

УДК 573.6.086.83:577.21:[615.373.3+615.277]

М.А. ЖУЧЕНКО*, Н.А. ГАВРИЛОВА, С.А. ЧЕРЕПУШКИН, А.А. КЛИШИН, А.Е. КУХАРЕНКО

Государственный научный центр Российской Федерации ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва, 117545

e-mail: axiflipper@gmail.com

Разработка компонентного состава активных фармацевтических субстанций на основе гибридных рекомбинантных белков Е7-БТШ70

В работе изучали подходы к стабилизации в растворе гибридных рекомбинантных онкопротеинов Е7 16-го и 18-го типов, конъюгированных с белком теплового шока 70. Скрининг активных фармацевтических субстанций был проведен методом «ускоренного хранения» при повышенных температурах. Первый этап исследования был нацелен на определение диапазона рН, обеспечивающего наибольшую стабильность физико-химических показателей качества белков, который оказался равен 6,8—7,4. Второй и третий этапы работы, направленные на определение вспомогательных веществ, вносящих наибольший вклад в увеличение стабильности белков при хранении в растворе, показали, что сахароза и полисорбат 80 позволяют получить наиболее стабильную композицию. Температура хранения -20° позволяет сохранять необходимые показатели качества субстанций в течение как минимум 12 мес.

Ключевые слова: активная фармацевтическая субстанция, вирус папилломы человека, метод «ускоренного хранения», скрининг, стабильность.

Белки Е7-БТШ70, описанные в настоящей работе, являются действующими веществами терапевтической вакцины против заболеваний аногенитальной области, вызванных вирусом папилломы человека 16 и 18 типов [1]. Они представляют собой гибридные белки, состоящие из конъюгированных онкопротеина Е7 ВП4 и белка теплового шока 70 кДа. Производство ГЛФ препарата включает в настоящее время получение промежуточного полупродукта, содержащего действующее вещество — активной фармацевтической субстанции АФИ. На АФИ, в свою очередь, налагается

ряд нормативных требований, основным из которых является стабильность при хранении в течение заявленного срока годности. Температура хранения АФИ обычно составляет от 5° до -20° , срок годности — не менее 12 мес [2, 3].

Поскольку активным компонентом иммунобиологических АФИ являются белки, сохранение химического строения и конформации и соответственно биологической активности зависит от эндо- и экзогенного воздействия окружающей среды. Это определяет повышенную чувствительность АФИ к таким факторам, как изменение температу-

Жученко Максим Андреевич, Гаврилова Наталья Андреевна, Черепушкин Станислав Андреевич, Клишин Анатолий Анатольевич, Кухаренко Андрей Евгеньевич.

Список сокращений: АФИ — активный фармацевтический ингредиент (субстанция); БТШ70 — белок теплового шока 70 кДа; ВПЧ — вирус папилломы человека; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ГЛФ — готовая лекарственная форма; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота; ЭФ в ПААГ — электрофорез в полиакриламидном геле; Е7 — онкопротеин №7 вируса папилломы человека; FDA (Food and Drug Administration) — Департамент пищевых и медицинских продуктов (США).

* Автор для переписки.

ры, воздействие окислителей, света, ионного состава и др. [4].

Для установления срока годности иммунобиологических лекарственных препаратов по требованиям Российской Федерации используют временную инструкцию на основе метода «ускоренного хранения» при повышенной температуре [5]. Метод основан на изучении кинетики реакций разложения лекарственных веществ. Используя факторы, ускоряющие химические реакции, можно в короткие сроки количественно установить изменения, происходящие с АФИ при длительном хранении. Чаще остальных в методе ускоренного хранения используют фактор повышенной температуры. Зарубежные руководства по установлению сроков годности, изданные такими организациями как ICH [2] и ЕМА [6, 7], в своей основе также содержат инструкции по изучению температурной зависимости скорости протекания физико-химических процессов.

Метод ускоренного хранения также используют для скрининга АФИ на этапе фармацевтической разработки [8]. В ходе скрининга сравнивают изменения критических показателей качества серий целевого препарата с использованием различных вспомогательных веществ. На основании различий в стабильности тестируемых серий делают заключение о наиболее эффективных добавках. Повышенная температура, используемая в методе ускоренного хранения при скрининге АФИ, обычно выбирается экспериментальным путем на основании статистически значимых изменений показателей качества белка во времени [9].

При выборе вспомогательных веществ необходимо учитывать их совместимость с действующим веществом (влияние на физико-химические свойства активных компонентов), другими вспомогательными веществами, а также влияние на терапевтическую эффективность и безопасность при введении пациенту.

