

**Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, М.Н.Киреев, Н.Н.Кочкалова, С.В.Генералов, А.Г.Селезнева,
Л.В.Савицкая, Ю.В.Иванов**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРЕПАРАТА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлены данные по изучению молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина производства РосНИПЧИ «Микроб». Отмечается, что оптимальная система очистки позволяет получать препарат, состоящий из 100 % фракции мономеров. В процессе хранения иммуноглобулина появляется фракция фрагментов, однако содержание ее незначительно. Фракция агрегатов не зарегистрирована ни на момент выпуска препарата, ни после его хранения в течение 5 лет. По степени сохранения молекулярных параметров выявлено преимущество лиофилизированной формы препарата по сравнению с жидкой.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, фрагментация, агрегация, гель-фильтрация.

Одним из главных критериев качества антивиральных иммуноглобулинов является стабильность их физико-химических свойств в процессе хранения. Основными процессами, ухудшающими качество препаратов иммуноглобулина при хранении, являются агрегация и фрагментация белковых молекул [3, 13]. Фрагментация, обусловленная действием сывороточных протеиназ, приводит к снижению специфической активности антител и ускоренному выведению иммуноглобулина из организма [1]. Расщепление белковых молекул происходит с образованием как крупных фрагментов, ведущих себя как моновалентные антитела, так и более мелких иммунологически неактивных фрагментов – низкомолекулярных пептидов и аминокислот. Фрагменты и целые молекулы могут агрегировать с образованием слаборазрываемых высокомолекулярных комплексов, обладающих антикомплементарной активностью. Одной из причин агрегации белковых комплексов может быть свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ), обусловленное присутствием в препаратах лабильных липопротеидов и прооксидантов [3, 9]. Продукты ПОЛ могут агрегировать белки, образуя межмолекулярные сшивки. Наличие остаточного спирта также может способствовать агрегации молекул иммуноглобулина [5]. Внутримолекулярные сшивки, свободнорадикальное окисление сульфгидрильных групп с образованием дисульфидных связей изменяют конформацию белковых молекул, снижают их устойчивость в растворах и повышают доступность пептидных связей действию протеиназ. Известно, что именно агрегаты в препаратах иммуноглобулина способствуют проявлению побочных анафилактических реакций [2].

Следовательно, говоря о безопасности препарата антирабического иммуноглобулина, можно выделить один из ее критериев – отсутствие или минимальное содержание фрагментов и агрегатов. Фармакопейная статья предприятия на гетерологич-

ный антирабический иммуноглобулин предусматривает контроль готового препарата по 15 показателям, характеризующим физико-химические и биологические свойства препарата. В этот перечень не входит такой показатель, как молекулярные параметры, отражающий количественное содержание в препарате фрагментов, мономеров, димеров и агрегатов. Этот тест обязателен для гомологичных иммуноглобулинов для внутривенного и внутримышечного введения и является одним из основных показателей качества и безопасности этих препаратов. Согласно требованиям Европейской Фармакопеи (2007 г.) в гомологичных иммуноглобулинах для внутримышечного применения суммарное количество мономеров и димеров должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %, фрагментов – не более 5 % [10]. Соответствующие данные, касающиеся гетерологичных иммуноглобулинов, в нормативной документации отсутствуют. В связи с инициацией проведения в РосНИПЧИ «Микроб» исследований молекулярно-массового состава антирабического иммуноглобулина экспертами ГИСК им. Л.А.Тарасевича были предоставлены ориентировочные данные по содержанию вышеуказанных фракций в препарате: на момент выпуска и в течение срока годности содержание мономеров и димеров должно быть не менее 80 %, полимеров и фрагментов – не более 20 %.

В изученной литературе практически нет современных работ, касающихся исследований молекулярно-массового состава гетерологичных иммуноглобулинов. Изучение молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина проводилось в 70-х годах прошлого столетия исследователями Томского НИИ вакцин и сывороток и их результаты представлены в единичных работах [11, 12].

Высокий уровень современных технологий, применяемых в настоящее время при ведении баромембранных процессов по очистке жидкого имму-

ноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб», намного эффективнее по сравнению с традиционными видами фильтрации 70-х годов прошлого века при производстве препарата в Томском НИИ вакцин и сывороток. Безусловно, это должно положительно отразиться как на фракционном составе препарата на момент выпуска, так и на сохранении молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина в течение срока годности.

Исследование молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина не является просто увлекательной научной задачей. Работа в данном направлении имеет и практическое значение, поскольку эксперты Научного центра экспертизы средств медицинского применения рекомендовали по мере накопления данных включить раздел «Молекулярные параметры» в Фармакопейную статью предприятия на антирабический иммуноглобулин.

