

ТЕХНОЛОГІЯ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ФАРМАЦІЯ

УДК 57.088.1+543.061

Т. М. Луценко¹, О. Ю. Галкін², О. Я. Карпенко³, О. М. Дуган²

¹ТОВ “УА “ПРО-ФАРМА”,

²Національний технічний університет України

“Київський політехнічний інститут”,

³Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно активних сполук, фармацевції та біотехнології

ОБГРУНТУВАННЯ ПАРАМЕТРІВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ

© Луценко Т. М., Галкін О. Ю., Карпенко О. Я., Дуган О. М., 2015

Здійснено огляд аналітичних методів, що доцільно використовувати для контролю якості активного фармацевтичного інгредієнта та готових лікарських форм на основі інтерлейкіну-7 людини, отриманого рекомбінантним шляхом. Також проведено огляд можливих шляхів введення та фармацевтичних форм рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини. Перевага надається ін'єкційні лікарські форми, однак не виключається можливість застосування рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини у вигляді інших форм.

Ключові слова: рекомбінантний інтерлейкін-7 людини; стандартизація; активний фармацевтичний інгредієнт; готова лікарська форма; хроматографія; специфічна активність.

In this work, an overview of analytical methods that should be used for quality control of active pharmaceutical ingredients and finished dosage forms based on human interleukin-7 was obtained by recombinant method. Also, a review of possible routes of administration and pharmaceutical forms of recombinant human interleukin-7 was provided. The preference is given to the injectable dosage form, however, it does not preclude the usage of recombinant human interleukin-7 in another forms.

Key words: recombinant human interleukin-7; standardization; active pharmaceutical ingredient; finished dosage form; chromatography; specific activity.

Вступ. У результаті імунологічних досліджень останніх 25 років виявилось, що інтерлейкін-7 (ІЛ-7) є одним з найважливіших регуляторних цитокінів імунної системи. Він є особливим у багатьох відношеннях, оскільки багато типів клітин потребують його присутності майже на всіх стадіях розвитку, а спектр його активності вражає. ІЛ-7 – це імунний цитокін, що відіграє центральну роль в розвитку та гомеостазі Т- і В-лімфоцитів. Сьогодні активно досліджують рекомбінантний ІЛ-7 людини (рІЛ-7) як засіб для відновлення імунної системи людей, які перенесли трансплантацію кісткового мозку, високоактивну антиретровірусну терапію (ВААРТ) та хіміотерапію [1].

З погляду його терапевтичного потенціалу існує значна зацікавленість у розвитку технологій для виробництва біологічно активного поліпептиду ІЛ-7. Існує багато способів отримання біологічно активних протеїнів. Можливий метод виділення ІЛ-7 людини з лімфоїдних органів, але

це дуже дорогий метод, завдяки якому можливо отримувати мікроскопічні кількості протеїну, що не рентабельно для великомасштабного виробництва. Посилаючись на сучасні досягнення молекулярної біології, генетики та біотехнології, оптимальним рішенням при розробці технології отримання людського ІЛ-7 є створення рекомбінантного продуцента для синтезу описаного цитокіну. Переваги отримання та використання рекомбінантного протеїну полягають в можливості синтезу значно більших кількостей цільового білка, достатніх для виробництва готових лікарських форм, його вірусній безпечності та отриманні білка з поліпшеними властивостями.

Мета роботи. З метою забезпечення якості, ефективності та безпечності препаратів, отримуваних біотехнологічним шляхом, постає питання стандартизації методів контролю їх якості. Особливістю стандартизації препаратів біотехнологічного походження є те, що кожен рекомбінантний препарат індивідуальний, тому потребує особистого підходу в розробленні методів контролю якості. Стандартизація методів контролю якості препаратів на основі рІЛ-7 ускладнюється ще й тим, що в Україні та і в усьому світі ще відсутні стандарти рІЛ-7. Враховуючи все вище сказане, метою даної роботи було обґрунтування аналітичних та технологічних аспектів стандартизації препаратів на основі рІЛ-7.

Принципи аналітичної стандартизації препаратів на основі рІЛ-7. Рекомбінантні білки, що плануються до застосування із лікувальною метою, мають відповідати специфічним вимогам, що відрізняє їх від тих білків, що використовуються винятково у науково-дослідних роботах. Характеристика отриманих за допомогою рекомбінантних технологій білків повинна містити визначення їх фізико-хімічних властивостей, біологічної активності, імунохімічних властивостей, чистоти та наявності домішок за допомогою відповідних сучасних методів, та є необхідною умовою для розроблення повних і відповідних специфікацій.

Розробляти специфікацію та методи контролю якості необхідно за вимогами таких нормативних документів: Державна фармакопея України, Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.2:2004. – Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності та Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.3:2013 Лікарські засоби. Специфікації: методи випробувань та критерії прийнятності для біотехнологічних/біологічних продуктів (ICH Q6B) [2].

