₀. На этом же уровне и специфическая активность исходного препарата жидкой формы – 512 и 448 МЕ соответственно для серий 037 и 055 (табл. 2).

В рамках темы «Разработка национального стандартного образца специфической активности антирабического иммуноглобулина» была изготовлена экспериментальная лиофилизированная серия 055, образцы которой являются кандидатами в ОСО специфической активности антирабического иммуноглобулина ГИСК им. Л.А.Тарасевича. В лаборатории бешенства и оспы ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича (Москва) был проведен контроль специфической активности экспериментального лиофилизата путем постановки реакции нейтрализации на белых мышцах в сравнении с Международным стандартом (The International Standard for Rabies immunoglobulin)

Таблица 2

Специфическая активность лиофилизированного антирабического иммуноглобулина

Серия АИГ	Форма АИГ	Норма по НД, МЕ/мл	Референс-образец	Специфическая активность в РН	
				защитный титр	МЕ/мл
37 (исх.)	Жидкий	не менее 150	ОСО 42-28-200-04 специфической активности ГИСК им. Л.А.Тарасевича	1:13536	512
037	Лиофилизат	«	«	1:11061	419
55 (исх.)	Жидкий	«	«	1:5470	448
055	Лиофилизат	«	«	1:11220	382
055/1	Лиофилизат	«	The International Standard for Rabies immunoglobulin	1:3034	179
055/2	Лиофилизат	«	«	1:3366	199



Активность лиофилизованного препарата антирабического иммуноглобулина, определяемая *in vitro* в дот-иммуноанализе:

По оси абсцисс: разведения АИГ и нормальной лошадиной сыворотки (НЛС), начиная с 1:160; по оси ординат: 1–7 ряды – образцы сухих серий 002, 009, 012, 013, 014, 019, 032, 8 ряд – НЛС (отрицательный контроль)

с активностью 59 МЕ в ампуле. Полученные результаты специфической активности соответствуют требованиям ВОЗ для антирабических иммуноглобулинов – не менее 150 МЕ/мл (табл. 2).

На рисунке представлены данные по определению уровня специфической активности у лиофилизованного АИГ серий 002, 009, 012, 013, 014, 019, 032 *in vitro* в дот-иммуноанализе.

В зависимости от серии препарата, уровень активности колебался от 1:5000 до 1:20000, для серии 013 – 1:40000. Следует отметить, что образцы указанных серий были исследованы после хранения в течение пяти (серия 002), трех (серии 009, 012–014, 019) и двух лет (серия 032).

Результаты определения активности образцов лиофилизованного иммуноглобулина в тестах *in vivo* и *in vitro* свидетельствуют о том, что препарат, подвергшийся лиофилизации, в полной мере сохранил способность к нейтрализации вируса бешенства как на момент получения, так и после длительного хранения. Применение гликокола в качестве протектанта вполне приемлемо для предотвращения повреждающего действия при лиофилизации антирабического иммуноглобулина.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получена лиофилизованная форма препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, физико-химические и биологические параметры которой соответствуют требованиям Европейской Фармакопеи на лиофилизованный лечебный иммуноглобулин и ФСП на жидкий антирабический иммуноглобулин. В процессе хранения от 3 до 5 лет сухой препарат стабилен в отношении показателей растворимости, прозрачности, активности. Это указывает на наличие принципиальной возможности получения препарата в сухой лекарственной форме. Лиофилизованная форма препарата позволит не только увеличить срок годности препарата, но также

избежать проблем, связанных с жесткими требованиями к транспортированию жидких препаратов, что весьма актуально для Российской Федерации с ее протяженными транспортными путями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронин Е.С., редактор. Биотехнология. СПб.: ГИОРД; 2005. 792 с.
2. Бланков Б.И., Клебанов Д.Л. Применение лиофилизации в микробиологии. М.: Медицина; 1961. 263 с.
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2008. 704 с.
4. Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Биотехнология иммунобиологических препаратов. Харьков: Фармитэк; 2008. 312 с.
5. Лантеева Л.К., Минакова Л.В., Гавриленкова В.Ю. Сохраняемость специфических антител в иммуноглобулине человека противостолбнячному в зависимости от степени фрагментации IgG. Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. М., 1987. 4:148–53.
6. Никитина В.Д., Холчев Н.В., Колесникова Л.И. и др. Исследование фрагментации препаратов гамма-глобулинов, выпускаемых в СССР. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1975; 1:44–8.
7. Терновой А.П. Вопросы иммунологии инфекционных и аллергических заболеваний Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1971; 3:140–4.
8. Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1248-03. М.: Минздрав России; 2003. 19 с.
9. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья ФС 42-3874-99. М.: Фармакопейный государственный комитет; 2000. 77 с.
10. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. 469 p.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Voronin E.S., editor. [Biotechnology]. SPb.: GIORД; 2005. 792 p.
2. Blankov B.I., Klebanov D.L. [Application of Lyophilization in Microbiology]. M.: Meditsina; 1961. 263 p.
3. [State Pharmacopeia of the Russian Federation]. 12th ed. M.: Izd-vo "Nauch. Tsentr Ekspert. Sredstv Med. Primen."; 2008. 704 p.
4. Krasnopol'skii Yu.M., Borshchevskaya M.I. [Biotechnology of Immunobiological Preparations]. Kharkov: Izd-vo "Farmitek"; 2008. 312 p.
5. Lanteeva L.K., Minakova L.V., Gavrilenkova V.Yu. [Preservation capacity of specific antibodies in human anti-tetanus immunoglobulin depending on the degree of IgG fragmentation]. In: [Standards, Strains and Control Methods of Bacterial and Viral Preparations]. M.; 1987. P. 148–53.
6. Nikitina V.D., Kholchev N.V., Kolesnikova L.I. et al. [Examination of fragmentation of gamma-globulin preparations manufactured in the USSR]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1975; 1:44–8.
7. Ternovoi A.P. [Issues of immunology of infectious and allergic diseases]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1971; 3:140–4.
8. [Sanitary and Epidemiological Regulations "Conditions of Transportation and Storage of Medical Immunobiological Preparations" SR 3.3.2.1248-03]. M.: Minzdrav RF; 2003. 19 p.
9. [Physico-Chemical, Physical, Chemical and Immunochemical Methods of Control of Medical Immunobiological Preparations]. Pharmacopeia Monograph FS 42-3874-99. M.: Minzdrav RF; 2000. 77 p.

Authors:

Abramova E.G., Kochkalova N.N., Nikiforov A.K., Ivanov Yu.V., Sinitsyna N.V., Mikheeva T.A., Minaeva L.N., Galkina M.V., Savitskaya L.V., Generalov S.V., Kireev M.N., Sharapova N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru
Butyrskii A.Yu. L.A. Tarasevich State Institute for Standardization and Control. Moscow.

Об авторах:

Абрамова Е.Г., Кочкалова Н.Н., Никифоров А.К., Иванов Ю.В., Синицына Н.В., Михеева Т.А., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Савицкая Л.В., Генералов С.В., Киреев М.Н., Шаранова Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru
Бутырский А.Ю. Государственный институт стандартизации и контроля им. Л.А.Тарасевича. Москва.

Поступила 02.04.10.