DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-8-34-40

Е. А. Ломкова[1*], *В. О. Шитикова*[1], *А. А. Цукур*[1, 2], *А. А. Созонова*[1], *А. М. Ряховская*[1]

РАЗРАБОТКА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ И СТАБИЛЬНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ IgG1

[1] ЗАО "Биокад", Санкт-Петербург, Россия.
[2] Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия.
[*] e-mail: lomkova@anchem.pro

Предложена схема разработки состава вспомогательных веществ для жидких лекарственных форм на основе моноклональных антител (МАТ). С использованием предложенной схемы разработан стабильный состав активной фармацевтической субстанции (АФС) и готовой лекарственной формы (ГЛФ) для подкожного введения МАТ IgG1 против фактора некроза опухоли (ФНО) α с концентрацией действующего вещества от 50 до 150 мг/мл.

Ключевые слова: моноклональные антитела; разработка состава; физико-химическая стабильность; динамическое светорассеяние; дизайн эксперимента.

Стабильность лекарственных препаратов на основе моноклональных антител (МАТ) зависит от множества факторов, таких как исходная структура белковой молекулы, состав вспомогательных веществ, лекарственная форма, технология получения активной фармацевтической субстанции (АФС) и готовой лекарственной формы (ГЛФ), материал первичной упаковки и условия хранения. Стабильность белковых молекул является важным показателем при их поиске и фармацевтической разработке [1, 2].

Анализ рисков процесса разработки биологического лекарственного средства отображен на причинно-следственной диаграмме Ишикавы (рис. 1).

Принято выделять 3 типа физико-химической стабильности белков:

коллоидная — постоянство фракционного состава и растворимость;

конформационная — постоянство организации полипептидной цепи в пространстве;

химическая — постоянство химической структуры.

В свою очередь, подходы к исследованию стабильности белков можно классифицировать по трудоемкости и расходу образца на прогнозирование, оценку и подтверждение стабильности. Известен ряд публикаций, описывающий подходы к исследованию стабильности белков [3 – 6], а также применение этих подходов в разработке составов фармацевтических композиций биологических препаратов [2]. Описанные в литературе методы систематизированы по типу стабильности, а также отнесены к различным этапам фармацевтической разработки (рис. 2).

Методы прогнозирования стабильности отличаются непродолжительным временем проведения, низким расходом образца и подходят для быстрого скрининга терапевтических молекул или составов вспомогательных веществ с целью их качественного сравнения. К прогнозированию коллоидной стабильности можно отнести метод ПЭГ-агрегации [7], определение параметра диффузионного взаимодействия (k_D) или второго вириального коэффициента (A_2) [8] и температуры агрегации (T_{ag}) [4, 6, 9], а также *in silico* моделирование четвертичной структуры белка с учетом гидрофобности поверхностных полипептидных участков — spatial aggregation propensity (SAP) [10].

Основным способом прогнозирования конформационной стабильности белков является определение их точки плавления (T_m). Анализ данного показателя основан на постепенном нагревании образца и детектировании процесса денатурации белка методами флуориметрии, дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), микрокалориметрии и др. [3, 6, 8]. Прогнозирование химической стабильности антител возможно с использованием *in silico* инструментов для анализа сайтов потенциальных посттрансляционных модификаций (PTM) в первичной структуре белка, а также поверхностных сайтов PTM в структурах более высокого порядка [11, 12].

Методы оценки стабильности опираются на анализ показателей качества белков до и после стрессирования, например, нагревания, замораживания, шейкирования, УФ-облучения, а также обработки окисляющими веществами, такими как перекись водорода [2].

