УДК 615.07

МЕТОД УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ СТАБИЛИЗИРОВАННОЙ ФОРМЫ АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА

А.А. Губайдуллина[1], Е.В. Бобкова[2], А.И. Мелентьев[1]

[1]Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Республика Башкортостан
[2]ФГУП НПО «Микроген» филиал «Иммунопрепарат», Уфа, Республика Башкортостан

Введение

При разработке препаратов на основе интерферона основные проблемы, с которыми сталкиваются разработчики, связаны с биологической нестабильностью интерферонов, имеющих гликопротеиновую структуру.[1] Подобно другим протеинам интерферон в водных растворах подвержен механизмам химического разложения, таким как протеолиз, окисление, дисульфидный обмен, олигомеризация, деаминирование и физическим механизмам, таким как агрегация, осаждение и адсорбция. Подобные изменения влияют на срок годности.[2] Поэтому растворы интерферона содержат добавки, которые противодействуют этим эффектам. Например, в торговых препаратах в качестве стабилизатора используют сывороточный альбумин человека (HSA - human serum albumin), однако это связано с проблемами опасности вирусного заражения и образования агрегатов, что в свою очередь может привести к образованию антител. Поэтому появились растворы интерферона, в которых не используется HSA и которые содержат другие вспомогательные агенты. Кроме того, известно, что сохранение определенных значений pH 4,0-6,0 важно для стабильности растворов интерферона.

Большинство белков легко денатурируются или утрачивают биологическую активность в водном растворе. По этой причине многие фармацевтические компании разработали лиофилизированные композиции для улучшения стабильности белковых лекарственных продуктов. Однако лиофилизированная композиция белковых лекарственных средств имеет много недостатков. Поскольку процесс лиофильной сушки является дорогостоящим и требует дополнительного этапа повторного растворения перед введением лекарственного средства пациенту, он не является предпочтительным по сравнению с жидкой композицией с точки зрения экономичности или удобства.

В течение многих лет для определения стабильности лекарств использовался так называемый классический метод. Сущность его заключается в том, что лекарственное средство в течение периода, отводимого на его реализацию (обычно от 2 до 5 лет), хранят при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени оценивают качество хранящегося лекарства согласно ФС или ВФС. На основании результатов анализа делают заключение об оптимальном сроке хранения.

Основной недостаток таких испытаний заключается в том, что на их проведение уходит несколько лет. Ввиду этого задерживается возможность клинического применения нового лекарственного вещества, теряется актуальность его промышленного получения, так как за столь большой промежуток времени могут быть созданы новые эффективные средства аналогичного действия. Используемые в настоящее время методы исследования стабильности лекарственных средств основаны на определении их качества в условиях ускоренных испытаний.[3]

Цель настоящей работы – оценить применимость метода ускоренного старения для прогнозирования сроков хранения препаратов интерферона и осуществить отбор наиболее эффективных стабилизаторов, позволяющих сохранить активность водного раствора альфа-интерферона.

Методы исследования

Исследовали кинетику изменения противовирусной активности (ПВА) природного альфа-интерферона в композиции с различными известными стабилизаторами [4-8] в процессе хранения при различных температурах.

При составлении композиций препарата интерферона использовали в качестве антиоксидантов этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту, селенит натрия, глицин, окисленный глутатион, в качестве антиагрегантов - декстран – 40, декстран - 70, полиэтиленгликоль(Мм 6 kDa) и ингибиторы ферментов - гордокс (апротинин), аминокапроновая кислота.

Цитотоксичность используемых веществ определяли на перевиваемой линии клеток по ФС 42-3724-99.[12]

В качестве теста для скрининга использован метод ускоренного старения по Аррениусу с использование различных температур и времени хранения, разработанных для отраслевых стандартных образцов.[11]

Активность препарата при определенной температуре уменьшается со временем по закону мономолекулярной реакции:

$$P_t = P_0 * e^{-K_T t}$$

или в логарифмической форме

$$\ln P_t = \ln P_0 - \frac{K_T t}{2.3}$$

где P_t – активность образца после его хранения в течение времени t,

P_0 – исходная активность образца,

K_T – константа скорости дезактивации (потери активности) при данной температуре T,

e – основание натурального логарифма,

t – длительность хранения препарата.