Целью данной работы был выбор способов стабилизации активных фармацевтических субстанций E7(16)-БТШ70 и E7(18)-БТШ70 на основе изучения динамики критических аналитических показателей качества под влиянием как температурно-временных факторов, так и компонентного состава.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве исходного сырья использовали очищенные белки E7(16)-БТШ70 и E7(18)-БТШ70, полученные посредством трехстадийной хроматографической очистки во ФГУП «ГосНИИГенетики» [настоящее издание, с. 29].

Гель-электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли в невосстанавливающих условиях в 8%-ном ПААГ с последующим окрашиванием Coomassie R250. Интенсивность окрашивания белковых полос оценивали с помощью программного обеспечения GenTools.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Хроматографическое разделение компонентов белкового препарата проводили с помощью хроматографической системы Dionex UltiMate 3000 (Dionex) с градиентной подачей элюентов, дегазатором, автосамплером (возможностью сбора фракций), термостатом для колонок, а также с UV-детектором под управлением программного обеспечения Chromeleon 6.8.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Superose 6 (размер колонки 300×10 мм), фирма-производитель GE Healthcare (Швеция). Подачу элюента осуществляли в изократическом режиме со скоростью потока 0,5 мл/мин.

В качестве подвижной фазы использовали 50 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия, pH 7,0±0,1 (Sigma-Aldrich). Детекцию белка осуществляли при длине волны 210 нм. Температура колонки составляла 15 — 25°; температура автосамплера — 4 ± 1°; нагрузка по белку на колонку была равна 20 мкг.

Определение содержания общего белка проводили колориметрическим методом с бичинхоиновой кислотой в соответствии с инструкцией к коммерческому набору Pierce™ BCA Protein Assay Kit [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стабильность рекомбинантных белков E7(16)-БТШ70 и E7(18)-БТШ70 в растворе оценивали путем экспериментального определения критических параметров среды, окружающей белки, способных обеспечить сохранение конформации последних и, как следствие, их физико-химических и биологических свойств. Существует ряд теоретических инструментов, способных предсказывать критические параметры среды перед их экспериментальным определением.

При значении pH, равном значению изоэлектрической точки, белок выпадает в осадок; в связи с этим наиболее «комфортное» значение pH должно быть удалено от значения pI как минимум на ±1 [11].

Расчетное значение pI , полученное при помощи интерактивной программы Protein Calculator v3.3 [12], составило 5,05 для E7(16)-БТШ70 и 5,18 для E7(18)-БТШ70. Титрование раствора E7(16)-БТШ70 показало, что белок выпадает в осадок при достижении раствором значения pH 4,7. Таким образом, приемлемый для стабильного хранения исследуемых белков диапазон значений pH должен удовлетворять условию $pH \geq 6$ или $pH \leq 4$. Значения $pH \leq 4$ и $pH \geq 8$ не исследовали из-за их несоответствия требованиям изогидричности, предъявляемым к инъекционным препаратам (pH инъекционных растворов должен быть максимально близок к значениям pH физиологических жидкостей организма — 7,0—7,4) [13]. Помимо этого, диапазон $pH \leq 4$ несовместим с процессом сорбции при изготовлении вакцин, протекающим преимущественно при основных и нейтральных значениях pH [14, 15].

Первый и второй этапы исследования были проведены только с E7-БТШ70 16 типа, так как он был получен раньше, чем гибридный белок 18 типа. Данные, полученные на первом и втором этапах для компонентного состава АФИ E7(16)-БТШ70, были перенесены на АФИ 18 типа и подтверждены при изучении ее стабильности на третьем этапе исследования.

Фракция целевого белка, полученная в результате трехстадийной хроматографической очистки, была переведена в 25 мМ фосфатный буфер путем диализа. Фосфатный буферный раствор выбран как обладающий высокой буферной емкостью в указанном диапазоне значений pH [16]. Молярность раствора выбрана как усредненное значение для буферов, наиболее часто используемых при стабилизации АФИ и ГЛФ [16]. С целью экспериментального определения диапазона pH были приготовлены восемь опытных серий E7(16)-БТШ70 (описание серий приведено в табл. 1). Для достижения требуемых значений pH растворы после диализа титровали 0,5 М раствором гидроксида натрия или 0,5 М раствором фосфорной кислоты. Для соблюдения равенства концентраций E7(16)-БТШ70 в образцах приготовленные серии доводили до одинакового объема фосфатным буферным раствором.

Исследования приготовленных серий проводили методом ускоренного хранения. Тестируемые температуры первого этапа работы было решено установить равными 5° и 25°, срок тестирования — 60 сут при контроле каждые 20 сут. Для каждой контролируемой точки в ходе исследования определяли степень деградации белка, которую оценивали путем сопоставления относитель-

ной интенсивности белковых полос, полученных в результате электрофореза в ПААГ в невосстанавливающих условиях, мономера E7(16)-БТШ70, олигомеров и низкомолекулярных продуктов деградации, а также содержание белка и примесей (электрофорез) и конечное значение pH .