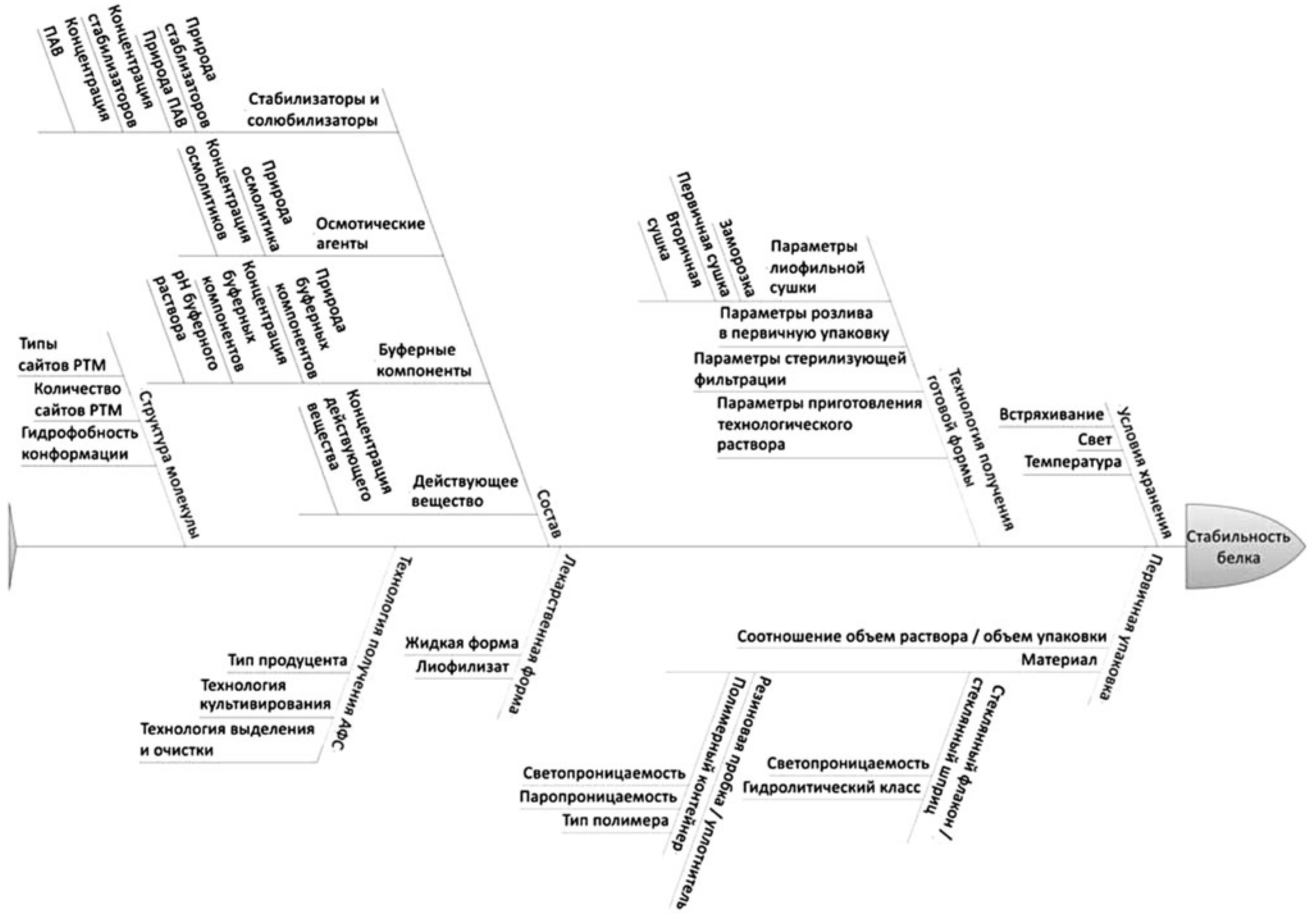

Рис. 1. Причинно-следственная диаграмма (диаграмма Ишикавы) влияния факторов на стабильность лекарственного препарата на основе МАТ. PTM — Post-Translational Modification (посттрансляционная модификация); ПАВ – поверхностно-активное вещество.

Оценивать коллоидную стабильность можно в том числе с применением прямого концентрирования и определения критической растворимости белка в растворе с конкретным составом вспомогательных веществ.

Подтверждение стабильности АФС и ГЛФ проводят при ускоренном и естественном хранении. Для этого продукт выдерживают при заданных температуре и влажности, периодически анализируя показатели качества образцов согласно нормативной документации (НД). Подтверждение стабильности и установление срока годности препарата являются обязательным этапом фармацевтической разработки и регламентируются рядом руководств, таких как ICH и ГФ 14 [1, 13 – 15].

Выбор оптимальных составов фармацевтической композиции и лекарственной формы позволяют улучшить технологические свойства раствора, увеличить срок годности лекарственного средства, а также минимизируют негативное влияние представленных факторов риска (рис. 1) [16, 17]. Настоящая работа систематизирует существующие методы прогнозирования и оценки физико-химической стабильности белков с целью создания комплексного подхода к исследованию стабильности и выбору их состава хранения. В качестве примера практического применения рекомендуемого подхода работа содержит экспериментальные данные разработки фармацевтической композиции МАТ IgG1 против фактора некроза опухоли (ФНО) α.

Экспериментальная часть

Исследование проводили с использованием раствора моноклонального антитела IgG1, произведенного ЗАО “Биокад” (Россия). Растворы вспомогательных веществ готовили с использованием воды очищенной (Milli-Q, EMD Millipore, Германия), натрия ацетата тригидрата, натрия цитрата дигидрата, L-гистидина, L-гистидина гидрохлорида моногидрата, натрия дигидрофосфата моногидрата, натрия гидрофосфата безводного, натрия хлорида (NaCl), трегалозы дигидрата, сахарозы, маннитола, сорбитола, маннозы, глюкозы моногидрата, глицина, L-пролина, этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевой соли дигидрата (Na-ЭДТА), L-метионина, полисорбата 80, полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 (Panreac, Испания), а также полоксамера 188 (EMD Millipore, Германия), карбоксипептидазы B и Sypro Orange (Sigma-Aldrich, США).