Зависимость констант скоростей дезактивации от температуры подчиняется уравнению Аррениуса:

$$K_T = K_0 e^{-\frac{E}{R T}}$$

где K_T – константа скорости при температуре T,

K_0 – константа,

E – энергия активации реакции,

T – абсолютная температура,

R – газовая постоянная,

После логарифмирования это уравнение принимает вид:

$$\ln K_T = \ln K_0 - \frac{E}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

Из уравнения следует, что зависимость констант от обратной температуры носит линейный характер. Это дает возможность, зная три константы при трех разных температурах, методом экстраполяции определить константу при предполагаемой температуре хранения [10].

Образцы альфа-интерферона анализировали сразу после добавления стабилизатора, закладывали на хранение при температурах 28^0C, 42^0C и 52^0C в суховоздушных термостатах. В процессе хранения периодически проводили определение ПВА образцов. Определение ПВА проводят на перевиваемых (ФС 42-3724-99) линиях клеток, чувствительных к интерферону альфа-типа, выращенных в монослое в 96-луночных микропланшетах, в сравнении с ОСО активности интерферона (ОСО 42-28-90-93), методом нейтрализации противовирусной активности [12].

Результаты и обсуждение

Поскольку в литературных источниках отсутствуют данные о цитотоксичности выбранных стабилизаторов в отношении линии клеток, используемой для определения ПВА композиций интерферона в нашей работе, предстояло выяснить их нетоксичные концентрации для каждого индивидуального вещества.

Таблица 1. Определение нецитотоксичной концентрации стабилизатора.

Стабилизатор	pH	Концентрация стабилизаторов в известных композициях*,мг/мл	Нецитотоксичная концентрация, мг/мл
Окисленный глутатион	5.5	0,5	0,1
ЭДТА	5.5	1,5	0,3
Лимонная кислота	5.5	0,5	0,1
Декстран – 40	5.5	7	7
Декстран – 70	5.5	20	20
ПЭГ(6000)	5.5	20	10
Глицин	5.5	80	20
Селенит натрия	5.5	20	0,3
Гордокс	5.5	100 КИЕ/мл	25 КИЕ/мл
Аминокапроновая кислота	5.5	50	1,5
Аскорбиновая кислота	5.5	5	1

* - Литературные данные.

Как следует из представленных данных (табл.1), в большинстве предложенных ранее композиций, концентрации стабилизаторов, как правило, выше предела цитотоксичности к линии клеток (ФС 42-3724-99). В связи с этим, представляло интерес выяснить влияние «нетоксичных» концентраций стабилизаторов на характер изменения ПВА в процессе хранения водных композиций интерферона. С этой целью была проведена закладка малых серий стабилизированного интерферона с добавлением одного из этих стабилизаторов в нетоксичной дозе и использован метод ускоренного старения для определения характера изменения ПВА. Установлено, что характер изменения ПВА сохранялся в процессе хранения с различными стабилизаторами при повышенных температурах. (Рисунок 1)

Водный раствор интерферона, не содержащий стабилизирующих добавок, имеющий pH 5,5-6, сохраняет приемлемую стабильность при хранении $+5^0$C в течение 12 месяцев (сохраняется более 90% основного компонента).

Определив температурный коэффициент скорости (К) изменения ПВА от температуры хранения, заданной в условиях, можно рассчитать прогнозируемый срок годности препарата с данным стабилизатором. Для иммунобиологических препаратов принимается 10% допустимое падение активности [11]. Подобный расчет проводили для всех используемых стабилизаторов. Результаты испытаний представлены в таблице 2.

Из представленных данных следует, что лимонная и аминокапроновая кислоты, также как и гордокс (апротинин) не могут претендовать на роль моностабилизатора водного раствора альфа-интерферона. Добавление лимонной кислоты препятствует окислительно-восстановительному процессам, сохраняя раствор интерферона бесцветным, в то время как при хранении растворов, содержащих другие стабилизаторы и не содержащих лимонную кислоту, постепенно растворы приобретали окрашивание, особенно при повышенных температурах. С целью проверки предсказанных сроков годности классическим способом, была проведена закладка малых серий стабилизированного интерферона с добавлением в качестве антикоагулянтов ПЭГ и декстрана, предсказанный срок хранения которых составлял 65 и 80 сут. соответственно.

