

**ВИВЧЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ТА БІОЛОГІЧНИХ
ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТІВ ІМУНОГЛОБУЛІНУ G, ЩО
ПРОХОДИЛИ ВІРУСНУ ІНАКТИВАЦІЮ
СОЛЬВЕНТ/ДЕТЕРГЕНТНИМ МЕТОДОМ**

**Федина С.Ю.^{1,2}, Бессарабов В.І.², Кузьміна Г.І.², Курінна Л.І.³,
Кулик В.Б.³**

¹Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,
відділ вірусології, м Київ, Україна, e-mail: secretar@serv.imv.kiev.ua

²Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра
промислової фармації, м Київ, Україна, e-mail: palchevska_knutd@ukr.net

³Клінічна лікарня «Феофанія»

У статті розглядаються особливості вивчення біологічних та фізико-хімічних властивостей імуноглобулінів, виготовлених за методом, що включає сольвент/детергентну (С/Д) інактивацію вірусів. Складність застосування різних методів інактивації вірусів у препаратах імуноглобуліну полягає у високій лабільності молекул цього білка, які під дією певних фізико-хімічних факторів можуть денатурувати і, як наслідок, змінювати свою функціональну поведінку. Розроблений метод інактивації вірусів сольвент/детергентною обробкою за умови подальшого хроматографічного очищення дозволяє уникнути швидкого утворення агрегатів, втрати специфічної активності, випадання білка в осад, появи опалесценції та погіршення показників стабільності препаратів імуноглобуліну. Фізико-хімічні та біологічні властивості розчину імуноглобуліну визначали фармакопейними методами.

Ключові слова: інактивація вірусів, сольвент/детергентна обробка, білок, імуноглобулін .

**STUDY OF PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES
OF IMMUNOGLOBULIN G PREPARATIONS WHICH HAVE BEEN
VIRAL INACTIVATED SOLVENT / DETERGENT**

**Fedyna S.Y.^{1,2}, Bessarabov V.I.², Kuzmina H.I.², Kurinna L.I.³,
Kulyk V.B.¹**

¹ Institut microbiology and virology the name of D.K.Zabolotnogo NAN of Ukraine, department of virology, mcode, Kyiv, Ukraine, e-mail:

secretar@serv.imv.kiev.ua ²Kyiv National University of Technologies and

Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail:

palchevska_knutd@ukr.net

³Feofaniya Clinical Hospital

In article features of study of biological and physical and chemical properties of immunoproteins, made after a method which includes sol'vent/detergentnu (S/D) of inaktivaciyu viruses are examined in the article. He difficulty of using different methods of inactivation of viruses in immunoglobulin preparations is the high lability of molecules of this protein, which under the action of certain physicochemical factors can denature and, consequently, change their functional behavior. The developed method of inaktivacii viruses on condition of the subsequent khromatografichnogo cleaning allows sol'vent/detergentnoy treatment to avoid rapid formation of aggregates, loss of specific activity, fall of albumen, in sediment, appearances of opalescencii and worsenings of indexes of stability of preparations of immunoprotein. Physical and chemical and biological properties of solution of immunoprotein determined farmakopeynimi methods.

Keywords: inaktivaciya viruses, sol'vent/detergentna treatment, albumen, immunoprotein.

Імуноглобуліни – це білки плазми, що продукуються В-лімфоцитами і здійснюють специфічний гуморальний захист шляхом розпізнання і зв'язування антигенів та гаптенів, мають важливий опсонізуючий ефект і виступають основним активатором системи комплементу. Завдяки імуноглобулінам реалізується основний етап захисту організму від мікроорганізмів, чужорідних білків, гаптенів та ауто антигенів. Імуноглобуліни є антитілами, що забезпечують високо спеціалізований імунологічний захист в організмі. Основною функцією імуноглобулінів є зв'язування антигенів, але антитіла можуть діяти самостійно, нейтралізуючи бактеріальні токсини або віруси і попереджаючи проникнення вірусів у клітини.

Переконливо доведено, що імуноглобуліни забезпечують клітинну цитотоксичність, здійснюючи при цьому противірусний імунний захист. Ефективно імуноглобуліни забезпечують антибактеріальний захист.