Целью исследований явилась оценка уровня содержания мономеров, фрагментов и агрегатов в препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина на момент выпуска и в процессе хранения, а также сравнение данных показателей в препаратах жидкой и лиофилизированной форм.

Материалы и методы

В работе по определению молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина были использованы 12 образцов экспериментально-производственных серий, хранившихся от одного месяца до 5 лет. Были изучены образцы как жидкой формы, так и лиофилизата. Значения основных физико-химических и биологических параметров препарата сухой формы на момент получения полностью соответствовали требованиям фармакопейной статьи на жидкий антирабический иммуноглобулин.

Содержание агрегатов и фрагментов в препаратах иммуноглобулина определяли методом гель-фильтрации [15], основанном на разделении препарата на фракции в зависимости от размера и молекулярной массы белковых компонентов. При проведении фракционирования иммуноглобулина использовали хроматографическую колонку размером 25×2,6 см (LKB, Швеция). Молекулярный вес антирабического иммуноглобулина обусловил применение в качестве наполнителя ультрагеля трисакрил GF 2000M (IBF, Франция) с областью разделения глобулярных белков от 120 до 15000 кДа. Объем внесения анализируемой пробы – 1 мл. Препарат разводили 0,9 % раствором хлорида натрия до концентрации 5 % и добавляли глицин, используемый в производстве препарата как стабилизатор, до конечной концентрации 2,25 %. Фракционирование проводили в течение 2 ч со скоростью потока 0,8 мл/мин. Величину оптической плотности каждой фракции определяли при длине волны 280 нм на проточном спектрофотометре «Увикорд СИ» (LKB, Швеция). Запись профилей элю-

ции проводили на двухканальном самописце модели 2210 (LKB, Швеция). Для количественного анализа хроматограммы применяли метод нормировки [6].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы «STATISTICA».

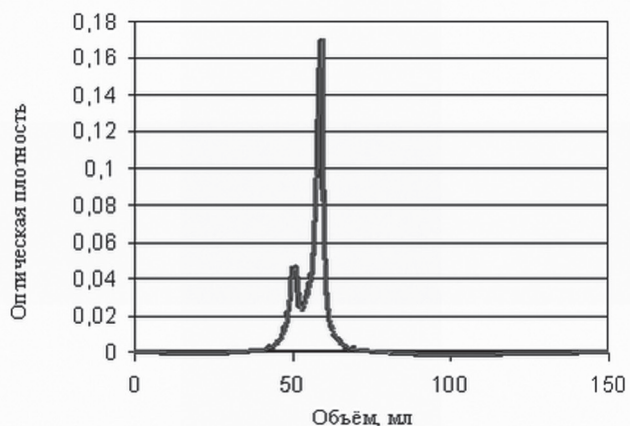
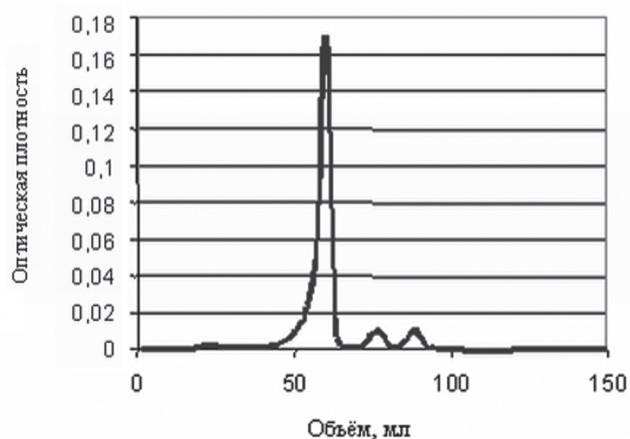
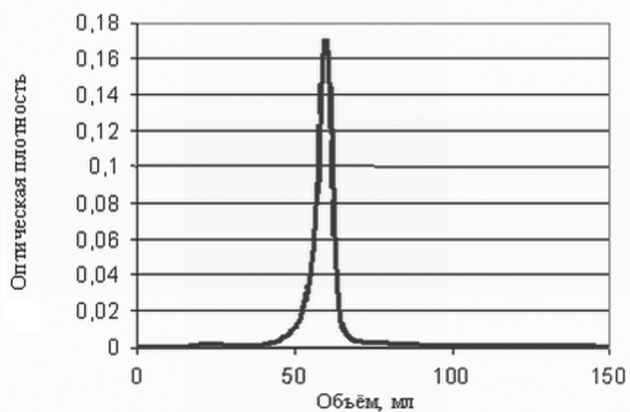
Результаты и обсуждение

В препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученного риванол-спиртовым методом из сыворотки крови гипериммунизированных лошадей, могут иметь место процессы фрагментации и агрегации. Воздействие на белковый раствор температуры и спирта в процессе фракционирования, а также наличие остаточного спирта в готовом препарате могут вызывать агрегацию белковых молекул. Расщепление основного компонента иммуноглобулина на низкомолекулярные фрагменты под действием сывороточного фибринолизина может приводить к его фрагментации. Указанные процессы ухудшают качество иммуноглобулина, способствуя снижению титра противовирусных антител, сокращению сроков циркуляции иммуноглобулина в организме, повышению его реактогенных свойств [5].

