

Е. С. Кормщикова, Е. В. Хлыбова, А. В. Дробкова



Оценка возможности применения метода «ускоренного старения» для изучения стабильности концентратов антител человека

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России»

Метод «ускоренного старения» широко используется для сравнительного изучения стабильности действующего вещества в различных вариантах составов и прогнозирования сроков годности разрабатываемых лекарственных средств. Метод основан на предположении, что снижение активности вещества подчиняется законам кинетики химических реакций и зависит от температуры, что позволяет моделировать длительное хранение лекарственного средства выдерживанием при нагревании. «Ускоренное старение» термолабильных составов биологического происхождения по понятным причинам ограничено.

Целью настоящего исследования явилась оценка возможности применения метода «ускоренного старения» с использованием модели Аррениуса к оценке стабильности концентратов антител человека.

Исследуемыми образцами явились стабилизированные глицином либо L-пролином лиофилизаты (варианты 1, 2, 3) и растворы (варианты 4 и 5) концентратов антител к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ). В ходе работы эмпирически определяли константы скорости их инактивации. Для этого образцы выдерживали при температурах 32, 42 и 52 °С; на 14, 37, 64 и 99 сутки проводили оценку активности – содержания специфических антител – методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «ВектоВКЭ-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Приняв, что активность образцов при фиксированной температуре со временем уменьшается по закону мономолекулярной реакции:

$$P = P_0 * e^{-K_T \tau}$$

выражали константу скорости реакции при температуре T как функцию активности:

$$K_T = 2,303 * \frac{\lg P_0 - \lg P}{\tau},$$

где P – активность образца после его хранения при температуре T в течение времени τ , %;

P_0 – исходная активность образца, 100%;

K_T – константа скорости инактивации при температуре T , сутки⁻¹;

τ – длительность хранения образца, сутки.

В выбранной модели «ускоренного старения» зависимость константы скорости инактивации от температуры подчиняется уравнению Аррениуса:

$$\lg K_T = \lg K_0 - \frac{E}{2,303 * R} * \frac{1}{T},$$

где K_0 – некоторая константа, сутки⁻¹;

E – энергия активации реакции, Дж/моль;

T – абсолютная температура, К;

R – газовая постоянная, Дж/моль·К;

и имеет линейный характер. Рассчитав для каждого варианта три константы при трех разных температурах, строили кривые зависимости вида:

$$\lg K_T = f\left(\frac{1}{T}\right),$$

Затем методом наименьших квадратов в среде MS Excel определяли уравнения линий тренда, представленных на рисунке 1.

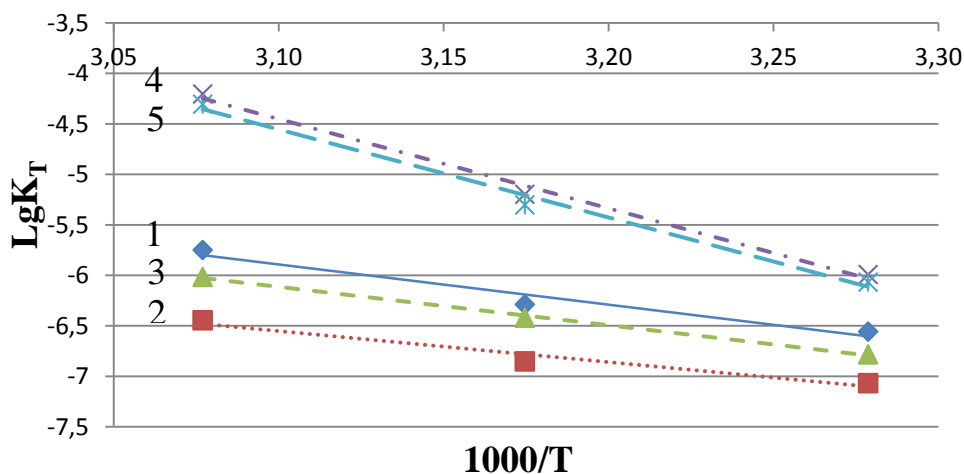


Рисунок 1 – Зависимость логарифма константы инактивации от обратной температуры для лиофилизатов (1-3) и растворов (4, 5) концентратов антител человека к ВКЭ

Полученные зависимости K_T от температуры для вариантов 1-5 имели следующий вид:

$$Y_1 = -3,99x + 6,47;$$

$$Y_2 = -3,07x + 2,98;$$

$$Y_3 = -3,80x + 5,67;$$

$$Y_4 = -8,85x + 22,99;$$

$$Y_5 = -8,73x + 22,49.$$

Коэффициент детерминации при этом варьировал от 0,96 до 0,99, что свидетельствовало об адекватности выбранной модели.

В ходе анализа аррениусовских кривых было выявлено, что углы наклона линий трендов вариантов 1, 2, 3 меньше углов наклона трендов 4 и 5, следовательно, ожидаемое снижение активности в растворах концентратов антител должно быть более выражено. Действительно, медиана потери активности в растворах к концу срока наблюдения составила 49,3%, в то время как в лиофилизатах – 23,3% (потерю активности рассчитывали как отношение разности исходного и текущего содержания антител к ВКЭ к исходному).

Вместе с тем, найденные методом экстраполяции значения константы инактивации при предполагаемой температуре хранения образцов, равной 4°C, составили:

$$K_{T1} = 2,98 \times 10^{-4} \text{ суток}^{-1};$$

$$K_{T2} = 3,61 \times 10^{-4} \text{ суток}^{-1};$$

$$K_{T3} = 3,18 \times 10^{-4} \text{ суток}^{-1};$$

$$K_{T4} = 1,28 \times 10^{-4} \text{ суток}^{-1};$$

$$K_{T5} = 1,23 \times 10^{-4} \text{ суток}^{-1}.$$

То есть, расчетные значения K_T для лиофилизированных образцов оказались выше, чем для растворов, что противоречило наблюдаемому снижению активности.

Выявленное несоответствие можно объяснить тем, что в интервале температур от 4°C до 32°C происходило пересечение линий трендов вариантов 4 и 5 с линиями трендов вариантов 1, 2 и 3, и после точки пересечения константы инактивации при 4°C были ниже, чем аналогичные значения для образцов, подвергавшихся лиофильному высушиванию. Данный факт позволил заключить, что при выборе условий ускоренных испытаний исследуемые образцы должны иметь схожий характер зависимостей логарифма константы инактивации от обратной темпера-

туры, а линии тренда должны отвечать условию «параллельности» (не иметь пересечения в исследуемом диапазоне). В связи с тем, что растворы концентратов менее устойчивы к температурному воздействию, при планировании испытаний «ускоренного старения» для таких образцов целесообразно устанавливать меньшие промежутки контроля активности и снижать срок наблюдения либо осуществлять «ускоренное старение» при более низких температурах.

Таким образом, метод «ускоренного старения» применим для изучения стабильности концентратов антител человека с целью оценки влияния стабилизирующих добавок на однотипные образцы (лиофилизаты либо растворы) при условии параллельности аррениусовских зависимостей и выполнении сформулированных требований к проведению испытаний. Возможность использования метода для прогнозирования сроков годности термолабильных составов биологического происхождения нуждается в дальнейшем изучении.