Функції імуноглобуліну пов'язані з Fc-фрагментом IgG, який зв'язується з клітинами ретикулоендотеліальної системи, компонентами комплементу сприяє опсонізації збудника, активації фагоцитозу, лізису, стимуляції функції поліморфно-ядерних клітин.

Використання полівалентних та специфічних препаратів імуноглобулінів для внутрішньом'язевого та внутрішньосудинного введення вважається одним з пріоритетних напрямків імунотерапії та імунопрофілактики інфекційних захворювань [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Потреба в таких препаратах постійно зростає. Основною проблемою будь-якого виробництва імуноглобулінів з плазми донорської крові залишається їх вірусна безпека. Використання карантинізованої плазми, отримання сировини лише у перевірених та сертифікованих постачальників, введення у процедури вхідного та міжопераційного контролю сучасних методів ампліфікації нуклеїнових кислот для виявлення маркерів інфекційних захворювань сприяє, але не дає повних гарантій відсутності вірусів. Тому ключову роль у забезпеченні вірусної безпеки повинен відігравати виробничий процес, який включає методи інактивації та видалення вірусів з доведеною ефективністю. Технологія повинна мати високий потенціал інактивації як оболонкових, так і безоболонкових вірусів, різних за фізико-хімічними та морфологічними властивостями.

Більшість методів, що застосовуються у виробництві препаратів крові, поряд з інактивуючою дією на віруси, можуть впливати на фізико-хімічні властивості, стабільність, специфічну активність цільового білка і, як наслідок, на ефективність готових препаратів та періоду циркуляції в організмі [7]. Вибір методу інактивації/видалення вірусів повинен забезпечувати гарантовану ефективність з одного боку та збереження нативної структури і функцій імуноглобуліну з іншого.

Тому вивчення біологічних та фізико-хімічних властивостей імуноглобулінів, виготовлених за методом, що включає сольвент/детергентну (С/Д) інактивацію вірусів, є актуальним.

Мета дослідження: Дослідження ефективності методу інактивації та видалення вірусів з препаратів імуноглобуліну.

Матеріали і методи.

У дослідженнях використовували препарати імуноглобуліну G, отримані на ТОВ «БІОФАРМА ПЛАЗМА» з плазми донорів спиртовим фракціонуванням за Коном [8].

Вірусну інактивацію препаратів імуноглобулінів проводили сольвент/детергентним методом з подальшою хроматографічною очисткою [9, 10].

Фізико-хімічні та біологічні властивості розчину імуноглобуліну визначали фармакопейними методами [11, 12, 13].

Визначення однорідності білкового складу (електрофоретична чистота) в зразках проводили методом зонального електрофорезу. Метод оснований на різній рухомості білків в електричному полі в залежності від заряду молекули.

Ідентифікацію білкових фракцій препарату проводили шляхом порівняння електрофореграм зразків імуноглобуліну і плазми людини.

Фракційний склад вивчали методом імуноелектрофорезу. Метод оснований на поєднанні електрофорезу з наступною реакцією преципітації в агарі з антисироватками.

Визначення кількості мономерів, димерів, агрегатів і полімерів, фрагментів (молекулярно-масовий склад) проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Антикомплементарна активність визначали у реакції зв'язування комплексу (РЗК).

Анти-А та анти-В гемаглютиніни. Для випробування використовували розчин імуноглобуліну з концентрацією не менше 35 г/л. Готували дві серії розведень випробуваного розчину в розчині 9 г/л натрію хлориду. До кожного розведення додавали рівний об'єм 5% суспензії еритроцитів групи крові А₁ (для першої серії розведень) та В (для другої

серії розведень), тричі попередньо відмитих розчином 9 г/л натрію хлориду. Інкубували протягом 30 хв при температурі 37°C, після чого тричі відмивали еритроцити розчином 9 г/л натрію хлориду. Надосадову рідину декантували та додавали до осаду по 200 мкл полівалентного антиглобулінового реагенту людини (сироватка Кумбса), інкубували протягом 30 хв. при температурі 37°C. Встановлювали ступінь аглютинації еритроцитів в кожному розведенні під мікроскопом.

Вміст антитіл до антистафілолізину визначали реакцією нейтралізації [13, 14], до вірусу кору – реакцією пасивної гемаглютинації [13, 15], до Hbs-антигену методом ІФА у відповідності з інструкцією до комерційних діагностикумів.