Получение IgG1. Исследуемое антитело получали культивированием клеток продуцента яичника китайского хомячка (CHO) с использованием стандартных этапов выделения и очистки: глубинная фильтрация, извлечение на аффинном сорбенте с модифицированным белком А в качестве лиганда, анионная и катион-

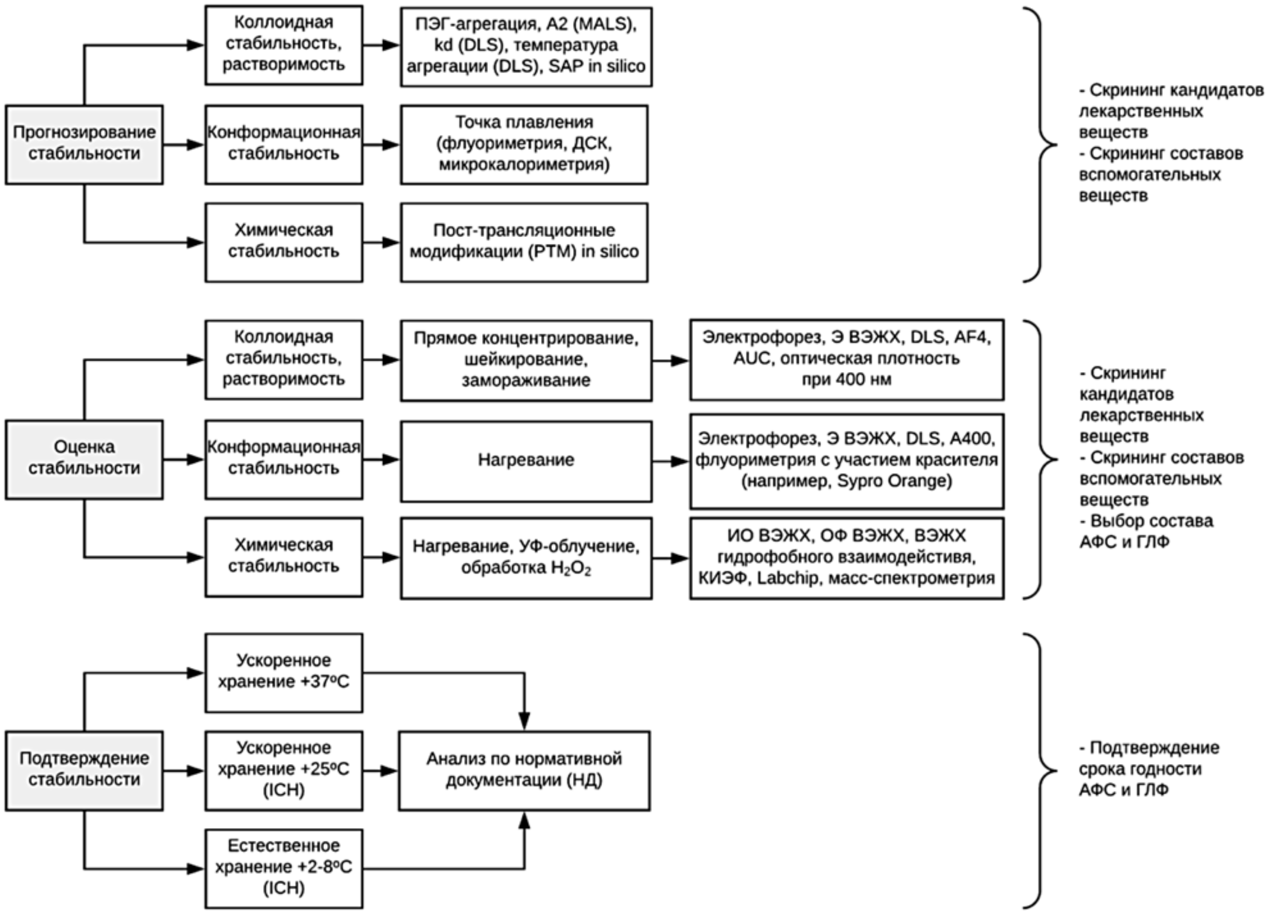

Рис. 2. Методы исследования стабильности белков. MALS — многоугловое статическое светорассеяние, DLS — динамическое светорассеяние, Э ВЭЖХ — эксклюзионная ВЭЖХ, AF4 — фракционирование в асимметричных потоках, *AUC* — аналитическое ультрацентрифугирование, ИО ВЭЖХ — ионообменная ВЭЖХ, ОФ ВЭЖХ — обращенно-фазовая ВЭЖХ, КИЭФ — капиллярное изоэлектрофокусирование.

ная хроматография, а также инактивация оболочечных вирусов методами инкубации в кислом pH и наноразмерной фильтрации. После очистки белок концентрировали и переводили в целевой состав методом тангенциальной фильтрации. Финальной стадией является стерилизующая фильтрация полученной субстанции в одноразовый контейнер [18]. Гомогенность целевого антитела подтверждали методом эксклюзионной (Э) ВЭЖХ (99,2 %).

SAP-анализ проводили согласно методике, описанной в работе [10].

Замену состава раствора IgG1 осуществляли при помощи ультрафильтрации под давлением на ячейках Amicon Stirred Cell (EMD Millipore, Германия).