Установлено, что выдерживание при температуре 5° (в отличие от 25°) не позволяет выявить существенных изменений в значениях выбранных показателей качества на протяжении всего срока хранения (60 сут).

Результаты контроля во время хранения при температуре 25° (рис. 1) на первом этапе показали, что для серий с низким значением pH (№ 04, 05) относительное уменьшение содержания мономерной формы E7(16)-БТШ70 сопровождалось снижением концентрации общего белка. Та же тенденция прослеживается и для серии № 11. Данные, полученные для серий № 06—10, находящихся в диапазоне нейтральных значений pH , показывают медленное развитие процесса деградации белка. Контроль pH на всех этапах опыта не показал значительных изменений для серий № 06—10. Для исключения рисков, связанных с возможными критическими изменениями показателей качества АФИ при долгосрочном хранении, было решено остановиться на стартовом значении pH 6,8, так как даже при росте pH на 0,6 ед., что зачастую наблюдается при хранении белковых препаратов, pH не должен превысить приемлемого значения 7,4.

Таблица 1

Условия 1 этапа исследования АФИ E7(16)-БТШ70

Номер серии	$pH_{теор}$	$pH_{реал}$	Титрование	
			0,5 М NaOH	0,5 М H_3PO_4
04	6,2	6,228		+
05	6,4	6,396		+
06	6,6	6,572		+
07	6,8	6,811		+
08	7,2	7,230	+	
09	7,4	7,386	+	
10	7,6	7,594	+	
11	7,8	7,823	+	

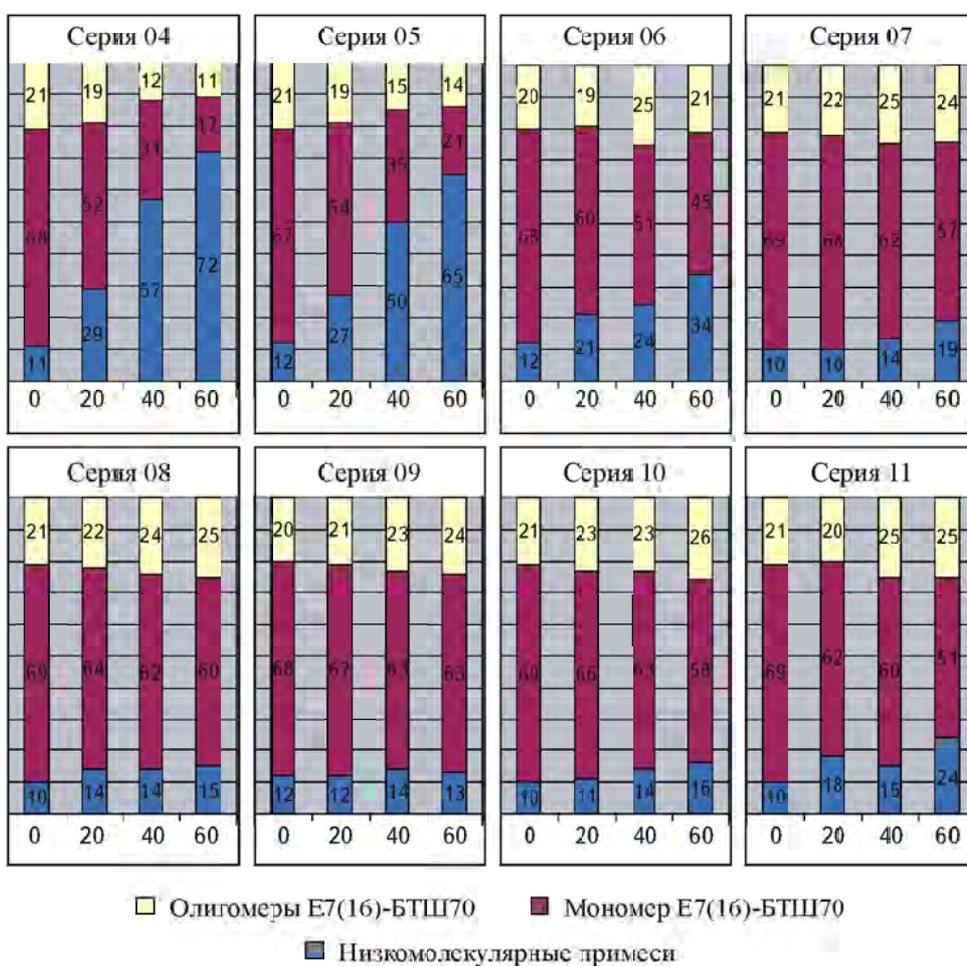
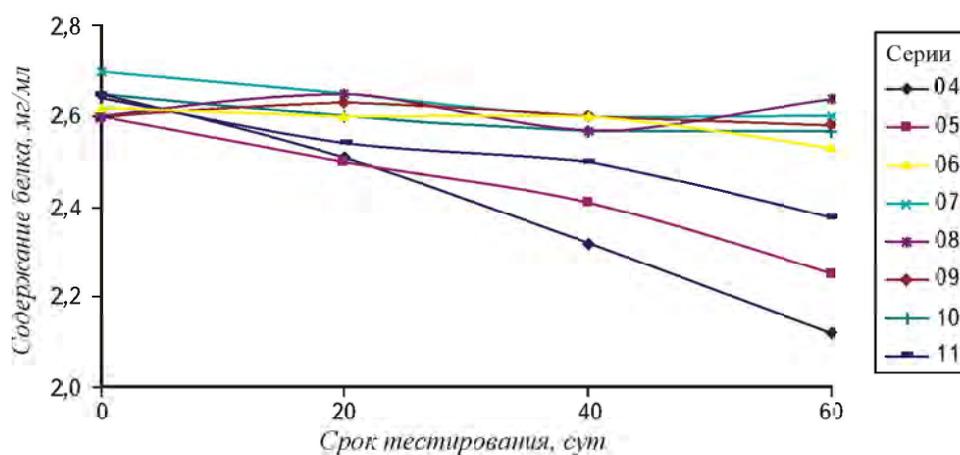


