

Н.Н. Кочкалова, Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, О.А. Лобовикова, Л.В. Савицкая, С.А. Бадарин, С.В. Генералов, Н.И. Костылева, Н.А. Шарапова, Ю.В. Иванов

ОПТИМИЗАЦИЯ ФОРМЫ ВЫПУСКА И ПОТРЕБИТЕЛЬСКОЙ ТАРЫ ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Представлены данные по оптимизации формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади. В ходе экспериментов использовали в качестве первичной упаковки ампулы и флаконы с наполнением препарата для лиофилизации объемом 5 мл. Проведено сравнительное исследование физико-химических, биологических характеристик и молекулярных параметров лиофилизированной и исходной жидкой форм иммуноглобулина. Установлено, что лиофилизированная форма способствует стабилизации свойств препарата и препятствует образованию фрагментов и агрегатов при хранении антирабического иммуноглобулина.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, лиофилизация, первичная упаковка, стабильность

OPTIMIZATION OF PRESENTATION AND CONSUMER CONTAINER OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN OBTAINED FROM HORSE SERUM

N.N. Kochkalova, E.G. Abramova, A.K. Nikiforov, M.N. Kireyev, O.A. Lobovikova, L.V. Savitskaya, S.A. Badarin, S.V. Generalov, N.I. Kostyleva, N.A. Sharapova, Yu.V. Ivanov

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

We presented the data concerning optimization of presentation and consumer container of anti-rabies immunoglobulin obtained from horse serum. During the experiments, ampoules and flasks were used for primary packaging. They were filled within 5 ml of the preparation of freeze-drying. Comparative analysis of physical, chemical and biological properties and molecular parameters of freeze-dried and initial forms of the immunoglobulin was carried out. Freeze-drying was demonstrated to promote stabilization of its properties and prevent emergence of fragments and aggregates during anti-rabies immunoglobulin storage.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, freeze-drying, primary packaging, stability

На сегодняшний день антирабический иммуноглобулин (АИГ) из крови лошади выпускается в жидкой форме. Жидкая форма данного лекарственного средства, как и многих других медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), применяемых в лечебных целях, достаточно экономична и удобна для использования потребителем. Однако существует ряд недостатков жидкой лекарственной формы: меньшая стабильность во время длительного хранения, возможное снижение титров специфических антител, более жесткие требования к транспортировке [5]. Согласно литературным данным, МИБП в форме лиофилизатов имеют более продолжительный срок годности с сохранением биологических и физико-химических свойств [4].

В соответствии с нормативной документацией (НД) на «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций», выпускаемый РосНИПЧИ «Микроб», срок его хранения составляет 1 год 6 месяцев. Разработка лиофилизированной формы препарата, безусловно, позволит не только увеличить срок хранения, что является актуальным в связи с его высокой востребованностью на фармацевтическом рынке в России, но также избежать проблем, связанных с жесткими требованиями к транспортированию жидких иммунобиологических лекарственных средств.

При разработке сухой формы АИГ первоначально были проведены экспериментальные работы,

направленные на исследование физико-химических и биологических параметров иммуноглобулина, лиофилизированного при различных режимах в объеме 1 и 2 мл [10]. Исследования молекулярных параметров препарата АИГ сухой формы в объеме 1 мл показали хорошие результаты стабильности препарата в процессе длительного хранения [7]. Более глубокие исследования физических свойств препарата, таких, как температура эвтектики и тепловые параметры, позволили четко определить критические температурные зоны в процесс лиофилизации и определить влияние стабилизирующих веществ [8].

Цель настоящей работы заключалась в получении лиофилизированного антирабического иммуноглобулина в терапевтической дозировке 5мл, сравнительное исследование качественных характеристик полученных образцов, выборе оптимальной и удобной для конечного потребителя первичной упаковки.

МЕТОДИКА

Для экспериментов использовали антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади, жидкий с содержанием белка (10 ± 1) %. Концентрация глицина, добавляемого в качестве стабилизатора, составляла ($2,25 \pm 0,25$) %. Основные физико-химические и биологические параметры соответствовали требованиям нормативной документации на препарат иммуноглобулина антирабического в жидкой форме.