При аранжировке опыта по изучению молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина нами были использованы опубликованные данные исследователей Томского НИИВС [11, 12]. Антирабический иммуноглобулин, фракционированный методом гель-фильтрации, делится на 2–4 пика: один или два первых пика меньшего размера соответствуют агрегатам, затем следует основной пик мономерной фракции. В процессе хранения иммуноглобулина появлялся дополнительный пик после мономерной фракции,двигающийся более медленно, – пик фрагментов. В препарате антирабического иммуноглобулина производства Томского НИИВС на момент выпуска содержание агрегатов – наиболее реактогенной молекулярной фракции – составляло 3,8 %, после двух лет хранения эта величина возросла до 27,9 %. Фракция фрагментов соответственно составила 0,9 и 14,8 %. Столь значительное содержание нежелательных для иммуноглобулина фракций, безусловно, объясняется несовершенными методами очистки, применяемыми в то время при выпуске препарата специалистами Томского НИИВС.

При хроматографическом молекулярном разделении иммуноглобулина производства РосНИПЧИ «Микроб» наблюдали один пик мономерной фракции в случае изучения свежеприготовленного препарата (рисунок, А) и 2 пика – при исследовании препарата после хранения в течение 5 лет (рисунок, Б).

Распределение отдельных фракций в изученных сериях иммуноглобулина производства РосНИПЧИ «Микроб» выглядело следующим образом. Серии препарата № 68–72 на момент выпуска содержали 100 % фракцию мономеров. После хранения препарата в течение 5 лет в условиях, соответствующих



Профили элюции гетерологичного антирабического иммуноглобулина:

А – на момент выпуска; Б – через 5 лет после хранения;
В – испытанного при стресс-условиях

СП 3.3.2.1248-03 [14], в образцах серий № 07, 09, 012, 19 появился дополнительный пик, соответствующий фракции фрагментов – их содержание в среднем составило $(3,15 \pm 0,16) \%$. Несмотря на пятилетний срок хранения препарата, агрегатов не наблюдали ни в одной из серий, что говорит о высоком качестве очистки иммуноглобулина от остаточного спирта.

Хранение АИГ в течение срока годности (1 год 6 мес.) в условиях, соответствующих СП 3.3.2.1248-03, не привело к изменению молекулярно-массового

состава иммуноглобулина, о чем свидетельствуют результаты изучения препарата антирабического иммуноглобулина серии № 36 жидкой формы. На хроматограмме после завершения гель-фильтрации наблюдали 100 % фракцию мономеров.

Тем не менее, дополнительный пик, соответствующий фракции агрегатов (рисунок, В), был зарегистрирован при исследовании иммуноглобулина жидкой формы серии № 68, помещенного в стресс-условия (56°C в течение 1 ч). Данный тест применим при изучении стабильности иммуноглобулинов [7], и подобные условия, как показали результаты гель-фильтрации, резко ухудшили качество препарата, вызвав образование агрегатов в количестве 15,4 %. Следовательно, жидкая форма иммуноглобулина не является совершенной и требуется оптимизация потребительской формы выпуска препарата. Самым надежным способом предотвращения фрагментации и агрегации белков в процессе хранения, безусловно, является сублимационное высушивание [4, 7, 8].

Изучение фракционного состава лиофилизированного препарата подтвердило преимущество сухой формы относительно жидкой в сохранении физико-химических свойств препарата – в лиофилизированном препарате экспериментальной серии № 012 после 5 лет хранения при оговоренных в СП 3.3.2.1248-03 условиях наблюдали только присутствие мономеров.

