

УДК 636:578.824.11:57.083

ПІДБІР КРІОПРОТЕКТОРНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ ГАЛУЗЕВОГО СТАНДАРТНОГО ЗРАЗКУ АНТИРАБІЧНОГО ІМУНОГЛОБУЛІНУ З СИРОВАТКИ КРОВІ КРОЛІВ**МАЗУР Н.В.**, аспірант¹
ПОЛУПАН І.М., к. вет. наук¹
НЕДОСЄКОВ В.В., д. вет. наук²¹Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ,²Національний університет біоресурсів та природокористування України, м. Київ.

Надано результати підбору середовищ для ліофілізації стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну із врахуванням їх кріопротекторних властивостей.

Встановлено, що середовище № 2 є найбільш придатним для ліофілізації антирабічного імуноглобуліну – падіння антирабічної активності після висушування складо 12,8 – 18,4 %, при застосуванні середовищ № 1 і 3 – на рівні 16,2 – 23,2 %, залежно від методу оцінки. Середовища № 4 – 6 володіли недостатніми кріопротекторними властивостями.

Ключові слова: антирабічний імуноглобулін, кріопротекторне середовище, ліофілізація, стандартний зразок.

Вступ. Процес отримання Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну включає наступні етапи: 1) Отримання специфічної до вірусу сказу сироватки крові тварин; 2) Визначення її активності загальноприйнятими методами; 3) Підбір кріопротекторних середовищ для ліофілізації сироватки та відповідного режиму висушування; 4) Калібрування отриманого зразку до імуноглобуліну з відомим титром рабічних антитіл.

Важливим етапом роботи є оптимальний підбір захисних середовищ для ліофільного висушування конкретного біологічного препарату, оскільки цей процес пов'язаний із переходом зв'язаної та вільної вологи речовини із кристалічної форми в газоподібну, минаючи рідку фазу, що можливо лише за певних умов (температура, вакуум), та напряду впливає на його імунологічну активність і можливість довготривалого зберігання [1].

Henderson L.O. at all. [2], Matsuda Y. [3] з'ясували, що ліофільне висушування без введення стабілізуючих компонентів призводить, в результаті, до значної або повної втрати специфічної активності препарату, а ліофілізований матеріал не виглядає як сформована «таблетка» і розсипаний по дні флакону, внаслідок незначного вмісту сумарного сухого залишку.

Відомий спосіб ліофілізації біопрепарату з додаванням захисного середовища із суміші гліцину і манітолу [4]. Обидві речовини легко кристалізуються при заморожуванні їх водних розчинів, тому не доцільно вводити в розчин біопрепарату дві і більше формоутворюючих речовин, оскільки вони уповільнюють кристалізацію одна одної.

Відомо застосування в якості стабілізатора, середовища, що вміщує бичачий сироватковий альбумін, етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), пептони, сахарозу, аскорбінову кислоту, хлористий калій і бактеріостатик [5]. Однак, ці стабілізатори призначені для ліофілізації ін'єкційних препаратів, що містять IgM-антитіла, а також референс-сироваток, що містять IgM-антитіла до вірусних антигенів.

Не дивлячись на те, що значна частина імунодіагностичних препаратів на одному із заключних етапів виробництва піддається ліофільному висушуванню, універсального кріо- та ксеропротекторного середовища для всіх біопрепаратів не існує. Тому, підбір параметрів ліофілізації та оптимального складу захисного середовища здійснюється індивідуально в кожному конкретному випадку.

Мета – оцінка кріопротекторних середовищ для ліофілізації антирабічного імуноглобуліну

з сироватки крові кролів.

Матеріали і методи досліджень. Використовували гіперімунну сироватку крові кролів з активністю в ТФ-ІФА (твердофазному варіанті імуоферментного аналізу) $212 \pm 10,4$ МО/см³ та в РН (реакції нейтралізації) на білих мишах – $185 \pm 9,2$ МО/см³ [6].

Сироватку отримували від кролів чотирьохкратно гіперімунізованих культуральним антигеном вірусу сказу зі штаму Щолково-51 К, концентрованого 6% розчином поліетиленгліколю (ПЕГ) та інактивованого β-пропіолактоном. Імунізацію здійснювали комбіновано: внутрішньошкірно та внутрішньом'язово, паралельно вводячи внутрішньом'язово імуностимулюючий препарат Фоспреніл [7].