Определение температуры плавления белка. К исходному образцу белка в концентрации 0,5 мг/мл добавляли флуоресцентный краситель Sypro Orange (конечное разведение красителя в 1000 раз). Показатель температуры плавления определяли на амплификаторе в режиме реального времени CFX96 (Bio-Rad, США). Нагрев проводили от 30 до 95 °C, канал ROX. Для обработки результатов использовали программное обеспечение CFX Manager (Bio-Rad, США).

ПЭГ-агрегация. В УФ-прозрачные 96-луночные планшеты переносили расчетное количество образца, раствора вспомогательных веществ и ПЭГ 6000 так, чтобы в каждой лунке концентрация белка составляла 1 мг/мл, а концентрация ПЭГ 6000 варьировалась от 0 до 18 %. После перемешивания измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 400 нм.

Определение температуры агрегации белка методом DLS. Исследование проводили на автоматизированном планшетном анализаторе динамического светорассеяния Zetasizer APS (Malvern, Великобритания). В качестве аналитической модели выбирали Protein analysis. Образец постепенно нагревали от 40 до 85 °C при постоянном измерении интенсивности рассеянного света в режиме измерения Temperature trend. Строили температурный тренд и определяли точку агрегации белка с помощью программного обеспечения Zetasizer Software.

Определение параметра диффузионного взаимодействия (k_D) методом DLS. Из исходного образца последовательным разведением готовили ряд растворов с концентрацией от 30 до 0,47 мг/мл. Анализ проводили на приборе Zetasizer Nano ZSP. Полученные данные обрабатывали при помощи программного обеспечения прибора. Строили зависимость коэффициента диффузии образца от концентрации, где k_D — это угловой коэффициент прямой.

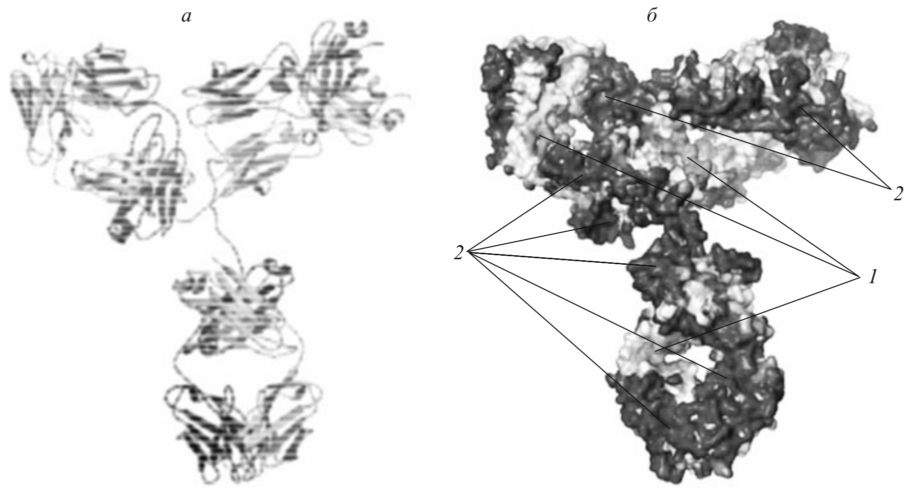

Рис. 3. Четвертичная структура исследуемого IgG1 в виде ленточной модели (*а*) и SAP-модели (*б*), *2* — гидрофильные участки, *1* — гидрофобные участки.

Оценка стабильности IgG1 методами термостресс, шейк-тест и замораживание-размораживание. Исследуемые образцы аликвотировали на 4 части. Одну часть инкубировали при 50 °С, вторую — перемешивали на орбитальном шейкере Multi Reax (Heidolph, Германия) со скоростью 800 об./мин и при температуре 2 – 8 °С, третью — помещали в морозильную камеру и хранили при температуре минус 18 – 22 °С. По истечении указанного времени образцы выдерживали в статичном состоянии при комнатной температуре около 15 мин, перемешивали и передавали на анализ вместе с нестрессированными растворами.

Определение чистоты образцов методом Э ВЭЖХ. Анализ проводили на жидкостном хроматографе (Agilent 1100, США) с УФ-детектором. Подвижная фаза — 85 мМ фосфатный буферный раствор с 17,5 мг/мл натрия хлорида (рН 7,0). Скорость потока 0,7 мл/мин. Колонка Tosoh TSK-Gel G3000SW$_{XL}$ 7,8 мм ID × 30 см (Tosoh Bioscience LLC, Япония).

Определение профиля заряженных форм образцов. Анализ проводили на приборе LabChip GX II (Caliper Life Sciences, США). Приготовление рабочих растворов и подготовку чипа вели в соответствии с методикой производителя с использованием наборов HT Protein Charge Variant Labeling Kit и Protein Charge Variant Buffer Kit. Метод анализа Protein Charge Variant 68s. Абсолютное изменение профиля заряженных форм рассчитывали по формуле:

Δ = |% кислых фракций до стресса –
% кислых фракций после стресса| +
|% щелочных фракций до стресса –
% щелочных фракций после стресса| +
|% доминирующей фракции до стресса –
% доминирующей фракции после стресса|.