Рис. 1. Влияние pH на параметры АФИ при ускоренном хранении: суммированы данные о хранении серий (см. табл. 1) при 25° в течение 60 дней. На графике отображена динамика снижения содержания общего белка. На гистограмме приведены данные о соотношении (%) низкомолекулярных примесей, мономера и олигомеров E7(16)-БТШ70 в АФИ при контроле на 0-е, 20-е, 40-е и 60-е сутки тестирования

Второй этап исследования включал скрининг вспомогательных веществ, вносящих значительный вклад в стабилизацию E7(16)-БТШ70 в

растворе, для их последующего использования в составе АФИ (табл. 2).

Содержание гибридного белка и вспомогательных компонентов, внесенных в АФИ перед хранением (2-й этап исследования)

Номер серии	Компонент	Содержание, мг/мл
1	2	3
13	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
14	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	ЭДТА	0,75
15	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	L-Метионин	0,75
16	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	L-Гистидин	0,75
17	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	Полисорбат 80	0,005
18	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	Полоксамер 188	0,01
19	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	L-Глицин	50

1	2	3
20	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	Сахароза	50
21	E7(16)-БТШ70	2,8
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	Трегалоза дигидрат	50

Ранее, при изучении продуктов деградации E7(16)-БТШ70, было определено, что эти продукты состоят из высокомолекулярных соединений, образованных в результате олигомеризации целевой молекулы, а также низкомолекулярных пептидов, являющихся прямым продуктом процессов дезинтеграции биомассы и гидролиза. На основании работ по установлению природы примесных продуктов [настоящее издание, с. 29] была предложена стратегия стабилизации АФИ за счет включения в его состав компонентов, препятствующих образованию олигомеров и протеканию процесса гидролиза.

Антиоксиданты L-метионин и ЭДТА способствуют подавлению процессов окисления, являющихся одними из вероятных факторов активации гидролиза [17]. ЭДТА помимо антиокислительной активности обладает широко известной способностью хелатировать ионы тяжелых металлов, зачастую содержащихся в среде после процессов культивирования и очистки и способных сорбироваться на белках, образуя агрегатные комплексы [18]. Известно, что аминокислоты положительно влияют на стабильность белков; механизм стабилизации аминокислотами ясен не до конца, однако считается, что стабилизирующий эффект данных соединений связан со снижением способности к поверхностной адсорбции у протеинов и ингибированием образования агрегатов [19]. Помимо L-метионина, свойства которого более выражены в области антиокислительной защиты, были протестированы аминокислоты L-гистидин и L-глицин. Неионогенные поверхностно-активные вещества препятствуют образованию олигомеров, а также, сорбируясь на поверхности первичной

упаковки белка, препятствуют аналогичной сорбции других белков [20].

Для второго этапа исследования были предложены поверхностно-активные вещества полисорбат 80 и полоксамер 188 как положительно зарекомендовавшие себя во множестве ранее проведенных исследований [21, 22]. Невосстанавливающие дисахариды D-трегалоза дигидрат и сахароза проявили себя как эффективные агенты для стабилизации белков. Предполагается, что механизм этой стабилизации связан со способностью дисахаридов специфически связываться с молекулами воды, тем самым уменьшая негативное воздействие воды на белковые молекулы [23]. Помимо указанного свойства дисахаридов их введение в состав тестируемых АФИ связано с другой известной функцией — криопротекцией [24]; такая же функция описана и для L-глицина. Влияние выбранных дисахаридов на АФИ исследовали во время длительного хранения при -20° .