Детально визначати характеристики рекомбінантних препаратів зазвичай необхідно на етапах фармрозробки та, у разі необхідності, під час значних змін у виробничому процесі. Під час розроблення лікарського препарату необхідною умовою є порівняння з відповідним стандартним препаратом, якщо такий існує, та з природнім аналогом, якщо це можливо та доцільно. Для власного використання для рутинного аналізу доцільно розробляти належним чином охарактеризовані власні стандартні матеріали, які використовуватимуться для біологічного та фізико-хімічного випробування виробничих серій. До переліку обов'язкових методів для контролю рекомбінантних білків доцільно ввести випробування, специфічні для конкретного білка з обґрунтуванням припустимого діапазону для критеріїв прийнятності [3].

Специфікації для активної речовини та лікарського препарату є одним з елементів загальної стратегії контролю, яка включає контроль вхідних матеріалів та допоміжних речовин, контроль у процесі виробництва, валідацію процесів, дотримання вимог GMP, випробування стабільності і контроль однорідності серій. Тільки при застосуванні всіх цих елементів може бути гарантована належна якість активної речовини/лікарського препарату.

Певні випробування, що проводяться у ході виробничого процесу, можуть бути достатніми для підтвердження відповідності вимогам специфікації, якщо такі випробування включені до специфікації та якщо критерії прийнятності ідентичні вимогам, встановленим у специфікації на активну речовину або лікарський препарат.

Підходи до розроблення специфікації на активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) та готові лікарські форми (ГЛФ), що містять зазначений АФІ, дещо відрізняються. Деякі показники якості не є обов'язковими та доцільними для ГЛФ, особливо якщо цей показник застосовують для контролю

АФІ, що входить до ГЛЗ. Далі наведемо перелік необхідних показників якості рекомбінантних білків та проаналізуємо доцільність застосування кожного з показників у випадку АФІ та ГЛЗ.

Опис. Чітко вказують фізичний стан (наприклад, твердий, рідкий) та колір активної речовини та колір білкової субстанції. Цей показник є актуальним як у випадку АФІ, так і ГЛЗ. У нашому випадку субстанцію рЛЛІ-7 отримують в водному розчині, що має вигляд прозорої безбарвної рідини, без механічних включень, видимих неозброєним оком. Що стосується ГЛЗ, то все залежить від фармацевтичної форми, в якій випускається препарат.

Ідентифікація. Ідентифікаційні випробування мають бути специфічними та ґрунтуватися на унікальних аспектах молекулярної структури та/або інших специфічних властивостях білка. Ідентифікаційні випробування можуть містити більш ніж одну складову (фізико-хімічні, біологічні та/або імунохімічні). Очевидно, що ідентифікація цільового білка є безальтернативним тестом як для АФІ, так і для ГЛФ [2].

Одним із найпростіших підходів до ідентифікації рекомбінантного білка є визначення його молекулярної маси. Молекулярну масу (або розмір) можливо визначати, використовуючи методи ексклюзивної хроматографії (ДФУ 1.2. 2.2.30), електрофорезу в поліакриламідному гелі за відновлювальних або невідновлювальних умов (ДФУ 1.1., 2.2.31), мас-спектрометрії (ДФУ 1.2., 2.2.43) та інших відповідних методів аналізу [4].

Інший можливий метод ідентифікації – визначення ізоформного складу за методом ізоелектричного фокусування (ДФУ 1.4., 2.2.54) або іншими відповідними методами [5].

Коефіцієнт екстинкції (або молярної абсорбції) також можна використати для встановлення автентичності білкового продукту. У більшості випадків бажано визначати коефіцієнт екстинкції (або молярної абсорбції) для цільового продукту за певної довжини хвиль в ультрафіолетовій чи видимій областях (наприклад, 280 нм). Коефіцієнт екстинкції визначають методом відповідної спектрофотометрії (ДФУ 1.2., 2.2.25) за розчином продукту з відомим вмістом протеїну, що визначений такими методами аналізу, як аналіз амінокислотного складу або визначення азоту тощо [6].

Електрофоретичний профіль є одним із найпоширеніших методів ідентифікаційної характеристики рекомбінантних білків будь-якого призначення. Електрофоретичний профіль та дані щодо однорідності та чистоти можна отримати за допомогою таких методів, як електрофорез у поліакриламідному гелі (ДФУ 1.1., 2.2.31), ізоелектричне фокусування (ДФУ 1.4., 2.2.54), електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДФУ 1.1., 2.2.31), імуноблоттінг, капілярний електрофорез (ДФУ 1.1., 2.2.31) [5, 7].

Хроматографічний профіль є одним із найспецифічніших методів ідентифікації. Хроматографічний профіль та дані щодо ідентичності, однорідності і чистоти можна встановити з використанням таких методів, як ексклюзивна хроматографія (ДФУ 1.2., 2.2.30), зворотно-фазна рідинна хроматографія (ДФУ 1.2., 2.2.29), іонообмінна рідинна хроматографія (ДФУ 1.2., 2.2.29), афінна хроматографія тощо [8].