Определение чистоты образцов в редуцирующих (ред.) и нередуцирующих (неред.) условиях. Анализ проводили на приборе LabChip GX II (Caliper Life Sciences, США). Приготовление рабочих растворов и подготовку чипа проводили по методике производителя с использованием набора HT Protein Express Reagent Kit. Метод анализа HT Protein Express 200.

Результаты и их обсуждение

Комплексный подход к разработке состава АФС и ГЛФ состоит из прогнозирования физико-химической стабильности действующего вещества, выбора и оптимизации буферного раствора, выбора осмотического агента, выбора и оптимизации концентрации прочих стабилизаторов, а также подтверждения стабильности при ускоренном и естественном хранении финальной фармацевтической композиции.

Достоверное прогнозирование стабильности терапевтической молекулы является залогом эффективной разработки. Перед началом поиска состава фармацевтической композиции рекомендуется оценить значение изоэлектрической точки (pI) молекулы, наличие и природу сайтов PTM в структуре белка, а также гидрофобность его поверхностных полипептидных участков (SAP). Исследуемое антитело IgG1 имеет pI 8,35. На основании анализа PTM в первичной структуре белка обнаружено 2 сайта гликозилирования, 20 сайтов дезамидирования (из них 4 поверхностных), 14 сайтов изомеризации и 10 сайтов окисления (из них 2 поверхностных). SAP-анализ смоделированной четвертичной структуры IgG1 показал, что гидрофобные участки антитела находятся только внутри петель, что должно обеспечивать высокую растворимость исследуемого объекта (рис. 3).

Термостресс белков требуется проводить при температуре как минимум на 10 °С ниже их значений T_m и T_{ag}. Для исследуемого образца в растворе после выделения и очистки значения T_m и T_{ag} составили (62,5 ± 3,2) °С и (68,6 ± 3,9) °С соответственно.

В качестве первого этапа исследования стабильности можно выделить выбор природы буферного раствора. Для этого рассмотрены 4 наиболее распространённых буферных агента в концентрации 5 мМ: ацетатный с рН 5,0 (Acet), фосфатный с рН 6,0 (PB),

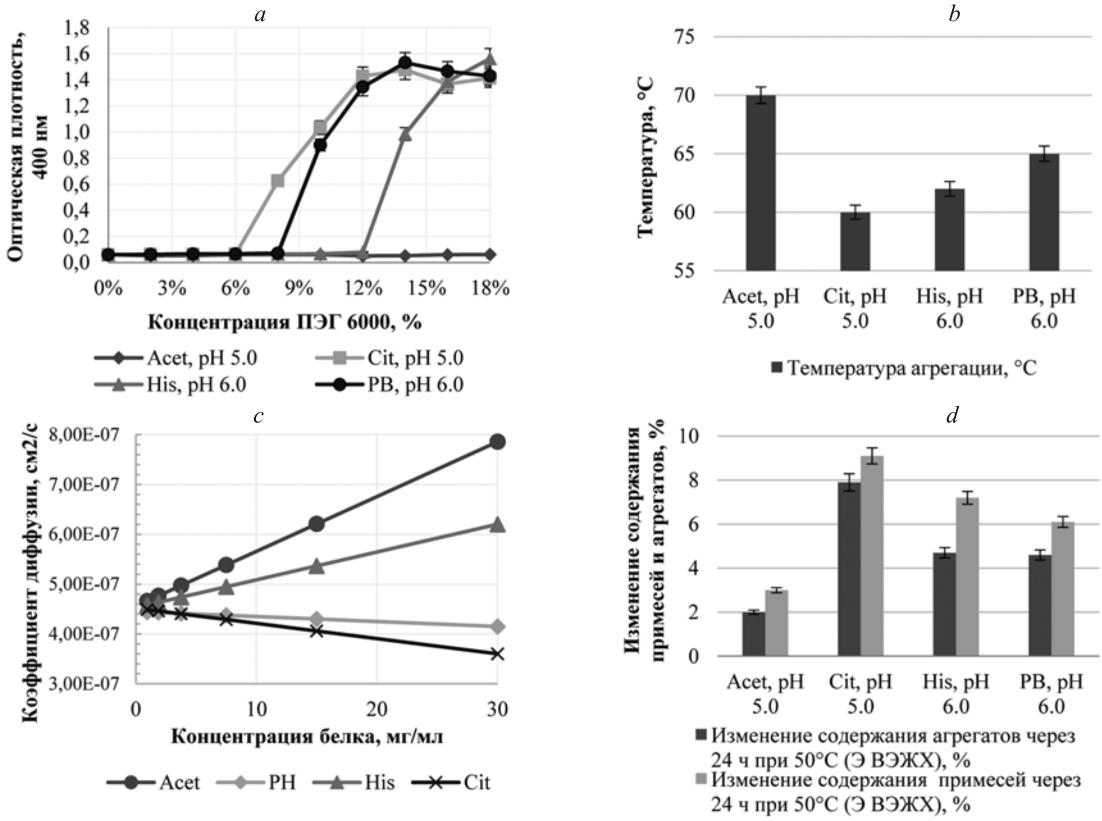

Рис. 4. *a*) Зависимость оптической плотности анализируемых растворов при 400 нм от концентрации ПЭГ 6000; *b*) зависимость коэффициента диффузии от концентрации IgG1; *c*) температура агрегации; *d*) изменение содержания примесей до и после термостресса при 50 °С в течение 24 ч.