Концентрування отриманої антирабічної гіперімунної сироватки проводили шляхом висолювання білків сульфатом амонію. Для цього, до загального пулу сироваток крові додавали насичений розчин сульфату амонію (1:1) і ставили на інкубацію при +4 °С на 24 години. Преципітат центрифугували за 3000 об/хв протягом 20 хв. Осад білків ресуспендували в мінімальному об'ємі ізотонічного розчину натрію хлориду та діалізували проти фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБ). Отриманий концентрований імуноглобулін пропускали через бактеріологічні PVDF-фільтри з діаметром пор 0,45 мкм.

Повторне дослідження активності концентрованого імунобіологічного препарату проводили *in vivo* в РН на білих мишах. Крім цього, для оцінки антирабічної активності препарату застосовували ТФ-ІФА, використовуючи тест-систему для виявлення антитіл до збудника сказу BIO RAD Platelia Rabies Kit II із застосуванням у якості контролю Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини із послідуною побудовою графіка регресійної кривої за показниками оптичної щільності відповідних розведень стандартної сироватки.

В якості стабілізуючих кріопротекторних середовищ для ліофілізації імуноглобуліну використовували сахарозу, глюкозу, гліцин, желатин, гліцерин та крохмаль картопляний в різних варіаціях. Середовища готували на 0,01 М фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБ).

Концентрований антирабічний імуноглобулін розводили ФСБ у 10 разів, далі з'єднували розчин із захисним середовищем у співвідношенні 8:2 і фасували в скляні флакони по 1 см³ в асептичних умовах.

Флакони поміщали в касети, які потім ставили в низькотемпературний холодильник за температури мінус $80 \pm 0,5$ °С на 10–12 годин. Після закінчення терміну заморожування, касети поміщали у вакуумну сушильну установку Alpha 1–4, виробництва фірми MartinChristGmbH (Німеччина) згідно рекомендацій виробника. Швидкість нагрівання на етапі досушування становить 4–6°С/год. Кінцева температура матеріалу 25°С. Загальний час вакуумного зневоднення 20 год.

Якість ліофільно висушених зразків отриманого біопрепарату оцінювали візуально за макроструктурою таблетки. Розчинність та масову частку вологи визначали за загальноприйнятими методиками.

Рабічну активність ліофілізованого зразку визначали відразу після ліофілізації. Для оцінки тривалості зберігання ліофільно висушеного препарату застосовували метод “швидкого старіння” – зберігання в термостаті за температури 37 °С упродовж 4 тижнів.

Результати та їх обговорення. В результаті концентрування антирабічного імуноглобуліну із сироватки крові гіперімунізованих кролів отримали зразок, який був досліджений в РН на білих мишах та методом ТФ-ІФА. Встановлено, що титр рабічних антитіл знаходився на рівні $327,0 \pm 48$ МО/см³ в РН та $391,6 \pm 64$ МО/см³ в ТФ-ІФА.

Для ліофільного висушування отриманий зразок імуноглобуліну розведений 1:10, змішували у співвідношенні 8:2 з підготовленими варіантами кріопротекторних середовищ, приготованих на 0,01М ФСБ:

- 1) Глюкоза + гліцин + желатин;
- 2) сахароза + гліцин + крохмаль картопляний;
- 3) глюкоза + гліцин + крохмаль картопляний;
- 4) сахароза + гліцерин + желатин;
- 5) гліцин + гліцерин + желатин.

Після ліофілізації, в результаті візуального огляду отриманих зразків антирабічного імуноглобуліну, визначили, що незалежно від складу використаних у досліді захисних сере-

Таблиця. Активність ліофілізованих зразків антирабічного імуноглобуліну з різними варіантами захисних середовищ в ТФ-ІФА

№ з/п	Стабілізуюче середовище	Титр антирабічних антитіл				
		до ліофілізації, МО/см ³	після ліофілізації		тест “швидкого старіння”	
			абс., МО/см ³	зниження активності, %	абс., МО/см ³	зниження активності, %
1.	Глюкоза + гліцин + желатин	11,7 в РН, 12,5 в ТФ-ІФА	9,6	17,9-23,2	9,1	5,2
2.	Сахароза + гліцин + желатин		10,2	12,8-18,4	9,9	2,9
3.	Сахароза + гліцин + крохмаль картопляний		9,8	16,2-21,6	9,6	2,0
4.	Глюкоза + гліцин + крохмаль картопляний		8,6	26,5-31,2	н/д	н/д
5.	Сахароза + гліцерин + желатин		8,2	29,9-34,4	н/д	н/д
6.	Гліцин + гліцерин + желатин		8,5	27,4-32,0	н/д	н/д

Примітка: н/д – не досліджували.