Виявлення специфічної активності також можна віднести до ідентифікаційних методів контролю якості рекомбінантних білків як для АФІ, так і для ГЛФ.

Спектральний профіль також специфічний метод ідентифікації, але порівняно з іншими методами застосовується рідше. Ультрафіолетові та видимі спектри поглинання визначають у міру необхідності. Структури вищого порядку продукту за необхідності вивчають з використанням таких методів, як спектрометрія ядерного магнітного резонансу (ДФУ 1.1., 2.2.33), круговий дихроїзм тощо [9].

Для ідентифікації АФІ та ГЛФ на основі рЛЛІ-7 можна використовувати будь-який з перелічених вище методів, але з погляду ефективності та техніко-економічних показників доцільно використовувати такі методи: ексклюзивна хроматографія, електрофорез в поліакриламідному гелі за відновлювальних/невідновлювальних умов та тест на специфічну активність.

Аналіз з використанням методу ексклюзивної хроматографії можна проводити в фосфатному (рН 6,8) чи ацетатному буфері (рН 5,0) з додаванням 0,1 М L-аргініну та 0,1 % твіну-80, використовуючи систему вискоефективної рідинної хроматографії з колонками для ексклюзивної

хроматографії, такими як колонка з гідрофільним силікагелем для рідинної хроматографії із розміром частинок 5 мкм, що придатна для розділення білків з молекулярними масами від 15 000 до 600 000 Да. Детекцію піків проводять моніторингом при довжині хвилі 280 нм. Чистоту рлІЛ-7 розраховують як співвідношення площі виявленого основного піка до загальної площі усіх виявлених піків. Ідентифікацію проводять за часом утримування основного піка, що може дещо відрізнятись залежно від розмірів колонки та умов проведення експерименту. Для колонки довжиною 300 мм та діаметром 7,8 мм G3000SWXL (TosoHaas, Montgomeryville, PA) час утримування основного піку складає $21,7 \pm 0,5$ хв [10].

Електрофоретичний аналіз доцільно проводити в 13 % (вибір концентрації поліакриламідного гелю проводять відносно молекулярної маси білка, який аналізують) ДСН - поліакриламідному гелі з переривчастою буферною системою у відновлювальних (з додаванням β -меркаптоетанолу) та невідновлювальних умовах. Починають електрофорез за таких умов: $U=100 - 125$ В і $I=10$ мА. Коли проби досягають розділювального гелю, збільшують силу струму до 20мА і напругу до 200 В. Одночасно з пробями білка наносять маркери молекулярних мас. Фарбування проводять Кумасі синім (Р-250) або сріблом. У випадку з фарбуванням сріблом метод більш чутливий (виявляються смуги, що містять не менше ніж 10 нг білка), ніж при забарвленні розчином Кумасі синього (виявляються смуги що містять не менше 1 мкг білка). На рис. 1 наведено приклади електрофореграм рлІЛ-7.

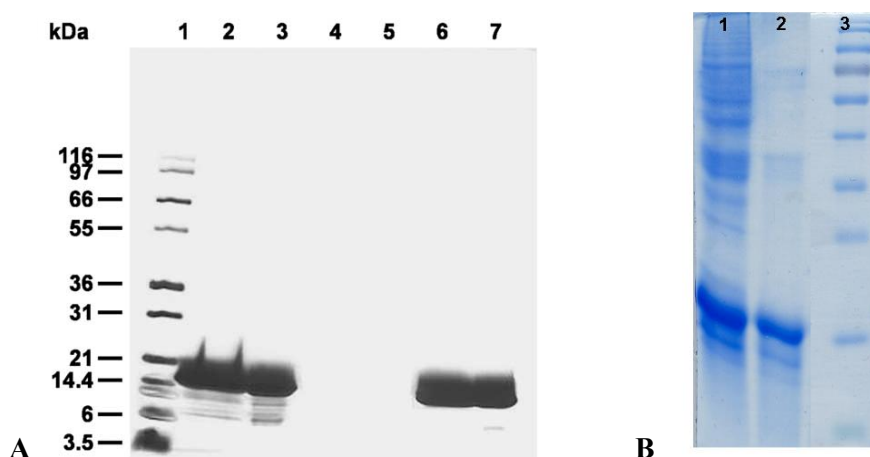


Рис. 1. Електрофореграми рлІЛ-7: А. Отримана з літературних джерел [10]. Фарбування сріблом: доріжка 1: маркери молекулярної маси; доріжка 2: 4 мкг очищеного рлІЛ-7 відновлювальні умови; доріжка 3: 4 мкг рлІЛ-7 стандарту в відновлюваних умовах; смуги 4 і 5: пусто; доріжка 6: 4 мкг очищеного рлІЛ-7 у невідновлювальних умовах; і доріжка 7: 4 мкг рлІЛ-7 стандарту в невідновлювальних умовах. В. Отримана під час проведення власних досліджень. Фарбування розчином Кумасі: доріжка 1: фракція рлІЛ-7 після ренатурації, відновлювальні умови; доріжка 2: очищений рлІЛ-7, відновлювальні умови; доріжка 3: білки маркери молекулярної маси (250, 130, 100, 70, 55, 25, 15 кДа)