Таким образом, проведены первые исследования молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина, выпускаемого в РосНИПЧИ «Микроб». Выявлено, что препарат на момент выпуска характеризуется 100 % содержанием мономеров. В процессе хранения в течение 5 лет в препарате жидкой формы происходит частичная фрагментация (расщепление) белковых молекул до уровня $(3,15 \pm 0,16) \%$, что многократно ниже ориентировочных показателей, при отсутствии агрегатов. Данные свидетельствуют о высоком качестве очистки иммуноглобулина, позволяющей свести к минимуму содержание нежелательных примесей, влияющих на процессы фрагментации и агрегации иммуноглобулина. Кроме того, выявлено преимущество лиофилизированной формы антирабического иммуноглобулина в поддержании стабильности препарата в процессе хранения (срок наблюдения – 5 лет).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анастасиев В.В., Короткова Т.В., Крайнова Т.А., Ефремова Л.М. Разработка производственной технологии получения иммуноглобулина для внутривенного введения нового поколения – имбиоглобулина. В кн.: Матер. юбил. конф. посв. 75-летию образования Нижегородского НИИ эпидемиологии им. акад. И.Н.Блохиной МЗ РФ. Н.Новгород; 2009. С. 332–40.
2. Атангулов Р.Г., Ибрафиллов А.Г., Воронин С.С. Определение молекулярно-массового состава препаратов внутривенного иммуноглобулина разных производителей методом HPLC. В кн.: Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology: Матер. Междунар. науч. конф. Томск; 2006. С. 331–32.
3. Благородов С.Г., Шепелев А.П., Дмитриева Н.А. и др. Стабилизация физико-химических свойств препаратов иммуноглобулинов при хранении. В кн.: Иммунобиологические препараты. М.; 1989. С. 38–43.
4. Давыдкин В.Ю., Гаврин А.Г., Алешкин В.А. и др. Отработка процесса сублимационного высушивания комплексного иммуноглобулинового препарата. Пробл. инф. бол. М.;

2000. Ч. 2. С. 61–5.

5. *Змачинская Т.Б., Анастасиев В.В.* Оптимизация технологической схемы получения препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного введения. Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И.Лобачевского. 2001; 1:70–3.

6. *Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И.* и др. Основы аналитической химии. М.: Высшая школа; 1996. Кн. 1. С. 319–25.

7. *Исрафилов А.Г., Кудашева Г.Б., Корнилова И.А.* и др. Иммунонин – первая отечественная стабильная лиофилизированная форма внутривенного иммуноглобулина в Российской Федерации. В кн.: Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение: Матер. Всерос. конф. Уфа, 2005. Ч. 2. С. 5–12.

8. *Исрафилов А.Г., Алсынбаев М.М., Кудашева Г.Б.* и др. Социально-ориентированная система возмещения затрат на препарат внутривенного иммуноглобулина в США. Вестник инфектологии и паразитологии [Электронный ресурс]. <http://www.infectology.ru/publik/stat57.aspx> (дата обращения от 10.03.09).

9. *Короткова Т.В., Анастасиев В.В.* Влияние различных факторов на содержание димеров в препарате иммуноглобулинов. В кн.: Вакцинология 2006: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. М.; 2006. С. 52.

10. *Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И.* Биотехнология иммунобиологических препаратов. Харьков: Изд-во «Фармитэк»; 2008. 312 с.

11. *Пилявская Е.А.* Определение фрагментации и агрегации белка в гетерогенном антирабическом иммуноглобулине. В кн.: Научные основы производства гипериммунных сывороток. Томск; 1979. С. 60–1.

12. *Пилявская Е.А., Киселева З.Ф., Явья А.Р.* Характеристика качества гетерологичных антивирусных иммуноглобулинов в процессе хранения. В кн.: Вирусные и бактериальные препараты: сборник научных трудов. Томск; 1984. Т. 33. С. 82–6.

13. *Ситник Н.П.* Разработка высокоочищенного препарата иммуноглобулина антирабического из плазмы крови лошади [автор. дис. ... канд. биол. наук]. Уфа; 2007. 23 с.

14. Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1248-03. М.: Минздрав России; 2003. 19 с.

15. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологи-

ческих препаратов. Фармакопейная статья ФС 42-3874-99. М.: Фармакопейный государственный комитет; 2000. 77 с.

E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, M.N.Kireev, N.N.Kochkalova, S.V.Generalov, A.G.Selezneva, L.V.Savitskaya, Yu.V.Ivanov

Determination of the Molecular Parameters of Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin Using Gel-Filtration

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented are the data of analysis of molecular parameters of heterologous immunoglobulin produced by the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". It is noted that the optimal system of rectification enables to obtain a preparation composed of 100% fraction of monomers. The fraction of fragments appears in the process of immunoglobulin storage, however its content is insignificant. The fraction of aggregates is not registered at the date of preparation delivery nor after its storage during 5 years. Lyophilized preparation is determined to be advantageous in comparison with the liquid one as regards molecular parameters integrity.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, fragmentation, aggregation, gel-filtration.

Об авторах:

Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Кочкалова Н.Н., Генералов С.В., Селезнева А.Г., Савицкая Л.В., Иванов Ю.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Kochkalova N.N., Generalov S.V., Selezneva A.G., Savitskaya L.V., Ivanov Yu.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила: 24.12.09.