довищ в усіх зразках була сформована таблетка (суха речовина із однорідною дрібнозернистою структурою світло-жовтого кольору). Залишкова вологість різних зразків імуноглобуліну була в межах 1,4–3 %, а вміст дослідних зразків повністю відновлювався дистильованою водою менше ніж за 60 секунд.

Далі, з метою оцінки застосованих в якості кріопротекторів середовищ, провели дослідження активності зразків антирабічного імуноглобуліну після ліофілізації в ТФ-ІФА та після витримання зразків за температури 37°C протягом 4 тижнів (тест “швидкого старіння”) (таблиця).

В результаті дослідження встановлено, що середовище № 2 є найбільш придатним для ліофілізації антирабічного імуноглобуліну. Його антирабічна активність після ліофілізації становила 10,2 МО/см³. Тобто падіння активності після висушування склало 12,8–18,4 %. При застосуванні середовищ № 1 і 3 падіння антирабічної активності препарату було на рівні 16,2–23,2 %, залежно від методу оцінки. Недостатніми кріопротекторними властивостями володіли середовища № 4–6. При їхньому використанні зниження специфічної активності антирабічного імуноглобуліну було на 26,5–34,4 %.

Для прискореного аналізу стабільності активності ліофілізованих проб № 1–3 антирабічної сироватки нами застосовано тест “швидкого старіння”. У результаті антирабічна активність зразка № 1 знизилась на 0,5 МО/см³ і становила 9,1 МО/см³. Активність зразка № 3 була на рівні 9,6 МО/см³, а зразка № 2–9,9 МО/см³, тобто рівень зниження активності був 2,0 і 2,9 % відповідно.

Висновки.

1. Середовище № 2 є найбільш придатним для ліофілізації антирабічного імуноглобуліну. Його антирабічна активність після ліофілізації становила 10,2 МО/см³. Тобто падіння активності після висушування склало 12,8–18,4 %.

2. При застосуванні середовищ № 1 і 3 падіння антирабічної активності препарату було на рівні 16,2–23,2 %, залежно від методу оцінки.

3. Середовища № 4–6 володіли недостатніми кріопротекторними властивостями.

Перспективи подальших досліджень. Калібрування отриманого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну відносно Міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини (30 МО/см³) в реакціях віруснейтралізації *in vivo* та *in vitro*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Усовершенствование процесса лиофильного высушивания иммунобиологических препаратов на современном оборудовании / [В. Г. Пушкарь, И. В. Новицкая, М. Я. Кулаков та ін.]. // Вестник ВолгГМУ. – 2011. – №4. – С. 65–68.
2. Preparation of lyophilized human serum based reference materials with graded levels of apolipoproteins A-I and B / L. Henderson, J. Hazlehurst, L. Taylor, W. Hannon. // *Clin. Biochem.* – 1988. – № 21. – P. 219–223.
3. Matsuda Y. Factors affecting the biological activity of lyophilized myofibrils – protective substances and collapse temperatures, in *Fundamentals and applications of freeze-drying to biological materials, drugs and foodstuffs.* / Y. Matsuda // *Proceeding of meeting of Commiss. Ci, Tokyo, May 20–22, 1985*, – Intern. Inst. Refrigeration, 1985, P.103.
4. Chang B. *Cryobiology* / B. Chang, C. Randall. – 1992. – № 29. – С. P. 632.
5. Патент РФ №2136313 Стабилизирующий состав для получения референс-сывороток, содержащих IgM-антитела. – Оpubл. 10.09.1999.
6. Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів / Н. В. Мазур, В. В. Недосєков, С. А. Ничик, І. М. Полупан. // *Ветеринарна біотехнологія.* – 2016. – №28. – С. 158–165.
7. Пат. 110313 у Україні, МПК А61К 39/00. Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові / Недосєков В.В., Полупан І.М., Мазур Н.В., Ничик С.А.; заявл. 24.02.2016, опубл. 10.10.2016, Бюл. №19.