Подальший аналіз тестування біологічної активності рлІЛ-7 можна проводити на мононуклеарних лейкоцитах периферичної крові людини або на перевитій мишині пре-В-клітинні лінії 2Е8 (АТСС® ТІВ-239™). Якщо для тестування використовують мононуклеарні клітини (моноцити та лімфоцити), то спочатку необхідно їх виділити, для цього отримують кров здорових донорів середнього віку. Клітини виділяють за стандартною методикою. Після цього фракцію мононуклеарних клітин (моноцити і лімфоцити) необхідно стимулювати фітогемаглютиніном для того, щоб їх активувати. Після активації клітини проліферують та експресують на поверхні рецептор до ІЛ-7, що на наступному етапі дасть змогу визначити активність рлІЛ-7. На наступному етапі клітини інкубують з отриманим рлІЛ-7 у різних концентраціях від 0,25 нг/мл до 10 нг/мл та стандартом рлІЛ-7 в таких самих концентраціях та вимірюють їх проліферацію за допомогою МТТ-тесту. МТТ-тест – це тест на активність клітинної НАДФ залежної оксидоредуктази, яка перетворює 3-(4,5-диметилтіазол-2-ил)-2,5-дифенілтетразол бромід (МТТ) на формазан, який

вимірюється колориметрично. Тому результати МТТ тесту можна використовувати для визначення кількості життєздатних клітин. За отриманими даними будують криву росту культури клітин, для чого по осі абсцис відкладається десятковий логарифм концентрації рЛЛ-7, а по осі ординат – відношення поглинання контрольними зразками до поглинання експериментальних. На рис. 2 зображені криві росту, які побудовані із середніх арифметичних значень трьох експериментів, що були отримані під час проведення власних досліджень. На кожній кривій визначають прямолінійну ділянку, що характеризується експоненційним ростом культивованих клітин у відповідь на дію рЛЛ-7. На цій ділянці вимірюють середню точку, проєкція з якої на вісь абсцис визначає половину ефективної дози (Effective dose, ED50). Перевагою такого методу вимірювання активності є те, що можна уникнути неточності, пов'язаної із індивідуальними особливостями клітин кожного донора та отримати абсолютно достовірні дані.

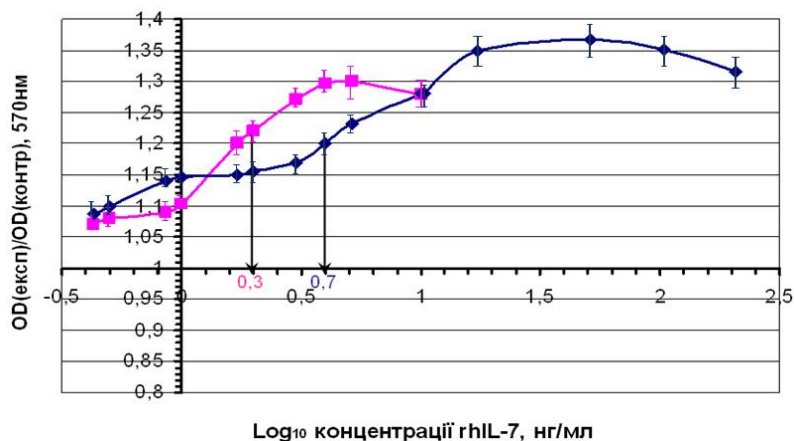


Рис. 2. Проліферація клітин периферичної крові людини за зростаючої концентрації рЛЛ-7. Вісь абсцис – десятковий логарифм концентрації rhIL-7, вісь ординат – відношення оптичної густини клітин, стимульованих rhIL-7 до нестимульованих (OD (експ)/OD (контр)). ($M \pm t$; $n = 3$; $p < 0,05$). Графік, зображений рожевим кольором, відповідає стандарту, синім – досліджуваному зразку. Чорні стрілки – проєкції середніх точок прямолінійних ділянок кривих на вісь абсцис

Значення специфічної активності розраховують за формулою: $1\ 000\ 000/ED50(нг/мл)$ і отримують значення в одиницях на мг білка.

Чистота та домішки. Абсолютну чистоту продукту, отриманого рекомбінантним шляхом, важко визначити, а результати значною мірою залежать від застосованого методу аналізу. Тому чистоту активної речовини, як правило, оцінюють за допомогою набору аналітичних методів. Під час вибору та оптимізації аналітичних методів основною є можливість відокремлення цільового продукту від продукт-зв'язаних речовин та домішок. Домішки, що виявляються у таких продуктах, класифікуються як процес-зв'язані та продукт-зв'язані домішки [2].