Результати та їх обговорення.

Складність застосування різних методів інактивації вірусів у препаратах імуноглобуліну полягає у високій лабільності молекул цього білка, які під дією певних фізико-хімічних факторів можуть денатурувати і, як наслідок, змінювати свою функціональну поведінку. Одними з основних критеріїв стабільності імуноглобуліну є молекулярно-масовий склад (ММС) та антикомплементарна активність (АКА) препарату. Наявність полімерів і агрегатів у препаратах імуноглобуліну при внутрішньосудинному застосуванні може викликати гіпотензивний ефект, тобто цей показник впливає на нешкідливість та переносимість препарату. Неспецифічна активація комплексу агрегатами також доведена як одна з причин виникнення побічних реакцій під час курсу внутрішньосудинного введення імуноглобулінів.

Ще одним показником, що впливає на переносимість внутрішньовенних препаратів імуноглобуліну G є показник «Антикомплементарна активність». Він характеризує функціональну активність в області Fc-фрагментів молекули. Згідно встановлених вимог [11], допустима межа зв'язування комплексу повинна складати не більше однієї гемолітичної одиниці CH₅₀ на 1 мг білка.

Таблиця 1. Результати визначення ММС препаратів імуноглобуліну

Назва препарату	Кількість полімерів та агрегатів, %		
	Норма	Без С/Д	С/Д
Імуноглобулін внутрішньом'язевий 10 %	Не більше 10 %	(n=60) 1,5	(n= 28) 0,1
Імуноглобулін внутрішньовенний 5 %	Не більше 3 %	(n=11) 1,1	(n=7) 0,1

Результати дослідження впливу сольвент/детергентної обробки з подальшим хроматографічним очищенням на ММС та АКА препаратів для внутрішньом'язевого і внутрішньосудинного введення подані у табл. 2.

Таблиця 2. Результати визначення ММС та АКА препаратів імуноглобуліну

Назва препарату	АКА, СН ₅₀ / мг		
	Норма	Без С/Д	С/Д
Імуноглобулін внутрішньом'язевий 10 %	Не регламентується	-----	-----
Імуноглобулін внутрішньовенний 5 %	Не більше 1	(n=11) 0,8	(n= 7) 0,5

Отримані результати свідчать не тільки про відповідність препаратів фармакопейним вимогам, але і про суттєве зниження кількості агрегатів у препаратах.

Додаткова хроматографічна очистка від полімерів та агрегованих молекул імуноглобуліну в невеликій мірі знижує антикомплементарну активність.

Для препаратів імуноглобуліну регламентується визначення вмісту баластних білків плазми методом електрофорезу на плівках із ацетату целюлози. Встановлено достовірну різницю за показником «Електрофоретична чистота» для препаратів, що оброблялись сольвент/детергентним методом порівняно з тими, що не оброблялись. Результати дослідження електрофоретичної чистоти представлені у табл. 3.

Таблиця 3. Визначення електрофоретичної чистоти препаратів імуноглобуліну.

Назва препарату	Електрофоретична чистота, %		
	Норма	Без С/Д	С/Д
Імуноглобулін внутрішньом'язевий 10 %	Не менше 95 %	(n= 60) 96,3%	(n= 28) 99,3%
Імуноглобулін внутрішньовенний 5 %	Не менше 95 %	(n=11) 98,8%	(n= 7) 9,7%

Відомо, що лікарські засоби з донорської крові антигенно неоднорідні. Присутність неспецифічних білків в препаратах є небажаним, оскільки кожен білок, отриманий з пулу плазми великої кількості донорів є антигеном для окремої людини. Препарати імуноглобуліну, крім основної фракції імуноглобуліну G, можуть містити різні кількості інших білків – альбуміну, плазміногену, імуноглобулінів А і М, які можуть стати причиною побічних реакцій при введенні великих доз цих препаратів. Наприклад, у хворих з селективним дефіцитом імуноглобуліну А та здатних виробляти антитіла проти нього, існує ризик виникнення побічної дії. Таким пацієнтам краще призначати препарати з низьким вмістом Іg А. [6]. Багато комерційних препаратів імуноглобуліну провідних зарубіжних фірм при однакових основних показниках якості, таких як АКА, кількість агрегатів та ін., варіюють за ціною саме по домішкових кількостях імуноглобулінів А і М.