Все выбранные для скрининга вспомогательные вещества входят в список GRAS (Generally Recognized as Safe) [25] и описаны в монографиях текущих версий Европейской и Американской фармакопей. Вещества включены в «Список неактивных ингредиентов» FDA, регламентирующий их использование в составе таблеток, растворов, сиропов, препаратов для местного и инъекционного применения, а также парентеральных форм.

Для всех тестируемых композиций на основании данных первого этапа исследования было установлено базовое значение pH 7,0 при выравнивании концентраций АФИ добавлением буферного раствора. Серии хранили в присутствии 150 мМ хлорида натрия как обязательного компонента бу-

Схема скрининга стабилизаторов при ускоренном хранении АФИ (37°)

Срок, сут \ Метод	Электрофорез в ПААГ	Определение белка с бичинхиновой кислотой	Эксклюзионная ВЭЖХ	Потенциометрия
0	+	+	+	+
20	+	+	-	+
40	+	+	-	+
60	+	+	-	+
80	+	+	+	+

ферного раствора эксклюзионной хроматографии — финального этапа хроматографической очистки Е7(16)-БТШ70. Серия № 13 не содержала дополнительных компонентов и может быть использована в качестве образца сравнения для оценки степени влияния выбранных вспомогательных веществ на стабильность белка.

В связи с внесением стабилизаторов для получения более заметных изменений в контролируемые показатели качества по сравнению с первым этапом исследования было решено увеличить температуру тестирования до 37°, а срок продлить до 80 дней при периодичности контроля 20 дней. Для контроля серий помимо использованных на первом этапе методов была введена дополнительная эксклюзионная ВЭЖХ, позволяющая более точно оценить соотношение мономерной формы Е7(16)-БТШ70 и продуктов его олигомеризации. Схема эксперимента представлена в табл. 3.

Полученные данные целесообразно интерпретировать, оценивая результаты, полученные для каждой из изучаемых подгрупп стабилизаторов. Так, введение аминокислот L-метионина, L-гистидина и L-глицина (серии № 15, 16 и 19) не оказывало значительного влияния на стабильность белка независимо от концентрации этих компонентов. Степень деградации белка в образцах, содержащих ЭДТА (серия № 14), не позволяет оценить этот компонент как повышающий стабильность субстанции. Тестируемая группа поверхностно-активных веществ (полисорбат 80 и поллоксамер 188, серии № 17 и 18, соответственно) вносила незначительный вклад в увеличение стабильности белка при хранении (рис. 2).

Наибольший вклад в стабилизацию Е7(16)-БТШ70 в растворе вносят сахара и

D-трегалоза дигидрат (см. рис. 2, серии 20 и 21, соответственно). Данные, полученные методом эксклюзионной ВЭЖХ (не приведены), в целом совпадают с результатами электрофоретического определения содержания белка. Они подтверждают, что деградация мономерной формы белка Е7(16)-БТШ70 протекает с увеличением количества его агрегированных форм и низкомолекулярных примесей.

Третий этап исследования был направлен на установление оптимального содержания в препарате АФИ Е7(16)-БТШ70, а также Е7(18)-БТШ70. Схема скрининга предполагала использование метода ускоренного хранения при 37° параллельно с хранением при -20°. Использование ускоренного хранения позволяет значительно сократить срок тестирования и ускорить разработку оптимальных условий хранения. Однако влияние, например, криопротекторов на стабильность белков при замораживании может быть оценено только в результате долгосрочного хранения при -20° и окончательное подтверждение роли того или иного агента в стабильности белков АФИ должно опираться только на данные по долгосрочному изучению стабильности препарата при заявленной температуре.

В эксперименте сравнивали влияние комбинаций стабилизаторов, выбранных по результатам второго этапа исследования на свойства при хранении гибридных белков, полученных на основе Е7 16 и 18 типов. Для сокращения количества анализов было решено отказаться от тестирования D-трегалозы дигидрата, аналогичного по свойствам сахарозе и менее доступного при промышленном производстве. Композиционный состав приведен в табл. 4. Схема скрининга аналогична использованной на втором этапе.

