

УДК 616.98; 578.824.11

РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ПРЕДПРИЯТИЯ (СОП) СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

Е.Г. Абрамова^{1*}, О.А. Лобовикова¹, И.В. Шульгина¹, А.В. Комиссаров^{1,2**},
Л.В. Савицкая¹, С.В. Генералов¹, М.В. Галкина¹, Ю.К. Гаврилова¹,
А.В. Кочкин¹, А.К. Никифоров^{1,2}

Резюме. В статье представлены данные по разработке стандартного образца предприятия (СОП) для определения специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на белых мышах. Приведены результаты аттестации СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина относительно первого и второго международных стандартных образцов иммуноглобулина человеческого против бешенства. СОП внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях и в отделе биологического и технологического контроля, и используется при проведении выпускающего контроля качества препарата антирабического иммуноглобулина коммерческих серий.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, международный стандартный образец, стандартный образец предприятия, специфическая активность.

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL SAMPLE TO ASSESS SPECIFIC ACTIVITY OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN OBTAINED FROM EQUINE BLOOD SERUM

E.G. Abramova^{1*}, O.A. Lobovikova¹, I.V. Shul'gina¹, A.V. Komissarov^{1,2**}, L.V. Savitskaya¹, S.V. Generalov¹,
M.V. Galkina¹, Yu.K. Gavrilova¹, A.V. Kochkin¹, A.K. Nikiforov^{1,2}

Abstract. The paper contains the data on the development of quality control sample (QCS) for determination of specific activity of heterologous anti-rabies immunoglobulin in neutralization test on white mice. Given are the results on QCS attestation in reference to international standard samples of human immunoglobulin against rabies. The quality control sample is put on the register of QCSs approved for application in experimental-production subdivisions and in the department of biological and technical control. It is deployed for final quality control of anti-rabies immunoglobulin preparation in commercial batches.

Keywords: anti-rabies immunoglobulin, international reference sample, quality control sample, specific activity.

1 – ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

2 – ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», 410012, Россия, г. Саратов, Театральная пл., д. 1

1 – Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian

2 – Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, 1, Theatrical Square, Saratov, 410012, Russian

* адресат для переписки:

E-mail: rusrap@microbe.ru

Тел.: (845) 26 21 31

** адресат для переписки:

E-mail: rector@sgau.ru

Тел.: (8452) 23 32 92

ВВЕДЕНИЕ

При контроле качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) важную роль играют стандартные образцы (СО), вопросы разработки которых весьма актуальны в последние десятилетия в связи с повышением требований к качеству лекарственных препаратов, выпускаемых в Российской Федерации [1]. К высоко-востребованным в российском здравоохранении

ИЛП относится иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади (АИГ) производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», применяемый для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей при укусах больными или подозрительными на бешенство животными [2]. Одним из важнейших показателей качества гетерологичного АИГ является специфическая активность, определяемая в реакции биологической нейтрализации (РН) вируса бешенства на белых мышах [3]. Неотъ-

емлемой частью контроля специфической активности препарата является использование стандартного образца специфической активности иммуноглобулина. Отсутствие в настоящее время фармакопейного СО (ранее – отраслевого СО) специфической активности АИГ диктует необходимость наличия на предприятии – производителе лекарственного средства международного стандартного образца (МСО) иммуноглобулина человеческого против бешенства либо стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности, аттестованного против указанного международного стандарта ВОЗ [4]. В связи с тем, что ВОЗ рекомендует использовать первичные международные СО в основном для установления значений аттестуемых характеристик вторичных стандартных образцов, а не для рутинного лабораторного контроля, требующего большого количества референтного материала [5], исследования по разработке стандартного образца предприятия специфической активности АИГ являются актуальными.

Согласно классификации стандартных образцов, приведенной в статье Р.А. Волковой и соавторов [6], стандартным образцом предприятия или рабочим стандартным образцом является стандартный образец, утвержденный руководителем предприятия в установленном порядке и применяемый в соответствии с нормативными документами предприятия. СОП активности антирабического иммуноглобулина, аттестованный против международного стандарта ВОЗ, предназначен для определения специфической активности гетерологичного АИГ в реакции биологической нейтрализации на белых мышах при проведении выпускающего контроля качества препарата коммерческих серий.