REFERENCES

- Pushkar', V. G., Novickaja, I. V., Kulakov, M. Ja. et al. (2011). Usovershenstvovanie processa liofil'nogo vysushivaniya immunobiologicheskikh preparatov na sovremennom oborudovanii. *Vestnik Volg GMU*, 4, 65–68. [in Russian]
- Henderson, L., Hazlehurst, J., Taylor, L. & Hannon, W. (1988). Preparation of lyophilized human serum based reference materials with graded levels of apolipoproteins A-I and B. *Clin. Biochem*, 21, 219–223.
- Matsuda, Y. (1985). Factors affecting the biological activity of lyophilized myofibrils – protective substances and collapse temperatures, in *Fundamentals and applications of freeze-drying to biological materials, drugs and foodstuffs. Proceeding of meeting of Commiss. Ci, Tokyo, May 20–22, Intern. Inst. Refrigeration, 1985, P.103.*
- Chang, B. & Randall, C. (1992). *Cryobiology*, 29, 632.
- Patent RF №2136313 (1999). Stabilizirujushhij sostav dlja poluchenija referens-syvorotok, soderzhashhiih IgM-antitela. [in Russian]
- Mazur, N. V., Nedosekov, V. V., Nychyk, S. A. & Polupan, I. M. (2016). Rozrobka sposobu otrymannya antyrabichnoyi hiperimunnoyi syrovatky krovi vid kroliv. *Veterynarna biotekhnolohiya*, 28, 158–165. [in Ukrainian]
- Nedosekov, V.V., Polupan, I.M., Mazur, N.V. & Nychyk, S.A. (2016). Pat. 110313 u Ukrainy, МПК А61К 39/00. Sposib oderzhannya antyrabichnoyi hiperimunnoyi syrovatky krovi, *Byul*, 19. [in Ukrainian]

**ПОДБОР КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕД ДЛЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ОТРАСЛЕВОГО
СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С
СЫВОРОТКИ КРОВИ КРОЛЕЙ**

Мазур Н. В.¹, Полупан І. М.¹, Недосєков В. В.²

¹*Институт ветеринарной медицины, г. Киев*

²*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев*

Представлены результаты подбора сред для лиофилизации стандартного образца антирабического иммуноглобулина с учетом их криопротекторными свойств.

Установлено, что среда № 2 является наиболее подходящей для лиофилизации антирабического иммуноглобулина – падение антирабической активности после высушивания составило 12,8–18,4 %, при применении сред № 1 и 3 на уровне 16,2–23,2 % в зависимости от метода оценки. Среды № 4–6 обладали недостаточными криопротекторными свойствами.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, криопротекторная среда, лиофилизация, стандартный образец.

**SELECTION OF CRYOPROTECTIVE MEDIUM FOR FREEZE DRYING OF BRANCH
STANDARD SAMPLE OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN FROM RABBITS
BLOOD SERUM**

N. Mazur¹, I. Polupan¹, V. Nedosekov²

¹*Institute of Veterinary Medicine of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv*

²*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv*

Background. Despite the fact that much of immunodiagnostic biologicals in the one of final stages of produc-

tion should be freeze drying, universal crioprotective medium for all biologicals is not exists. Thus, selection of optimal parameters of lyophilization cycle and protective medium is performed individually in each case.

Objective. Selection of cryoprotective medium for rabies immunoglobulin from rabbits blood serum.

Methods. We used sucrose, glucose, glycine, gelatin, glycerin and potato starch in different variations as stabilizing cryoprotective medium for anti-rabies immunoglobulin lyophilization. Lyophilization was performed using vacuum freeze drying installation Alpha 1–4, manufactured by Martin Christ GmbH (Germany). Anti-rabies activity of lyophilized sample was determined immediately after lyophilization.

To assess the duration of storage lyophilized sample, we used method of “rapid aging” – storage in an incubator at 37°C for 4 weeks.

Results. Established that protect medium number 2 (sucrose, glycine, gelatin) is most appropriate for lyophilization of anti-rabies immunoglobulin branch standard sample – a drop in anti-rabies potency after freeze drying was 12.8–18.4 %, when using mediums number 1 (glucose, glycine, gelatin) and 3 (sucrose, glycine, potato starch) was at 16.2–23.2 %, depending on evaluation method. Mediums number 4–6 had insufficient cryoprotective properties.

For accelerated stability assessment of anti-rabies immunoglobulin lyophilized sample with protective medium number 1–3 we used “rapid aging” test. As a result the sample with protect medium number 1 anti-rabies potency decreased to 0.5 IU/ml and amounted to 9.1 IU/ml. Potency of sample with protect medium number 3 was at 9.6 IU/ml, and the sample number 2–9.9 IU/ml – decrease of anti-rabies potency level was 2.0 and 2.9 % respectively.

Conclusion. Protect mediums number 2 (sucrose, glycine, gelatin) and 3(sucrose, glycine, potato starch) is most appropriate for lyophilization of branch standard sample of anti-rabies immunoglobulin.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, branch standard sample, lyophilization, crioprotective medium.