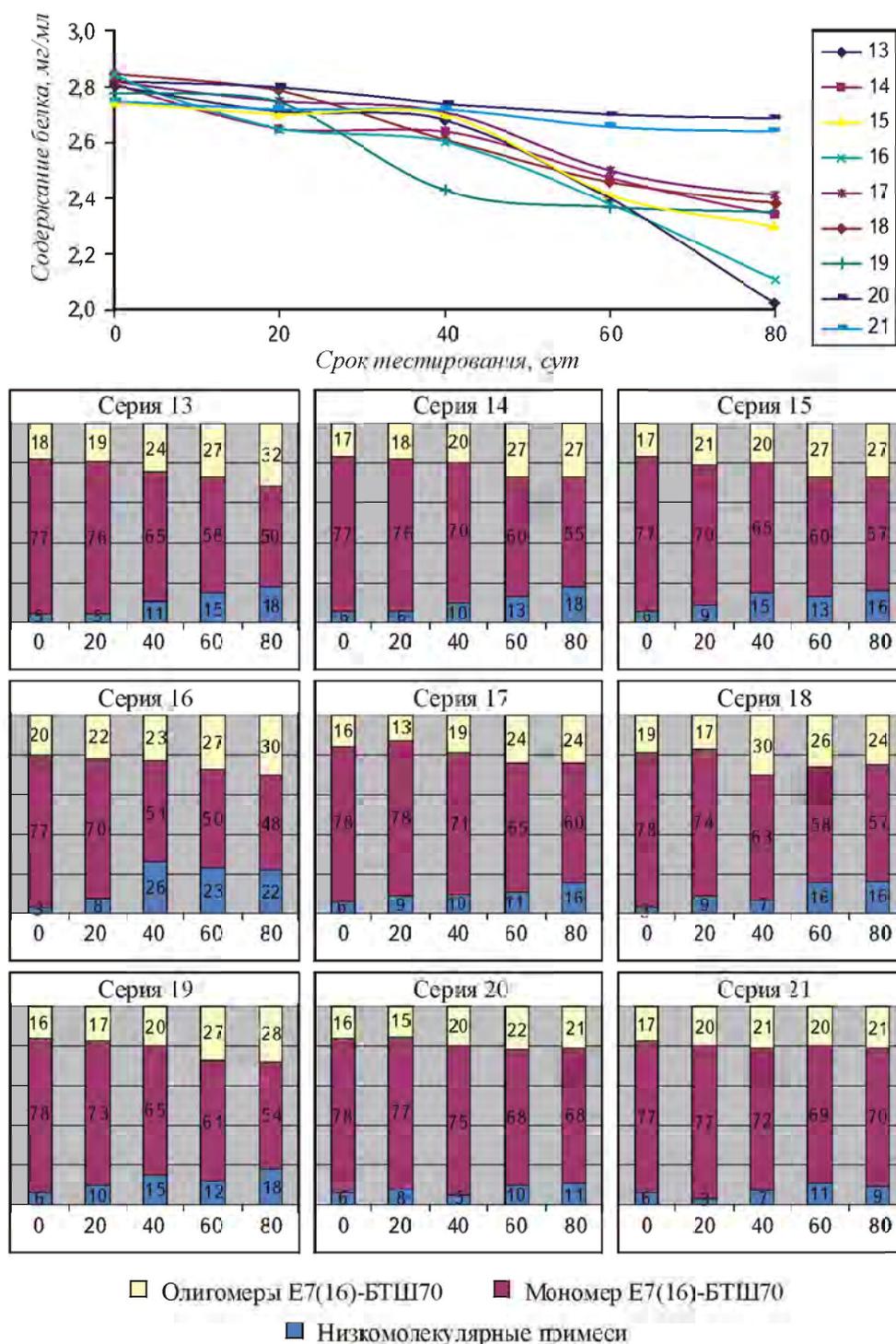


Рис. 2. Влияние скрининга различных стабилизаторов на параметры АФИ при ускоренном хранении: суммированы данные при хранении серий (см. табл. 2) при 37° в течение 80 дней. На графике отображена динамика снижения содержания общего белка. На гистограмме приведены данные соотношения (%) низкомолекулярных примесей, мономера и олигомеров E7(16)-БТШ70 в АФИ при контроле на 0, 20, 40, 60 и 80 сутки тестирования

Белок 18 типа был очищен с помощью трехстадийной хроматографии; использованные условия были аналогичны таковым при очистке

E7(16)-БТШ70. Тестируемые варианты состава серий АФИ E7(18)-БТШ70 копировали таковые для АФИ E7(16)-БТШ70. Результаты третьего этапа

Содержание гибридных белков на основе E7 16 и 18 типов и вспомогательных компонентов, внесенных в АФИ перед хранением (3-й этап исследования)

Номер серии	Компонент	Содержание, мг/мл
25	E7(16)-БТШ70	2,5
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
26	E7(18)-БТШ70	2,5
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
27	E7(16)-БТШ70	2,5
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	Полисорбат 80	0,005
28	E7(18)-БТШ70	2,5
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	Полисорбат 80	0,005
29	E7(16)-БТШ70	2,5
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	Полисорбат 80	0,005
	Сахароза	50
30	E7(18)-БТШ70	2,5
	Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,86
	Натрия гидрофосфат додекагидрат	6,72
	Натрия хлорид	8,77
	Полисорбат 80	0,005
	Сахароза	50