Детальніше розглянемо процес-зв'язані домішки та контамінанти. Такого роду домішки утворюються під час виробничого процесу і підрозділяються на три головні категорії: отримані з культури клітин, отримані з субстрату та отримані на подальших стадіях виробництва. Домішки, отримані з культури клітин, містять протеїни, але не обмежуються ними, отримані з організму хазяїна, нуклеїнові кислоти (геном клітин хазяїна, вектор або повна ДНК). Для протеїнів клітин хазяїна, як правило, використовують чутливі методи, наприклад, імуноаналіз, здатний визначати широкий діапазон протеїнових домішок. Під час імуноаналізу поліклональні антитіла, що використовуються у тесті, створюються імунізацією підготовленим клітинним продуктом, виключаючи продукт-кодуючий ген, злиттям (гібридизацією) клітин або іншими придатними клітинними лініями. Рівень ДНК клітин хазяїна можна визначити прямим аналізом продукту (таким, як метод гібридизації). Щоби не встановлювати критерії прийнятності для домішок, отриманих із субстрату клітин, таких як нуклеїнові кислоти та протеїни клітин хазяїна, інколи

можна проводити точні дослідження, що містять пікові експерименти у лабораторних масштабах з метою демонстрації видалення цих домішок [2]. Цей тип домішок достатньо визначати лише в АФІ.

У субстанції рЛЛ-7, отриманій напрацюванням цільового білка за допомогою прокаріотичних клітин *Escherichia coli* в тільцях включень, доцільно визначати такі процес-зв'язані домішки, отримані з організму хазяїна: залишкову ДНК клітини хазяїна *E. coli* або вектора (не повинні перевищувати 10 нг/мг цільового білка) та залишкові білки клітини хазяїна *E. coli* (не повинні перевищувати 10 нг/мг цільового білка). Зазначені аналізи доцільно проводити методом імуноферментного аналізу, для чого зазвичай використовують стандартні комерційні набори, які є в асортименті багатьох біотехнологічних компаній. Ця методика вирізняється високою чутливістю та дає змогу визначати зазначені домішки в кількості від 1 пг на 1 мг цільового білка.

Домішки, отримані зі субстрату, зазвичай містять (але не обмежуються) індуктори, антибіотики, сироватку та інші компонентами живильного середовища.

Домішки, отримані на подальших стадіях виробництва, містять (але не обмежуються) ферменти, хімічні та біохімічні реагенти, неорганічні солі, розчинники, носії, ліганди та інші вилужувані речовини (наприклад, у випадку рЛЛ-7, аналізуючи етапи технологічного процесу отримання білка з тілець включень *E. coli*, такими домішками можуть бути гуанідин, 1,4-дитіотриетол, окиснювачі та відновлювачі).

Детальніше розглянемо інший тип домішок – це продукт-зв'язані домішки, зокрема продукти розпаду. Продукти розпаду, що утворюються у значних кількостях під час виробництва та/або зберігання, необхідно перевіряти та контролювати на відповідність встановленим критеріям прийнятності. Такого роду домішки можуть являти собою усічені форми, інші модифіковані форми, а також агреганти. Аналізувати цей тип домішок доцільно не тільки в АФІ, а і в ГЛФ, оскільки вони можуть виникнути в процесах зберігання АФІ та виробництва ГЛФ.

Усічені форми можуть утворюватися завдяки дії гідролітичних ферментів або хімічних речовин, що каналізують розщеплення пептидних зв'язків. Їх можна виявляти за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ДФУ 1.2., 2.2.29) або електрофорезу у поліакриламідному гелі із додецилсульфатом натрію (ДФУ 1.1, 2.2.31). Залежно від властивостей молекулярних варіантів можна застосовувати пептидне картування (ДФУ 1.4., 2.2.55) [4].

До інших модифікованих форм належать деамідовані, ізомеризовані, зі неспряженим S-S-зв'язком (містком), окиснені або перетворені кон'юговані форми (наприклад, глікозилувані, фосфорилувані), які можна виявити та охарактеризувати за допомогою методів хроматографії (ДФУ 1.2., 2.2.29), електрофорезу (ДФУ 1.1, 2.2.31) [4].

Агреганти являють собою димери та складніші структури цільового продукту. Вони, як правило, утворюються з цільового продукту та продукт-зв'язаних речовин та кількісно визначаються за допомогою відповідних аналітичних методів (наприклад, ексклюзивної хроматографії (ДФУ 1.2., 2.2.30), капілярного електрофорезу (ДФУ 1.1, 2.2.31)) тощо [4].