Целью настоящей работы явились разработка и оценка метрологических характеристик СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили образцы кандидата в СОП специфической активности АИГ. Кандидат для изготовления рабочего стандарта представлял собой специфический иммуноглобулин, полученный из сыворотки крови лошади, иммунизированной рабическим антигеном на основе фиксированного вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253». Для осаждения гамма-глобулина иммунную сыворотку фракционировали риванол-спиртовым методом в соответствии с промышленным регламентом на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций. Физико-химические и биологические показатели кандидата в СОП специфической активности АИГ

отвечали требованиям фармакопейной статьи предприятия ФСР Р N002639/01-250210 на антирабический иммуноглобулин. Аттестацию СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина проводили в соответствии с ФСР Р N002639/01-250210, раздел «Специфическая активность». Специфическую активность СОП определяли в РН фиксированного вируса бешенства на белых мышах одновременно с определением активности международного образца специфической активности иммуноглобулина против бешенства. В качестве образцов сравнения использовали первый международный стандартный образец антирабического иммуноглобулина: WHO, 1st International Standard for rabies immunoglobulin (WHO International laboratory of Biological standards, Институт сывороток, Копенгаген, Дания) с активностью 59 МЕ в ампуле; второй международный стандартный образец иммуноглобулина человеческого против бешенства: WHO, 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human [Национальный институт биологической стандартизации и контроля (NIBSC), Великобритания, NIBSC-код: RAI] с активностью 30 МЕ в ампуле. Анализ результатов и расчет титра иммуноглобулина проводили по методу Reed и Muench [7]. Активность препарата СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического, выраженную в международных единицах (МЕ), рассчитывали по формуле:

$$Y = \frac{A}{B} \times n,$$

где Y – активность СОП (в МЕ); A – обратная величина титра СОП; B – обратная величина титра международного стандарта; n – активность международного стандарта (в МЕ).

Для постановки биологической РН вируса бешенства при определении активности СОП были использованы белые мыши (*Mus musculus*) обоего пола линии BALB/c массой 11 ± 1 г (питомник ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), прошедшие контроль генетической стандартности лабораторных животных инбредных линий. Экспериментальные животные содержались в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [8], и приказом № 199н от 01 апреля 2016 г. «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» [9].

Для изготовления СОП очищенный и стерильный раствор иммуноглобулина разливали по 1 мл в ампулы объемом 2 мл (SCHOTT, Германия) при получении СОП в жидкой форме либо по 1 мл во флаконы объемом 3 мл (SCHOTT, Германия) для последующей лиофилизации при изготовлении СОП в форме лиофилизата. Для получения СОП активности АИГ в форме лиофилизата применяли метод лиофильного



Сублимационная установка EPSILON 2-6D (Martin Christ)

высушивания с использованием современной сублимационной установки EPSILON 2-6D (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) производительностью до 6 кг/24 ч и температурой конденсатора $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$. В качестве стабилизатора был использован глицин (pure, pharma grade, PanReac AppliChem) в концентрации $2,25\pm 0,25\%$. Определение потери в массе при высушивании (ПМВ) для лиофилизированных образцов СОП осуществляли согласно ОФС «Потеря в массе при высушивании» [10]. Лиофилизаты растворяли в 1 мл воды для инъекций и определяли время растворения.

Определение стерильности СОП АИГ проводили методом прямого посева согласно ФСП Р N002639/01-250210 «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций».

Для оценки истинного значения специфической активности при аттестации СОП активности антирабического иммуноглобулина использовали среднее арифметическое исследуемой выборки в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» и ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [11, 12].

Для установления срока годности оценивали стабильность СОП активности антирабического иммуноглобулина в долгосрочных испытаниях при хранении в условиях, соответствующих требованиям санитарных правил СП 3.3.2.3332-16 [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изготовлении СОП специфической активности были учтены требования нормативной документации на иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади.