скрининга, полученные методом ускоренного хранения (данные не приведены), предсказуемо указывали на увеличение стабильности серий при увеличении количества вносимых вспомогательных веществ. В то же время, использование наиболее эффективных с точки зрения стабильности составов вспомогательных веществ в сериях № 28 — 30

повлекло бы расширение спецификации на АФИ в части дополнительных методов контроля качества — определение содержания полисорбата 80 и сахарозы, а также увеличение стоимости выходного продукта производства. Выбор составов № 25 и 26 мог привести к потере стабильности до истечения предполагаемого срока годности.

Хранение серий при -20° в течение 80 дней, напротив, не выявило существенных отличий между составом вспомогательных веществ и не позволило однозначно определить оптимальное содержание АФИ. Такой выбор предполагается сделать после получения данных о стабильности трех приоритетных составов АФИ (25, 27, 29 — для Е7 16 типа; 26, 28, 30 — для Е7 18 типа) во время долгосрочного хранения при -20° и в условиях контроля более широкого спектра параметров качества.

Изучение стабильности трех указанных составов АФИ Е7(16)-БТШ70 и Е7(18)-БТШ70 при хранении при -20° в течение 12 мес с периодичностью контроля в 3 мес подтвердило данные ускоренного хранения, показав, что только состав компонентов в сериях № 29 и 30 способен обеспечить сохранность показателей качества белков. Составы, стабилизированные полисорбатом 80 (серии № 27 и 28), не прошли испытания по показателю чистоты (гель-фильтрация и электрофорез в ПААГ), продемонстрировав неудовлетворительные значения контролируемых показателей через 12 мес хранения. Состав серий № 25 и 26 начиная с 9-го месяца контроля также не удовлетворял установленным требованиям качества. Таким образом, при долгосрочных испытаниях была выявлена стабильность субстанций Е7(16)-БТШ70 и Е7(18)-БТШ70 при хранении при -20° в течение 12 мес и выбран оптимальный состав вспомогательных веществ (сахароза + полисорбат 80), обеспечивающий стабильность белка в течение всего срока хранения.

Экспериментальное изучение стабильности белков Е7-БТШ70 в растворе позволило определить критические параметры факторов окружающей среды и исследовать влияние вспомогательных веществ на стабильность показателей качества белков. Было показано, что значения рН, выходящие за рамки диапазона 6,8—7,4, негативно влияют на стабильность белков, провоцируя гидролиз, приводящий к образованию низкомолекулярных примесей. Скрининг вспомогательных соединений, принадлежащих к аминокислотам, поверхностно-активным веществам, хелатирующим агентам и невосстанавливающим дисахаридам позволил выявить группу агентов (сахара, ПАВ), которые заметно увеличивают стабильность белков при хранении в условиях повышенной температуры (ускоренное хранение).

Комбинация сахарозы и полисорбата 80, использованная для стабилизации, позволила получить АФИ, сохраняющую показатели качества в пределах спецификации в течение 12 мес

при хранении при -20° . Долгосрочные испытания показали, что состав компонентов, определенный для АФИ Е7(16)-БТШ70, эффективен и в отношении субстанции белка Е7(18)-БТШ70, что можно объяснить их близкими физико-химическими свойствами.

Получено 30.01.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Munger, K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis / K. Munger, A. Baldwin, K.M. Edwards, H. Hayakawa, C.L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, K. Huh // J. Virol. — 2004. — V. 78. — N. 21. — P. 11451—11460.*
2. *Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A(R2) // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [электронный ресурс]. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf*
3. *Guideline on declaration of storage conditions: In the product information of medicinal products and for active substances (CPMP/QWP/609/96/rev 2), [электронный ресурс]. URL: <http://www.ema.europa.eu>*
4. *Yoshioka, S., Stella, V.J. Stability of Drugs and Dosage Forms. — New York: Kluwer Academic Publisher, 2002. — P. 102—221.*
5. *Временная инструкция по проведению работ для определения сроков годности лекарственных средств на основе метода ускоренного старения при повышенной температуре (И-42-2-82). Введена приказом № 430/224 от 18.04.1983 Министерства здравоохранения СССР и Министерством медицинской промышленности. — М.: Мин-во здравоохранен. СССР, Мин-во мед. пром-ти, 1983. — С. 1—13.*
6. *Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C [электронный ресурс]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002803.pdf*
7. *Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B [электронный ресурс]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf*
8. *The development of therapeutic monoclonal antibody products. A comprehensive guide to CMC activities from clone to clinic. BioProcess Technology Consultant, Inc. and General Electric Company. — Uppsala: Elanders Sverige AB, 2010. — P. 199—233.*
9. *Петухов В.Г. Определение стабильности отраслевых стандартных образцов (ОСО) и других МИБП ускоренным методом. Методические рекомендации. Утверждены Учёным Советом ГИСК им. Л.А.Тарасевича. — М.: Медицина, 1990. — В. 2. — С. 400.*
10. URL: <http://www.thermoscientific.com/pierce>