гистидиновый с pH 6,0 (His) и цитратный с pH 5,0 (Cit). Для прогнозирования коллоидной стабильности исследуемых образцов были использованы метод ПЭГ-агрегации, определение точки агрегации и диффузионного параметра взаимодействия (k_D) белка методом DLS (рис. 4, *a* – *c*). В качестве метода оценки стабильности IgG1 на первом этапе использовали термостресс при 50 °С в течение 48 ч с последующим анализом на Э ВЭЖХ (рис. 4, *d*).

Среди исследуемых буферных агентов наилучший стабилизирующий эффект оказывает ацетатный буферный раствор с pH 5,0, так как именно в нем наблюдается наименьший прирост примесей после термостресса, самая высокая температура агрегации белка, а также наибольшее значение параметра k_D. В ходе анализа методом ПЭГ-агрегации не наблюдается значительного увеличения оптической плотности в исследуемом диапазоне концентраций ПЭГ, что говорит о высокой коллоидной стабильности исследуемого IgG1.

После выбора природы буферного раствора мы оптимизировали его концентрацию и pH. Для этого с по-

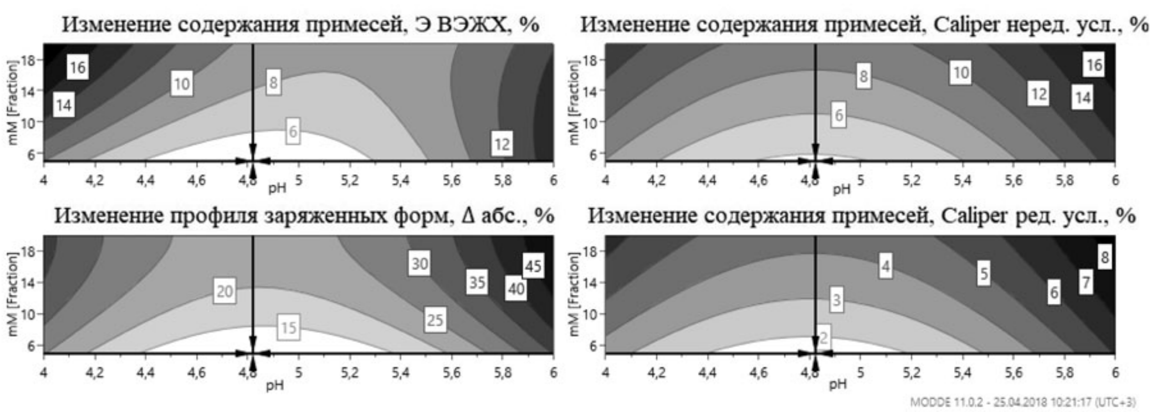

Рис. 5. Поверхности зависимости прироста примесей и абсолютного изменения профиля заряженных форм от pH и концентрации ацетатного буферного раствора после термостресса 50 °С в течение 96 ч. Оптимальная область pH и концентрации ацетатного буферного раствора указана черными стрелками.

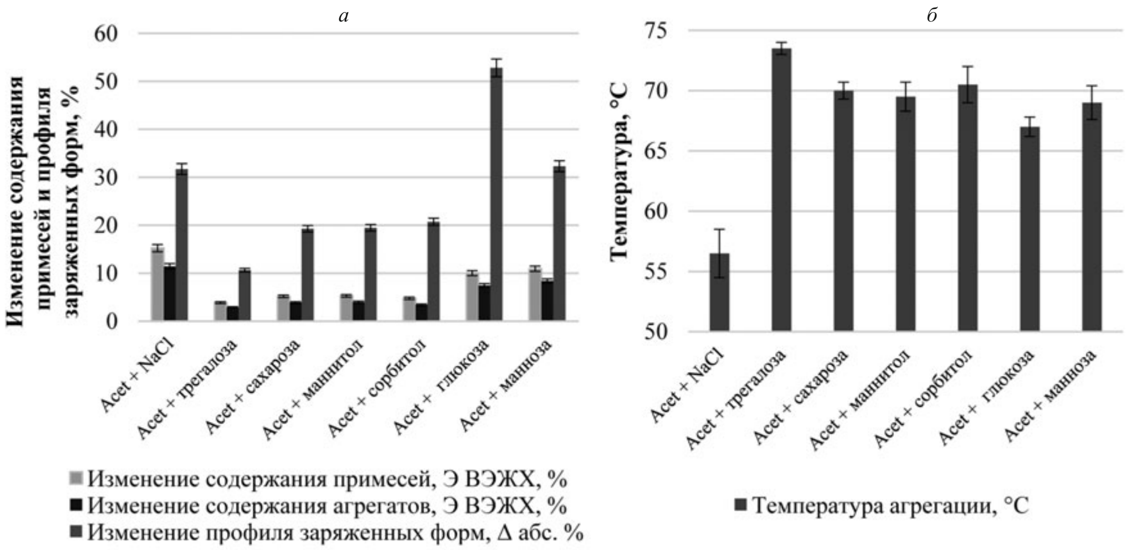

Рис. 6. Изменение чистоты, профиля заряженных форм (*а*) после термостресса при 50 °С в течение 96 ч и температуры агрегации образцов (*б*).