Для контролю вмісту домішок в субстанції та ГЛФ рЛЛ-7 можна використовувати всі вищезазначені методи, але згідно із літературними даними доцільніше використовувати такі методи: електрофорез у поліакриламідному гелі (визначення домішок із молекулярною масою, відмінною від молекулярної маси рЛЛ-7), ексклюзивна хроматографія (визначення димерів, олігомерів та агрегованих форм), обернено-фазова рідинна хроматографія (чистота). Методи електрофоретичного аналізу та ексклюзивної хроматографії ми уже описували раніше, тож розглянемо детальніше використання методу обернено-фазової рідинної хроматографії (ДФУ 1.2., 2.2.29) для контролю чистоти. Для проведення цього аналізу використовують систему високоефективної рідинної хроматографії з аналітичною колонкою, заповненою октадецилсилільним силікагелем з частинками розміром 5 мкм та розміром пор 30 нм, довжина колонки 150 мм, діаметр – 3,9 мм. Спочатку на колонку наносять пробу білка в 50 мМ ацетатному буфері з додаванням L-аргініну та твіну-80, після чого проводять процедуру елюювання білка з колонки лінійним градієнтом від 90 % мобільної фази А (0,1 % розчин трифтороцтової кислоти в воді) до 70 % мобільної фази Б (0,1 % трифтороцтової кислоти, 99,9 % ацетонітрилу). Розділення проводять при кімнатній температурі, швидкість потоку 1 мл/хв протягом 30 хвилин, детекція при

довжині хвилі 210 нм. Хроматограму аналізують та визначають площу усіх піків та суму площ усіх піків, крім основного. Сума площ усіх піків, крім основного, не повинна перевищувати 5,0 % суми площ усіх піків.

Ступінь активності є важливою характеристикою рекомбінантних продуктів. Відповідні валідовані методи вимірювання ступеня активності повинні бути складовою специфікації якості. Для оцінювання активності рекомбінантного білка можливо використовувати різні методи аналізу (біохімічні, імунохімічні, біологічні тощо), вибір яких зумовлюється специфікою самого білка [2]. Метод оцінки ступеня активності рІЛ-7 було розглянуто вище під час описання ідентифікаційних методів. Оцінку ступеня активності доцільно вносити до специфікацій як на АФІ так і на ГЛФ.

Кількісний вміст активної речовини зазвичай передбачає визначення вмісту протеїну (маси) має бути визначений за допомогою відповідного методу. Для кількісного визначення можна застосовувати спектрофотометричний метод (ДФУ 1.2., 2.2.25) або високоефективну рідинну хроматографію (ДФУ 1.2., 2.2.29) [4, 8]. Оцінювати кількісний вміст доцільно під час контролю якості АФІ, а також контролю ГЛФ. Методи рідинної хроматографії було розглянуто раніше, тому розглянемо спектрофотометричні методи з погляду можливості їх застосування для контролю кількісного вмісту рІЛ-7. Можливо провести пряме спектрофотометричне вимірювання розчину рІЛ-7, використовуючи як компенсаційний розчин буферний розчин, що входить до складу АФІ чи ГЛФ. При вимірюванні враховують коефіцієнт молекулярної екстинції, що для рІЛ-7 складає 2,43 оптичні одиниці за довжини хвилі 280 нм, що відповідають 1 мг білка в 1 мл розчину.

Також можна використовувати непрямі колориметричні методи вимірювання: метод Лоурі, метод Бредфорда (Кумасі), метод біцинхонінічної кислоти (БХК), біуретовий метод або метод дериватизації білка. Ці методи точнішіші, ніж метод прямого спектрофотометричного вимірювання та дають змогу уникнути впливу заважаючих речовин, які також поглинають ультрафіолетове випромінювання за довжини хвилі 280 нм.

Інші показники якості. Розробляючи специфікацію якості на АФІ та ГЛФ на основі рекомбінантного білка, застосовують й типові фармакопейні випробування, зокрема: стерильність (ДФУ 1.4., 2.6.1) або мікробіологічну чистоту (ДФУ 1.4., 2.6.12 та ДФУ 1.4., 2.6.13), бактеріальні ендотоксини (ДФУ 1.4., 2.6.14), аномальну токсичність (ДФУ 1.4., 2.6.9), рН (ДФУ 1.2., 2.2.3), та випробування, що використовують для ГЛФ, залежно від обраної лікарської форми: об'єм вмісту контейнера (ДФУ 1, 2.9.17), механічні включення (ДФУ 1, 2.9.19, та ДФУ 1, 2.9.20, та ДФУ 1, 2.9.21), однорідність дозованих одиниць (ДФУ 1, 2.9.5, та ДФУ 1, 2.9.6) та вміст води для ліофілізованих лікарських препаратів (ДФУ 1, 2.2.32) тощо.

Принципи розроблення складу окремих фармацевтичних форм на основі рІЛ-7.

Оскільки багато біотехнологічних компанії в світі уже довгий час досліджують способи застосування рекомбінантного ІЛ-7 людини, існує безліч публікацій стосовно клінічних випробувань препаратів на основі рекомбінантного ІЛ-7 людини, то одним із основних напрямів подальших досліджень повинно бути створення якісного конкурентоспроможного лікарського засобу та вивчення нових аспектів щодо шляхів його застосування.