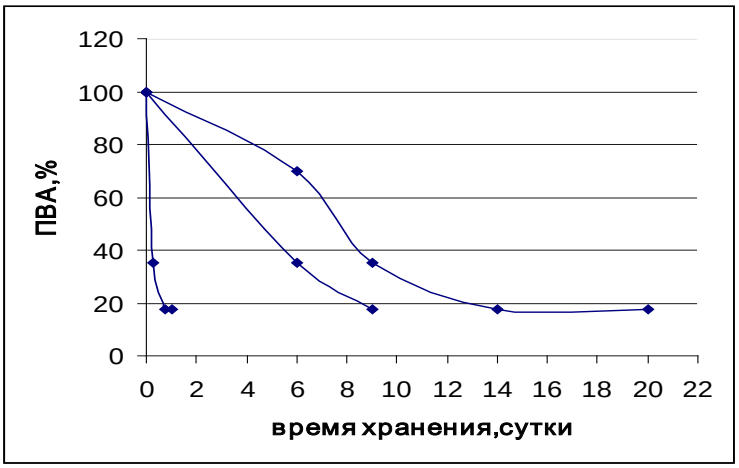

Рисунок 1 Падение активности стабилизированного альфа-интерферона при повышенных температурах в зависимости от времени хранения. Верхняя кривая – температура равна 28^0C, средняя кривая – 42^0C, нижняя кривая – 52^0C. Стабилизатор – селенит натрия (0,3 мг/мл).

Таблица 2 - Прогнозируемые сроки годности стабилизированной формы интерферона.

Стабилизатор	Заложенная концентрация,мг/мл	Рассчитанный срок годности, сут.
Окисленный глутатион	0,1	352
ЭДТА	0,3	36
Лимонная кислота	1	8
Декстран – 40	20	151
Декстран – 70	7	80
ПЭГ(6000)	10	65
Глицин	20	50
Селенит натрия	0,3	66,8
Гордокс	25 КИЕ/мл	16
Аминокапроновая кислота	1	20
Аскорбиновая кислота	1	88

Таблица 3 - Изменение ПВА стабилизированной формы интерферона

Стабилизатор	Заложенная концентрация, мг/мл	Исходная ПВА,тыс МЕ/мл	ПВА, после 1 мес. хранения, тыс. МЕ/мл	ПВА, после 8 мес. хранения, тыс. МЕ/мл	ПВА, после 11 мес. хранения, тыс. МЕ/мл
ПЭГ(6000)	10	5,6	5,6	5,6	5,6
Декстран -70	7	5,6	5,6	5,6	5,6

Согласно результатам (табл.3), на протяжении 11 месяцев хранения исходные титры интерферона оставались стабильными (5,6 тыс МЕ/мл). Таким образом полученные результаты показали, что несмотря на довольно низкие показатели по срокам хранения, полученные методом ускоренного «старения», при хранении стабилизированного интерферона при температуре +4-10^0C длительность сохранения ПВА оказалась намного больше.

Таким образом, правомерность полученных методом ускоренного «старения» результатов можно интерпретировать положительно с определенной степенью сомнения, поскольку ускоренный метод никогда не применялся ранее при изучении стабильности альфа-интерферона и разработан для субстанций, имеющих менее сложный состав и

биологическое действие. Он может быть использован в качестве первого ориентира для отбора наиболее перспективных стабилизаторов.

В следующей серии экспериментов нами использованы не моностабилизаторы, а комбинации, каждая из которых содержала антиоксидант, антиагрегант и ингибитор ферментов, в ранее установленных концентрациях. При подборе комбинаций принимали во внимание не только результаты, полученные ускоренным методом, но также их взаимную совместимость.[4-8]

К стабилизаторам при подборе комбинаций предъявляли определенные требования. Они должны быть нетоксичными, химически индифферентными по отношению к другим компонентам, входящим в состав препарата, к материалам лабораторного оборудования в процессе изготовления препарата и при хранении.

Комплексы должны проявлять необходимые функциональные свойства при минимальном содержании в препарате, выдерживать стерилизацию, быть экономически выгодными.