Жидкий иммуноглобулин разливали по 5 мл в ампулы стеклянные для лекарственных средств тип В, стекло НС-1 номинальной вместимостью 10 мл (Туймазы, Россия) и флаконы ФО-1-10 НС-3 (Клин, Россия), замораживали в холодильной установке НС 700/50.2 (Чехия) до минус 50 °С. Лиофилизацию препарата осуществляли с применением установки лиофильного высушивания Heto PowerDry PL9000/-50/HSC (Дания); этап первичной сушки длился 21 ч при значении вакуума 0,12 гПа; этап досушивания составлял 9 ч при вакууме 0,08 гПа; общее время лиофилизации — 30 ч; установленное и поддерживаемое значение температуры полки составило 40 °С; температура конденсатора — минус (48 ± 0,2) °С.

Внешний вид сухой формы препарата и растворимость 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» [11].

рН определяли потенциометрически согласно ГФ XII, вып. 1 [1].

Прозрачность и цветность в сухом иммуноглобулине после растворения определяли спектрофотометрически согласно ФС 42-3874-99 [11].

Содержание белка определяли методом с биуретовым реактивом согласно ФС 42-3874-99 [11].

Уровень специфической активности жидкого и лиофилизованного препарата антирабического иммуноглобулина определяли *in vitro* в дот-иммуноанализе с применением иммуносуппензионной тест-системы на основе наночастиц коллоидного золота [6].

Исследование стабильности иммуноглобулина проводили в тесте на «ускоренное старение», выдерживая препарат при температуре 37 °С в течение 4 недель, что является аналогом условий хранения в течение 2 лет [2]. Стресс-условия имитировали выдерживанием препарата при температуре 56 °С в течение 24 ч [3].

Определение агрегатов и фрагментов в препаратах АИГ определяли методом гель-фильтрации [11]. При проведении фракционирования иммуноглобулина использовали хроматографическую колонку размером 25 x 2,6 см (LKB, Швеция), в качестве наполнителя применяли ультрагель трисакрил GF 2000M (IBF, Франция) с областью разделения глобулярных белков от 120 до 15 000 кДа. Объем внесения анализируемой пробы — 1 мл. 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 SP» (LKB, Швеция). Для количественного анализа хроматограммы применяли метод нормировки [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе выполненной работы были получены 3 экспериментальные серии лиофилизованного иммуноглобулина, разлитого по 5 мл в ампулы, и 3

экспериментальные серии лиофилизованного иммуноглобулина, разлитого по 5 мл во флаконы. Данный объем является оптимальной дозировкой препарата, близкой к терапевтической дозе иммуноглобулина. Следует отметить, что при использовании флаконов, в отличие от ампул, практически отсутствует брак, связанный с нарушением целостности упаковки.

Образцы иммуноглобулина лиофилизованной формы характеризовались следующими показателями.

Все лиофилизаты, как в ампулах, так и во флаконах, представляли собой хорошо сформированную таблетку белого цвета мелкопористой структуры; потеря в массе при высушивании составила в среднем 0,5 %, что соответствует требованиям Европейской Фармакопеи на лиофилизированные лечебные иммуноглобулины, согласно которой данный параметр не должен превышать 3,0 %.

Все образцы лиофилизованного препарата во флаконах и ампулах характеризовались хорошей растворимостью — в среднем 2 мин (по Европейской Фармакопее — не более 10 мин).

Значение концентрации водородных ионов для образцов сухого препарата АИГ соответствовало требованиям нормативной документации на жидкий препарат — от 6,6 до 7,4.

Прозрачность и цветность растворенного после лиофилизации антирабического иммуноглобулина в основном не претерпели значительных изменений по сравнению с жидкой формой, и соответствовали требованиям ФСП на жидкий антирабический иммуноглобулин — не более 0,05 и не более 0,15 соответственно.

Исследование уровня белка в лиофилизатах в сравнении с исходными жидкими образцами показало снижение данного показателя в ходе высушивания в среднем на 8 %, что, тем не менее, не повлияло на степень активности препарата.