Розроблення фармацевтичної форми нового лікарського засобу – дуже важливе завдання, коли потрібно врахувати такі аспекти: передбачуване застосування у клінічних умовах, шлях введення, системи доставки, дози, вивільнення або доставка терапевтично активної частини, а також властивості, що впливають на параметри фармакокінетики, ефективності та безпеки (наприклад, розчинення, аеродинамічні характеристики) відповідно до тієї лікарської форми препарату, що має бути розроблена.

У літературних джерелах зустрічаються різні можливі шляхи введення рІЛ-7 і відповідно різні лікарські форми препарату: ін'єкційні, для інтраназального введення та інгаляцій, для вагінального та ректального введення (супозиторії) та лікарські форми для зовнішнього застосування (мазі, креми, суспензії, емульсії, гелі, трансдермальні пластирі тощо). З усіх зазначених форм перевага надається ін'єкційній ГЛФ у вигляді ліофільно висушеного порошку,

оскільки в такій формі краще забезпечується стабільність, збільшується термін придатності та спрощуються умови зберігання.

Для забезпечення стабільності та збереження біологічної активності до лікарських препаратів на основі рЛЛ-7 додають допоміжні речовини, кожна з яких виконує певну функцію. До допоміжних речовин, що використовуються в технології приготування лікарських засобів, висувають низку вимог. Вони повинні бути біологічно нешкідливими, нетоксичними, хімічно індиферентними відносно речовин, які входять до складу препарату, матеріалів технологічного обладнання, пакувальних матеріалів, до факторів навколишнього середовища в процесі виготовлення препарату і під час зберігання, не повинні викликати алергічних реакцій та надавати лікарській формі необхідних властивостей. Ці речовини повинні проявляти необхідні функціональні властивості за мінімального вмісту в препараті. Повинні сприяти прояву необхідного фармакологічного ефекту, не піддаватися мікробній контамінації, витримувати стерилізацію, не впливати негативно на органолептичні властивості препарату або покращувати їх, бути економічно вигідними.

Для отримання ліофільних ГЛФ на основі рЛЛ-7 використовують такі допоміжні речовини, як: розчинники, наповнювачі, консерванти, регулятори рН, солюбілізатори, стабілізатори, кріопротектори.

Для забезпечення необхідного значення рН ГЛФ на основі рЛЛ-7 використовуються буферні системи: фосфатний буферний розчин, цитратний чи ацетатний. Використання ацетатного буферного розчину для створення ін'єкційної ГЛФ на основі рЛЛ-7 доцільніше з погляду забезпечення стійкості білкової молекули.

Роль формітворюючого наповнювача виконують сполуки, які вводяться до складу ГЛФ, якщо вміст діючої речовини невеликий або речовина, яка ліофілізується, є малорозчинна у воді або водно-спиртовій суміші. Як наповнювачі найчастіше використовуються: високомолекулярні сполуки, полівінілпіролідон (ПВП), декстран-70; вуглеводи – сахароза, лактоза; вуглеводмісні спирти – маніт, сорбіт; трегалоза, гліцин. Залежно від властивостей ці речовини виконують і інші функції: впливають на процес заморожування (наприклад, цукри, полімери, спирти, знижують точку замерзання води і уповільнюють її кристалізацію, змінюють точку евтектики, швидкість сушіння і кінцеву залишкову вологість), тобто виконують роль кріопротектора [11, 12].

Роль солюбілізатора та стабілізатора виконують такі речовини, як твін-80, амінокислоти та білкові речовини, такі як людський альбумін. В складі ін'єкційної ГЛФ на основі рЛЛ-7 ці речовини мінімізують ризик агрегації цільового білка.

Першим технологічним кроком у виробництві ін'єкційних ліофілізованих лікарських препаратів є приготування розчину, що підлягає висушуванню. У зв'язку з цим вивчаються фізико-хімічні властивості діючої речовини (субстанції) та можливі шляхи її деструкції у водному середовищі, підбираються допоміжні компоненти. Іншими дослідниками запропоновано, що допоміжні речовини наступного складу дають змогу досягти добрих результатів щодо забезпечення стабільності рЛЛ-7: 50 мМ калій фосфатний буферний розчин з рН 6,8, або 50 мМ ацетатний буферний розчин з рН 5,0, з додатковим вмістом NaCl в концентрації до 140 мМ, манітол або декстрану-70 в співвідношенні 2/1 – 6/1, твін-80, в концентрації від 0,005 % до 0,1 %, L-аргініну в концентрації 0,1 мМ [13].

Для створення лікарських форм місцевого застосування, ректальних та вагінальних форм до їх складу зазвичай вводять допоміжні речовини в значних кількостях, які й зумовлюють швидкість та повноту вивільнення діючої речовини, характер терапевтичної дії, консистенцію лікарського засобу та структурно-механічні властивості. До складу зазначених форм входять речовини, що виконують роль основи, солюбілізатори, емульгатори, розчинники, консерватори та антисептики, гелеутворювачі, антиоксиданти, регулятори рН, ароматизатори та барвники.