В табл. 4 представлені результати аналізу імунофореграм препаратів, отриманих за різними методами. У більшості перевірених зразків спостерігається значне покращення однорідності фракційного складу та переважання 1–2 ліній преципітації, при допуску 5 ліній.

Отримані результати вивчення електрофоретичної чистоти та фракційного складу імуноглобулінів свідчать, що метод інактивації вірусів, включаючи препаративну хроматографію, забезпечує додаткове очищення

від баластних білків плазми та відповідність препаратів вимогам Європейської фармакопеї.

Таблиця 4. Визначення фракційного складу препаратів імуноглобуліну

Назва препарату	Фракційний склад		
	Норма	Без С/Д	С/Д
Імуноглобулін внутрішньом'язевий 10 %	На імунофореграмі - дуга преципітації IgG та не більше 4 додаткових дуг, що відповідають IgA, IgM, та 2 іншим імунологічно неактивним фракціям.	(n=60)	(n=28)
Імуноглобулін внутрішньовенний 5 %	На імунофореграмі - інтенсивна дуга преципітації IgG та не більше 1 додаткової дуги.	(n=11)	(n= 7)

Одним з показників якості лікарських форм імуноглобулінів є відсутність в них бактеріальних ендотоксинів, здатних викликати пірогенні реакції організму. Згідно фармакопейних вимог, імуноглобуліни вважають непірогенними, якщо після введення дослідним тваринам, у жодному з трьох вимірів температури не спостерігається її підвищення (або зниження) порівняно з початковою більше, ніж на 0,4 °С, тобто сума максимальних змін температури у трьох кроликів не повинна перевищувати 1,2 °С.

Таким чином, при хроматографічному очищенні доведене суттєве видалення бактеріальних ендотоксинів, що можуть накопичуватись протягом виробничого процесу.

Нейтралізація вірусів антитілами є одним з факторів, який знижує ризик передачі вірусу гепатиту В препаратами імуноглобулінів. Тому обов'язковою умовою вірусної безпеки імуноглобулінів (як нормальних, так і специфічних) згідно міжнародних вимог, є наявність в них антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В (анти-HbsAg). У відповідності до вимог [12], рівень анти-HbsAg у препаратах імуноглобуліну повинен становити не нижче 0,5 МО/г білка. ВООЗ рекомендує не менше 1 МО/г.

Результати визначення специфічних антитіл у препаратах імуноглобуліну виробництва ТОВ «БІОФАРМА ПЛАЗМА» представлені у табл 5.

Таблиця 5. Визначення специфічних антитіл в препаратах імуноглобуліну.

Назва препарату	Антитіла до антиальфаста-філолізину, (МО/мл)		Антитіла до вірусу кору, (МО/мл)		Антитіла до HbsAg, (МО/г)	
	Без С/Д	С/Д	Без С/Д	С/Д	Без С/Д	С/Д
Імуноглобулін внутрішньом'язевий 10 %	6.5	6.5	50	50	17.8	17,7
Імуноглобулін внутрішньовенний 5 %	4	4	25	25	22.5	22, 2

Порівняння вмісту антитіл у препаратах до і після стадії інактивації вірусів переконливо показує збереження специфічної активності за рахунок м'яких умов обробки та очищення.

Для підтвердження нешкідливості препаратів імуноглобуліну вивчали гостру та хронічну токсичність, а також місцеву подразнюючу дію імуноглобуліну з введеними у 40-ти кратних гранично допустимих концентраціях три-*n*-бутилфосфатом та полісорбатом 80 на дослідних тваринах. Дослідження показали, що профіль токсичності у мишей та морських свинок не вказав на наявність короткочасного токсичного ефекту після одноразової внутрішньосудинної, внутрішньочеревної та підшкірної ін'єкції. Ознак чутливості до імуноглобуліну після С/Д обробки залежно від статі не виявлено.

На основі експериментального вивчення препарату при тривалому введенні кролям та мишам встановлена відсутність хронічної токсичності (кумулятивної дії). Не виявлена також місцева несприятливість до внутрішньосудинних, внутрішньочеревних та підшкірних ін'єкцій препарату.