Определение *in vitro* специфической активности лиофилизатов выявило титры специфических антител от 1:5000 до 1:20000, аналогичные значения фиксировали и при исследовании активности жидких исходных образцов. Не произошло снижения активности и после испытания иммуноглобулина жидкой и сухой форм в тесте на «ускоренное старение».

Сравнительное исследование молекулярных параметров жидкой и лиофилизованной форм препарата, отражающих стабильность свойств иммуноглобулина, не выявило наличия фрагментов и агрегатов в препаратах на момент получения, при хроматографическом молекулярном разделении иммуноглобулина зарегистрирован один пик мономерной фракции. Изменения наблюдали после теста на «ускоренное старение», когда на хроматограммах образцов препарата жидкой формы регистрировали дополнительный пик, свидетельствующий об образовании фракции фрагментов, в количестве от 1,63 до 22,5 %, тогда как на хроматограмме лиофилизата дополнительный пик отсутствовал. Результаты гель-фильтрации

жидких и сухих образцов иммуноглобулина, выдержанного при стресс-условиях, демонстрировали образование агрегатов в образце жидкой формы в количестве 0,5 % при отсутствии данной фракции в лиофилизированном иммуноглобулине.

ВЫВОДЫ

Таким образом, получен лиофилизированный антирабический иммуноглобулин в оптимальной для потребителя дозе 5 мл, физико-химические и биологические параметры которого соответствуют требованиям нормативной документации. Исследование молекулярных параметров данных образцов, испытанных в тесте на «ускоренное старение» и при стресс-условиях, выявило преимущество лиофилизированной формы, что подтверждается отсутствием в лиофилизате фракций фрагментов и агрегатов. В качестве первичной упаковки при получении лиофилизированного препарата предпочтительнее использование флаконов ФО-1-10 НС-3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XII издание. Часть 1. — М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». — 2008. — 704 с.
2. Европейская Фармакопея. — Изд. III-2000, V.2.6.20, монография № 0918.
3. 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. — С. 70—73.
4. Иммуновенин — первая отечественная стабильная лиофилизированная форма внутривенного иммуноглобулина в Российской Федерации / А.Г. Исрафилов [и др.] // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка,

производство и применение. Материалы Всероссийской конференции. — 2005. — Ч. II. — С. 5—12.

5. Лаптева Л.К., Минакова Л.В., Гавриленкова В.Ю. Сохраняемость специфических антител в иммуноглобулине человека противостолбнячном в зависимости от степени фрагментации IgG // Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. — 1987. — № 4. — С. 44—48.

6. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе / Н.А. Шарапова [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — 2010. — Вып. 1 (103). — С. 63—66.

7. Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации / Е.Г. Абрамова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — Вып. 4 (106). — С. 54—57.

8. Определение эвтектической температуры и исследование тепловых параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина методами электропроводности и дифференциальной сканирующей калориметрии / Кочкалова Н.Н. [и др.] // Биотехнология. — 2011. — № 5. — С. 80—84.

9. Основы аналитической химии / Под ред. Ю.А. Золотова. — М.: Высш. шк. — 1996. — Т. 1. — С. 319—325.

10. Получение лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина и исследование его основных свойств / Е.Г. Абрамова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — Вып. 2 (108). — С. 75—78.

11. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья ФС 42-3874—99. — М.: Фармакопейный государственный комитет, 2000. — 77 с.

Сведения об авторах

Кочкалова Наталия Николаевна — младший научный сотрудник (e-mail: nkochkalova@mail.ru)

Абрамова Елена Геннадьевна — к.б.н., зав. лаб. профилактических иммуноглобулинов

Никифоров Алексей Константинович — к.м.н., доцент, зам. директора по экспериментальной и производственной работе

Киреев Михаил Николаевич — зав. лаб. биохимии

Лобовикова Оксана Анатольевна — к.б.н., зав. ОБТК

Савицкая Лидия Владимировна — врач-бактериолог

Бадарин Сергей Анатольевич — врач-бактериолог

Генералов Сергей Владимирович — научный сотрудник

Шарапова Наталья Анатольевна — младший научный сотрудник

Костылева Наталья Ивановна — врач-бактериолог

Иванов Юрий Васильевич — зав. отделом экспериментальных фармацевтических форм