Вміст рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини в готовому препараті повинен бути адаптований так, щоб отримати кількість активного інгредієнта в ГЛФ, яка ефективна для отримання бажаної терапевтичної відповіді на конкретну композицію і спосіб введення. Обраний рівень дозування залежить від бажаного терапевтичного ефекту, шляхів введення, бажаної

тривалості лікування та інших чинників, які визначаються під час проведення доклінічних та клінічних випробувань. Згідно із літературними даними та результатами досліджень дозування рекомбінантного ІЛ-7 людини в готовій лікарській формі можливо від 1 до 60 мкг/кг.

Висновки. З усього вищенаведеного можна зробити висновок, що стандартизація АФІ та ГЛФ на основі рекомбінантних білків потребує індивідуального підходу з врахуванням властивостей конкретної речовини. Для аналітичної стандартизації АФІ та ГЛФ на основі рІЛ-7 доцільно використовувати такі методики, що підтверджуватимуть якість та безпечність отримуваних продуктів: електрофорез в поліакриламідному гелі, ексклюзивна хроматографія, спектрофотометричні методи, специфічна активність, обернено-фазова рідинна хроматографія, імуноферментні аналізи для визначення залишкової ДНК та білків клітини хазяїна. Також доцільним є використання ряду загальних методик, таких як рН, стерильність, аномальна токсичність та бактеріальні ендотоксини.

На основі літературних даних та результатів експериментів проаналізовано окремі фармацевтичні форми, які можна застосовувати для створення ГЛФ на основі рІЛ-7. Перевага надається ін'єкційній лікарській формі у вигляді ліофілізованого порошку, але не виключається можливість застосування рІЛ-7 в вигляді таких лікарських форм, як: для інтраназального введення та інгаляцій, для вагінального та ректального введення (супозиторії) та лікарські форми для зовнішнього застосування (мазі, креми, суспензії, емульсії, гелі, трансдермальні пластирі тощо).

Враховуючи високий терапевтичний потенціал цього цитокіну, важливим напрямом подальших розробок є створення різноманітних фармацевтичних форм на основі рІЛ-7, що забезпечуватимуть доставку рІЛ-7 та збереження його стабільності та біологічної активності.

1. *B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors / A. E. Namen [at al.] // J. Exp. Med. – 1988. – Vol. 167 – P. 988–1002.*
2. *Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.3:2013 Лікарські засоби. Специфікації: методи випробувань та критерії прийнятності для біотехнологічних/біологічних продуктів (ICH Q6B)*
3. *Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.2:2004. – Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності.*
4. *Geng X., Wang L. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs // J. Chromatogr. B. – 2008. – Vol. 866(1-2). – P. 133-153.*
5. *Lopez-Soto-Yarritu P., Diez-Masa J. C., Cifuentes A. et al. Improved capillary isoelectric focusing method for recombinant erythropoietin analysis // J. Chromatogr. A. – 2002. – Vol. 968(1-2). – P. 221-228.*
6. *Zhu D., Qian F., Wu Y. et al. Determination of protein concentration for protein-protein conjugates using ultraviolet absorption // J. Immunol. Methods. – 2013. – Vol. 387(1-2). – P. 317-321.*
7. *Subramaniam S., Frey J., Huang B. et al. Immunoblot assays using recombinant antigens for the detection of Mycoplasma hyopneumoniae antibodies // Vet. Microbiol. – 2000. – Vol. 75(1). – P. 99-106.*
8. *Raymond F., Rolland D., Gauthier M. et al. Purification of a recombinant protein expressed in yeast: optimization of analytical and preparative chromatography // J. Chromatogr. B. – 1998. – Vol. 706(1). – P. 113-121.*
9. *Szyperski T., Güntert P., Stone S. R. et al. Nuclear magnetic resonance solution structure of hirudin (1-51) and comparison with corresponding three-dimensional structures determined using the complete 65-residue hirudin polypeptide chain // J. Mol. Biol. – 1992. – Vol. 228(4). – P. 1193-1205.*
10. *Production and purification of refolded recombinant human IL-7 from inclusion bodies / T. Ouellette [at al.] // Protein Expr. and Purif. – 2003. – V. 30 – P. 156–166.*
11. *Sydney O. Ugwu and Shireesh P. Apte The Effect of Buffers on Protein Conformational Stability– - Pharmaceutical Technology, 2004. – P. 86 – 113.*
12. *S. J. Shire, Z. Sharokh, J. Liu. Challenges in the Development of High Protein Concentration Formulations. – Journal of pharm. Sciences. – V. 93. – № 6, – 2004. – P.1390 – 1402.*
13. *Pat. US7,585,947B2 IL-7 Drug substance, composition, preparation and uses. / Michel Christian Morre; Date of Patent: Sep. 8, 2009.*