Для получения рабочего стандартного образца в форме лиофилизата были отработаны условия лиофильного высушивания жидкого антирабического иммуноглобулина на сублимационной установке Epsilon 2-6D, наиболее подходящей для лиофилизации небольших партий препарата. Экспериментальным путем были отработаны следующие оптимальные параметры лиофильного высушивания АИГ в дозировке 1 мл: температура замораживания с учетом ранее определенной эвтектической температуры [14] – минус $38\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; скорость замораживания – $6,5\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$; продолжительность замораживания $2\pm 1\text{ ч}$; рабочий вакуум – $7\pm 3\text{ Па}$; температура нагрева плиты сублиматора – $30\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; скорость повышения температуры при сублимации – $3,0\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$; продолжительность сублимации – $8\pm 1\text{ ч}$; конечная температура материала при десорбции – $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; продолжительность десорбции – $3\pm 1\text{ ч}$.

Лиофилизат представлял собой хорошо сформированную таблетку белого цвета, показатель потери в массе при высушивании составил $1,09\pm 0,03\%$, обеспечив хорошую растворимость препарата в течение $1,0\pm 0,2\text{ мин}$.

Всего в период с 2010 года по настоящее время было приготовлено и аттестовано 3 серии СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина. Исследования образцов указанных серий по показателю «стерильность», потенциально влияющему на значение и стабильность аттестуемой характеристики, выявили стерильность полученных СОП. Аттестация СОП активности АИГ предусматривала установление аттестуемой характеристики разрабатываемого стандартного образца. Аттестуемой метрологической характеристикой СОП являлась специфическая активность в международных единицах (МЕ) в ампуле/флаконе. Результаты исследований по аттестации образцов СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина относительно международных стандартов ВОЗ представлены в таблице 1.

Как следует из приведенных в таблице 1 данных, аттестуемая характеристика СОП активности антирабического иммуноглобулина серии 32-01-11 имела значение $177,33\pm 13,89\text{ МЕ}/\text{мл}$, для СОП серии 32-02-14 и СОП серии 32-03-15 – соответственно $192,10\pm 13,45$ и $198,67\pm 16,62\text{ МЕ}/\text{мл}$. Данные таблицы свидетельствуют о соответствии полученных характеристик требованиям нормативной документации на антирабический иммуноглобулин, согласно которой специфическая ак-

Таблица 1.

Результаты определения специфической активности кандидатов в СОП активности антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на белых мышах с использованием международных стандартов ВОЗ

Серия СОП	Дата опыта	Титр активности стандарта ВОЗ	Активность стандарта ВОЗ, МЕ/амп.	Титр активности СОП	Активность СОП, МЕ/мл	Аттестованное значение СОП, МЕ/мл ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$)
32-01-11	28.10.10-10.11.10	1:1503	59	1:4391	172	177,33±13,89
				1:5084	200	
				1:4888	176	
	19.11.10-01.12.10	1:1260	59	1:4000	187	
				1:3274	153	
				1:4375	205	
	09.12.10-22.12.10	1:1000	59	1:2828	167	
				1:2639	155	
				1:3076	181	
32-02-14	29.11.13-13.12.13	1:278	30	1:2000	216	192,10±13,45
				1:1741	188	
	13.12.13-27.12.13	1:616	30	1:3563	174	
				1:3364	164	
	17.01.14- 31.01.14	1:590	30	1:3408	173	
				1:3562	181	
				1:4000	203	
	07.02.14-21.02.14	1:500	30	1:3585	215	
				1:3497	210	
1:3281				197		
32-03-15	13.03.15-27.03.15	1:1300	59	1:4000	182	198,67±16,62
				1:4491	200	
				1:4393	199	
	10.04.15-24.04.15	1:1455	59	1:5040	204	
				1:4709	191	
				1:5769	234	
	22.05.15-05.06.15	1:2000	59	1:5270	156	
				1:7199	212	
				1:7126	210	

тивность препарата должна иметь значение не менее 150 МЕ/мл.