Как видно из приведенных в табл.4 данных несколько вариантов стабилизированного интерферона могут претендовать на срок хранения большим 1 года.

Выводы

Исследование кинетики изменения ПВА водного раствора природного альфа-интерферона в процессе хранения при различных температурах позволило использовать модель ускоренного старения в качестве первого ориентира для отбора наиболее перспективных стабилизаторов и прогнозирования срока хранения препарата при заданной температуре. Зависимость скорости изменения ПВА препарата от температуры хранения описывается уравнением Аррениуса, который использовали для подбора моно-, а также комплексов стабилизаторов.

В лабораторных опытах показано синергетическое действие некоторых комплексов стабилизаторов, позволяющее сохранить ПВА природного альфа-интерферона.

Таблица 4 - Прогнозируемые сроки годности альфа – интерферона, стабилизированного комплексом стабилизаторов

№	Комбинация стабилизаторов	Заложенная концентрация,мг/мл	Рассчитанный срок годности,дней
1	Декстран -40 Окисленный глутатион Аминокапроновая кислота	20 0,1 1	351,6
2	ПЭГ(6000) Окисленный глутатион Гордокс	10 0,1 25 КИЕ/мл	527,4
3	ПЭГ(6000) Лимонная кислота Аминокапроновая кислота	10 1 1	2109
4	Декстран -40 Глицин Аминокапроновая кислота	20 20 1	351
5	ПЭГ(6000) Селенит натрия Аминокапроновая кислота	10 0,3 1	16
6	ПЭГ(6000) Селенит натрия Гордокс	10 0,3 25 КИЕ/мл	26,5
7	Декстран -40 Селенит натрия Аминокапроновая кислота	20 0,3 1	264
8	ПЭГ(6000) Глицин Аминокапроновая кислота	10 20 1	219,7

Список литературы

1. Ершов, Ф.И. Система интерферона в норме и патологии /Ф.И.Ершов. - М.: Медицина, 1996. С. 12- 68.
2. Попов, В.Ф. Лекарственные формы интерферонов / В.Ф.Попов. - М.: Триада-Х, 2002. С. 21-27.
3. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия / В.Г.Беликов. - М.: Высшая школа, 1993. С. 192-198.
4. Пат. 2232595 С2 РФ, 7 А61К38/08. Композиция альфа-интерферона в форме водного раствора / Н.Г.Лебедева, Ф.И.Фролов и др. – Заявл 17.11.2000; Опубл. 20.07.2004.
5. Пат. 2255760 С2 РФ, 7 А61К38/21. Средство, обладающее иммуномодулирующим, противомикробным, антиоксидантным и регенерирующим действием (варианты) / В.Ф.Попов, Л.А.Денисов и др. – Заявл 11.03.2003; Опубл. 10.07.2005.
6. Пат. 2270692 С2 РФ, 7 А61К38/38. Пролонгированный раствор интерферона / В.В.Малиновская, Е.Ю.Малиновский и др. – Заявл 04.11.2004; Опубл. 27.02.2006.
7. Пат. 2238758 С2 РФ, 7 А61К9/08. Водный раствор альфа-интерферона-два человека для инъекций / В.П.Гурьев, А.А.Колокольцев и др. – Заявл 27.04.2004; Опубл. 10.05.2005.
8. Пат. 2251431 С2 РФ, 7 А61К38/19. Криопротекторное средство / В.А.Алешкин, С.С.Афанасьев и др. – Заявл 24.07.2002; Опубл. 27.10.2004.
9. Соловьев, В.Д. Интерфероны в теории и практике медицины / В.Д.Соловьев, Т.А.Бектемиров. - М.: Медицина, 1981. С. 85-90.
10. Петухов, В.Г. Определение стабильности Отраслевых Стандартных Образцов (ОСО) и других МИБП ускоренным методом: Методические рекомендации / В.Г.Петухов. - М.: Медицина, 2003, С.1-7.
11. Государственная Фармакопея СССР. 11-е изд. - М.:Медицина, 1990. – Вып.2. – 400 с.
12. ФСП 42-0504694605 Интерферон человеческий, лейкоцитарный. Лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 1000 МЕ. –Введ. 30.12.05 до 30.12.10.