11. *Antosiewicz, J.* Prediction of pH-dependent properties of proteins / J. Antosiewicz, J.A. McCammon, M.K. Gilson // *J. Mol. Biol.* — 1994. — V. 238. — P. 415—436.
12. URL: <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>
13. *Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.* Биологическая химия: Учебник [Под ред. акад. АМН СССР С. С. Дебова].— 2-е изд., перераб. и доп.— М.: Медицина, 1990.— С. 452—455.
14. *Al-Shakhshir, R.H.* Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants / R.H. Al-Shakhshir, F.E. Regnier, J. L. White, S.L. Hem // *Vaccine.* — 1995. — V. 13. — N. 1. — P. 41—44.
15. *Wolff, L.* Forces determining the adsorption of a monoclonal antibody onto an aluminium hydroxide adjuvant: Influence of interstitial fluid components / L. Wolff, J. Flemming, R. Schmitz, K. Groger, C. Goso, C. Muller-Goymann // *Vaccine.* — 2009. — V. 27. — P. 1834—1840.
16. *Stellars, S.* Principles of biopharmaceutical protein formulation: an overview / S. Stellars, M. Yuh-Fun // *Humana Press Inc.* — 2005. — V. 308. — P. 243—264.
17. *Patra, R. C.* Antioxidant effects of α tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats / R.C. Patra, D. Swarup, S.K. Dwivedi // *Toxicology.* — 2001. — V. 162. — N. 2. — P. 81—88.
18. *Wu, L. H.* Effects of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of a heavy metal polluted soil / L.H. Wu, Y.M. Luo, P. Christie, M.H. Wong // *Chemosphere.* — 2003 — V. 50. — N.6. — P. 819—822.
19. *Fayed, M.E.* Enhancing the stability of recombinant human erythropoietin in albumin-free formulations. / A Dissertation of Bahgat Mohammed Ezzat Fayed // *B. Pharm. Sci.* — 2004.
20. *Privé, G.G.* Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins // *Elsevier.* — 2007. — V. 41. — N. 4. — P. 388 — 397.
21. *Wang, W.* Dual effects of Tween 80 on protein stability / W. Wang, Y.J. Wang, D.Q. Wang // *Int. J. Pharmac.* — 2008. — V. 347. — N. 1—2. — P. 31—38.
22. *Lourenco, C.* Steric stabilization of nanoparticles: size and surface properties / C. Lourenco, M. Teixeira, S. Simões, R. Gaspar // *Int. J. Pharmac.* — 1996. — V. 138. — N. 1. — P. 1—12.
23. *Jovanovic, N.* Distinct effects of sucrose and trehalose on protein stability during supercritical fluid drying and freeze-drying / N. Jovanovic, A. Bouchard, G.W. Hofland, G.J. Witkamp, D.J. Crommelin, W. Jiskoot // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2006. — V. 27. — N. 4. — P. 336 — 345.
24. *Chen, Y.* Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm / Y. Chen, R.H. Foote, C.C. Brackett // *Cryobiology.* — 1993. — V. 30. — N. 4. — P. 423 — 431.
25. URL: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>

M.A. ZHUCHENKO*, N.A. GAVRILOVA,
S.A. CHEREPUSHKIN, A.A. KLISHIN,
and A.E. KUKHARENKO

The Stale Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545, Moscow Russia

e-mail: axiflipper@gmail.com

Design of Composition of Active Pharmaceutical Ingredients based on E7-HSP70 Hybrid Recombinant Proteins

The approaches to the stabilization of the recombinant fusion oncoproteins E7 16 and 18 conjugated with heat shock protein 70 in solutions have been studied. The screening of pharmaceutical active substances was carried out by the accelerated storage test at elevated temperatures. The first stage of the study was aimed at determining of the pH range providing the best stability of the physicochemical quality parameters of the proteins which turned to be 6.8—7.4. The second and third steps were aimed at identification of excipients that make the greatest contribution to the increased storage stability of proteins in solution showed that sucrose and polysorbate 80 constitute the most stable composition. The temperature –20 °C allows to keep the quality parameters on a desired level for at least 12 months.

Key words: accelerated storage test, active pharmaceutical ingredient, human papilloma virus, screening, stability.

* Author for correspondence.