Стабильность СОП по показателю «специфическая активность» в процессе хранения подтверждена в долгосрочных испытаниях в течение предполагаемого срока годности (2 года) с использованием образцов СОП серии 32-01-11 (таблица 2). Определение специфической активности СОП проводили на момент получения и через 2 года 1 месяц хранения. Как следует из данных таблицы 2, значение специфической активности СОП на момент получения составляло 177,33±13,89 МЕ/мл. После хранения СОП в течение

2-х лет и 1 месяца величина аттестуемого показателя СОП по результатам трех последовательных тестов составила 173, 185 и 175 МЕ/мл, что доказывает стабильность СОП активности антирабического иммуноглобулина по показателю «специфическая активность» в процессе хранения в течение срока годности (2 года).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследований разработан СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина, аттестованный с применением

Таблица 2.

Исследование стабильности СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина в долгосрочных испытаниях

Серия СОП	Дата выпуска	Срок годности	Дата опыта	Активность СОП, МЕ/мл	Титр СОП/титр международного стандарта
32-01-11	02.2011	02.2013	28.10.10-22.12.10	177,33±13,89	1:4391/1:1503
					1:5084/1:1503
					1:4888/1:1503
					1:4000/1:1260
					1:3274/1:1260
					1:4375/1:1260
					1:2828/1:1000
					1:2639/1:1000
					1:3076/1:1000
			01.03.13-15.03.13	177,67±4,55	1:2884/1:500
					1:3078/1:500
					1:2924/1:500

международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства. СОП предназначен для оценки специфической активности антирабического иммуноглобулина коммерческих серий. В долгосрочных испытаниях установлен срок годности рабочего стандартного образца – 2 года. СОП активности АИГ утвержден ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора и внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях и в отделе биологического и технологического контроля. По результатам исследований внесены изменения № 4 в фармакопейную статью предприятия ФСР Р N002639/01–250210 на антирабический иммуноглобулин от 09.02.2016 г.

ЛИТЕРАТУРА

- А.Н. Миронов, А.А. Мовсесянц, В.П. Бондарев, Н.А. Озерецковский, Л.Ф. Шимчук. Актуальные вопросы по разработке стандартов качества иммунобиологических лекарственных препаратов // Ведомости НЦЭСМП. 2013. № 2. С. 57–59.
- А.А. Мовсесянц, А.Ю. Бутырский, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир, Е.Л. Постнова, А.В. Мухачева. К вопросу о применении гетерологического антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. № 5(84). С. 85–89.
- Laboratory techniques in rabies / Ed. by F.X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. 4th ed. – Geneva: WHO, 1996. 469 p.
- ФС.З.3.1.0038.15. Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. – М.: ФЭМБ, 2015. С. 1126–1137.
- Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards // WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical report series 932. – Geneva, Switzerland: WHO, 2004. P. 73–132.
- Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, В.И. Климов, Е.И. Саканян, Ю.В. Олефир, В.А. Меркулов, А.А. Мовсесянц, В.П. Бондарев, И.В. Борисевич, Д.В. Шведов Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств // Биопрепараты. 2016. Т. 16. № 4. С. 229–237.
- Методы лабораторных исследований по бешенству. 3-е изд. / Под ред. М.М. Каплан, Н. Копровски. – Женева: ВОЗ, 1975. 360 с.
- Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Серии европейских договоров – № 123. URL: <https://rm.coe.int/168007аба8> (дата обращения 29.06.2017).
- Правила надлежащей лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01 апреля 2016 г. URL: http://depr.mos.ru/upload_local/iblock/fd4/fd4ba77acfb4fee7094a6c681e97c02e/prikaz_minzdrava_rossii_ot_1_aprelya_2016_g._n_199n.pdf (дата обращения 28.06.2017).
- ОФС.1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. С. 557–559.
- ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» // Государственная фармакопея СССР. XI издание. Вып. 1. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. С. 199–251.
- ОФС.1.1.0014.15. Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. С. 265–315.
- СП 3.3.2.3332-16. Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов // Санитарно-эпидемиологические правила. – М. 2016. 19 с.
- Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, Н.Г. Манин, Е.Г. Абрамова. Определение эвтектической температуры и исследование тепловых параметров гетерологического антирабического иммуноглобулина методами электропроводности и дифференциальной сканирующей калориметрии // Биотехнология. 2011. № 5. С. 80–84.