мощью программного обеспечения MODDE 11.0.2 (Unimetrics, Швеция) был составлен дизайн эксперимента (DOE, полный факторный эксперимент типа $2^к$ с центральной точкой). В качестве факторов выбраны концентрации от 5 до 20 мМ и pH от 4,0 до 6,0.

При проведении теста ПЭГ-агрегации с увеличением концентрации ПЭГ оптическая плотность всех исследуемых составов значимо не изменилась. Для оценки стабильности выбраны следующие типы стрессирования: термостресс 50 °С в течение 96 ч, шейкирование при 800 об./мин в течение 96 ч и замораживание. Анализ гомогенности образцов проводили методами Э ВЭЖХ, электрофореза в ред. и неред. условиях, а также определяли абсолютное изменение профиля заряженных форм образцов. Поверхности отклика от pH и концентрации буферного раствора представлены на рис. 5. На основании полученных данных для дальнейшей работы выбран 5 мМ ацетатный буферный раствор с pH (4,8 ± 0,2).

Вторым этапом разработки состава можно выделить выбор осмотического агента, необходимого для обеспечения физиологичности лекарственного препарата для парентерального введения. В настоящий скрининг включены следующие осмолитики: трегалозы дигидрат, сахароза, маннитол, манноза, сорбитол, натрия хлорид и глюкоза в концентрациях, обеспечивающих физиологическую осмоляльность.

При проведении теста ПЭГ-агрегации во всех составах, кроме хлорида натрия, не наблюдалось значительного увеличения оптической плотности растворов белка в присутствии ПЭГ 18 %. В пробе с хлоридом натрия агрегация начиналась при концентрации ПЭГ 10 %. Стабильность образцов оценивали по изменению чистоты и профиля заряженных форм после термостресса 50 °С в течение 96 ч, шейкирования при 800 об./мин в течение 96 ч, а также однократного замораживания. Результаты анализа отображены на рис. 6.

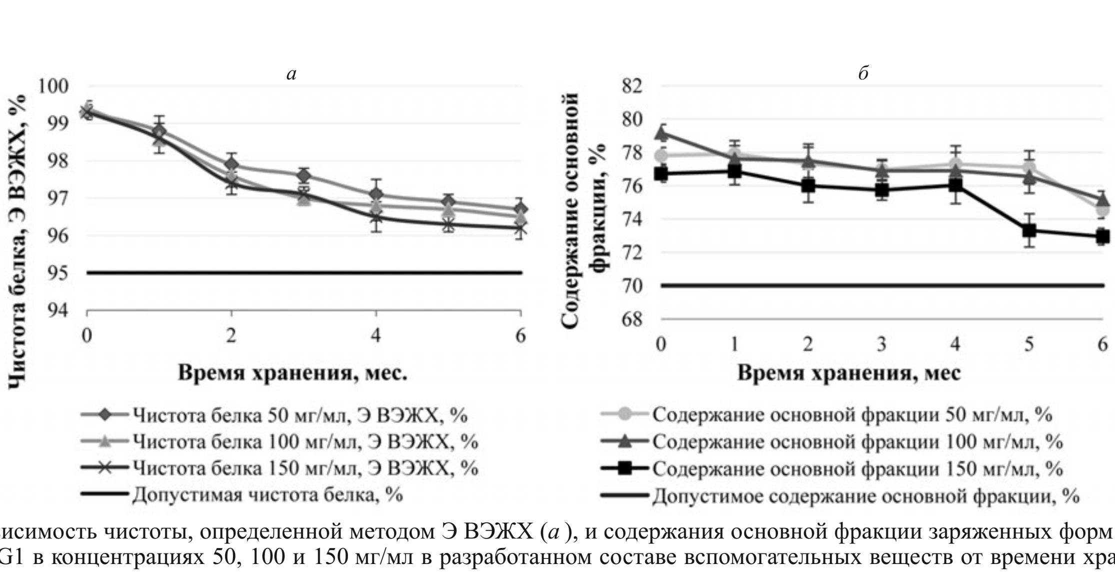

Рис. 7. Зависимость чистоты, определенной методом Э ВЭЖХ (*а*), и содержания основной фракции заряженных форм (*б*) исследуемого IgG1 в концентрациях 50, 100 и 150 мг/мл в разработанном составе вспомогательных веществ от времени хранения при 25 °С.

По итогам исследования в качестве осмотического агента выбран трегалозы дигидрат в концентрации (80 мг/мл), обеспечивающей физиологичную осмоляльность, так как в составе с ним наблюдались наименьшие прирост примесей и изменение кислотно-щелочного профиля, а также наибольшая температура агрегации.