Дані дослідження вказують на низьку токсичність досліджуваних препаратів, неможливість виявлення DL_{50} , що свідчить про високий рівень безпеки при використанні препарату.

Висновки.

Розроблений метод інактивації вірусів сольвент/детергентною обробкою та умови хроматографічного очищення дозволяють уникнути швидкого утворення агрегатів, втрати специфічної активності, випадання білка в осад, появи опалесценції та погіршення показників стабільності препаратів імуноглобуліну.

Отримані препарати відповідають міжнародним вимогам за всіма показниками якості. Вони мають високу ступінь чистоти, мінімальний рівень анти-А і анти-Б гемаглютининів і бактеріальних ендотоксинів.

Список літератури

1. С.П.Писарева, Н.С.Дяченко, Отечественные специфические иммуноглобулины на страже здоровья. Институт педиатрии, акушерства и гинекологии АМН Украины, г Киев. Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, г.Киев, Здоровье женщины 3(15)/2003, - с.137-141.
2. С.П.Писарева, И.М.Недилько., Применение специфического иммуноглобулина человека антицитомегаловирусного в комплексной терапии невынашивания беременности, Институт педиатрии, акушерства и гинекологии АМН Украины, г Киев., Здоровье женщины 1(21)/2005, - с.
3. Н.С.Дяченко, и др. Специфические иммуноглобулины как эффективные препараты для лечения вирусных инфекций: современное состояние и насущие задачи для Украины.//Журн.микробиолог. -2002.-Т.64, №1

4. В.К.Таточенко. НЦЗД РАМН, Москва, Профилактика вирусных инфекций., Лечащий врач, ноябрь 2006, №9, -с.62-68.
5. Фридберг Шнепф, Ведомство фармацевтического консалтинга, Цуг, Швейцария, Использование препаратов иммуноглобулина для внутривенного введения в неонатологии и акушерстве.//Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии, 2002, т.1, №1., -с.12-22.
6. И.Д.Фесенко. Научный центр здоровья детей РАМН, Москва. Рациональное использование иммуноглобулина человеческого нормального для внутривенного введения. Педиатрическая фармакология/2007/ том 4/ №1.
7. В.В. Анастасиев, Иммуноглобулин для внутривенного введения. Н-Новгород: Изд-во Нижегородской государственной мед. академии. 2000. 168 с .
8. Русанов В.М., Скобелев Л.И. Фракционирование белков плазмы в производстве препаратов крови. Москва: Медицина. 1983. 224 с.
9. Куришук К.В., Куркіна О.В., Скринник М.М., Самойленко В.А. Хроматографічна очистка імуноглобулінів G як один із етапів сольвент/ детергентної інактивації вірусів у технологічній схемі виробництва білкових препаратів плазми. Укр. Журн. гематології та трансфузіології 2006; 5 (6): 29–33.
- 10.Куришук К.В., Куркіна О.В., Самойленко В.А., Скринник М.М. Деякі аспекти якості та вірусної безпеки препаратів крові, впроваджені на ЗАТ «БІОФАРМА». Укр. Журн. клінічної та лабораторної медицини 2006; 2 (1): 59.
- 11.Human normal immunoglobulin for intravenous administration 01/2005: 0918 corrected: in European Pharmacopoeia 5.0. EDQM. Published on the accordance with the convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia. Strasbourg. 2005.
- 12.Human normal immunoglobulin Immunoglobulinum 01/2005: 0338 corrected: in European Pharmacopoeia 5.0. EDQM. Published on the

accordance with the convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia. Strasbourg. 2005.

13. Медичні імунобіологічні препарати. Настанова з якості. Керівництво по складанню аналітично-нормативної документації на імуноглобулін людини нормальний, рідкий. Настанова 42-3002-003-2005. Київ. 2005. Міністерство охорони здоров'я України.
14. Методические указания по определению антиальфафафилолизина в сывороточных препаратах крови человека и животных. М. 1984, с.19
15. Инструкция по применению диагностикума эритроцитарного коревого антигенного сухого для реакции пассивной гемагглютинации (РПГА), ФГУ, С.-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Пастера МЗ РФ, утв 1997 г