Третьим этапом разработки состава является выбор стабилизаторов и ПАВ. В качестве стабилизаторов в скрининг включены глицин, L-метионин, L-пролин и Na-ЭДТА. В качестве ПАВ использованы полисорбат 80 и полоксамер 188 в различных концентрациях. Растворы моноклонального антитела готовили в составах с 5 мМ ацетатным буферным раствором, трегалозы дигидратом, стабилизатором или их сочетанием. Скрининг проводили аналогично второму этапу (выбор осмотического агента) с применением подхода DOE. В итоге, проанализировав полученные данные, для исследуемого моноклонального антитела IgG1 в концентрациях 50 – 150 мг/мл выбрали оптимальный состав, а именно — 5 мМ ацетатный буферный раствор с pH 4,8; трегалозы дигидрат в концентрации 80 мг/мл; 1,5 мг/мл метионина и 1 мг/мл полисорбата 80.

Высокая стабильность белка в выбранном составе вспомогательных веществ была подтверждена результатами ускоренного хранения образца при температуре 25 °C в течение 6 мес. Графики зависимости чистоты моноклонального антитела, определенной методом Э ВЭЖХ, и содержания основной фракции заряженных форм от времени хранения представлены на рис. 7. Изменение содержания мономера на Э ВЭЖХ и доминирующей фракции профиля заряженных форм, не превышающее норму НД при хранении, указывает на то, что предложенный состав обеспечивает приемлемую стабильность IgG1.

Таким образом, настоящая работа систематизирует существующие подходы к прогнозированию, оценке и подтверждению физико-химической стабильности белков, а также демонстрирует применение части освещенных методов для разработки фармацевтической композиции лекарственного препарата на основе МАТ. На основании результатов ускоренного хранения разработанного состава при 25 °C можно считать предложенный подход эффективным и перспективным для широкого применения в области биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. ICH Q5C, *Fed. Regis.*, **61**, 36466 – 36474 (1996).
2. A. Hawe, M. Wiggenhorn, M. Van de Weert, et al., *J. Pharm. Sci.*, **101**(3), 895 – 913 (2012).
3. V. I. Razinkov, M. J. Treuheit, G. W. Becker, *J. Biomol. Screen*, **20**(4), 468 – 483 (2015).
4. A. Jarasch, H. Koll, J. T. Regula, et al., *J. Pharm. Sci.*, **104**(6), 1885 – 1898 (2015).
5. J. Kang, and X. Lin, J. Penera, *Bioproccess Int.*, **14**(4), 40 – 45 (2016).
6. W. Cheng, S. B. Joshi, F. He, et al., *J. Pharm. Sci.*, **101**(5), 1701 – 1720 (2012).
7. L. Li, A. Kantor, N. Warne, *Protein Sci.*, **22**, 1118 – 1123 (2013).
8. F. He, C. E. Woods, G. W. Becker, et al., *J. Pharm. Sci.*, **100**(12), 5126 – 5141 (2011).
9. J. W. P. Carvalho, F. A. O. Carvalho, P. S. Santiago, M. Tabak, *Eur. Biophys. J.*, **45**(6), 549 – 563 (2016).
10. N. Chennamsetty, V. Voynov, V. Kayser, et al., *PNAS*, **106**(29), 11937 – 11942 (2009).
11. N. Jenkins, L. Murphy, R. Tyther, *Mol. Biotechnol.*, **39**, 113 – 118 (2008).
12. M. Audagnotto, M. D. Peraro, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **15**, 307 – 319 (2017).
13. *Государственная фармакопея РФ*, XIV изд., ОФС. 1.1.0009.18, Минздрав РФ, Москва (2018).
14. ICH Q1A (R2), *Fed. Regis.*, **68**(225), 65717 – 65718 (2003).
15. ICH Q1B, *Fed. Regis.*, **62**(95), 27115 – 27122 (1997).
16. A. Katdare, M. V. Chaudal, *Informa Healthcare*, New York, 291 – 333 (2006).
17. S. Pramanick, D. Singodia, V. Chandel, *Pharma times*, **45**(3), 65 – 77 (2013).
18. H. F. Liu, J. Ma, C. Winter, R. Baye, *mAbs*, **2**(5), 480 – 499 (2010).

Поступила 24.09.18

DEVELOPMENT OF COMPOSITION FOR STABILE LIQUID DOSAGE FORMS BASED ON MONOCLONAL IGG1 ANTIBODIES

E. A. Lomkova[1,2*], V. O. Shitikova[1], A. A. Tsukur[1,2], A. A. Sozonova[1], and A. M. Ryakhovskaya[1]

[1] BIOCAD Biopharmaceutical Company, Strelna, St. Petersburg, 198515 Russia

[2] St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, 197376 Russia

[*] e-mail: lomkova@anchem.pro

A scheme for the development of composition of auxiliary components for liquid dosage forms based on monoclonal antibodies is proposed. Using the proposed scheme, stable formulations of an active pharmaceutical substance (APS) and a finished pharmaceutical product (FPP) for subcutaneous administration of monoclonal IgG1 antibodies to tumor necrosis factor are formulated with an active ingredient concentration from 50 to 150 mg/mL.

Keywords: monoclonal antibodies; composition development; physicochemical stability; dynamic light scattering; design of experiment.