



(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 109 290**⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **G 01 N 33/531, A 61 K**
39/395// (G 01 N 33/535, C 12 Q
1/28)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96106960/13, 09.04.1996
(46) Дата публикации: 20.04.1998
(56) Ссылки: 1. US, патент, 4504579, кл. C 12 Q 1/28, 1986. 2. RU, патент, 2046342, кл. G 01 N 33/535, 1995.

(71) Заявитель:
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"
(72) Изобретатель: Вараксин Н.А.,
Шалаев Е.Ю., Рукавишников М.Ю., Канев А.Н.
(73) Патентообладатель:
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"

(54) СТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ СОСТАВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТА АНТИИММУНОГЛОБУЛИНА G И ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

(57) Реферат:
Изобретение относится к области биотехнологии и иммунологии и может быть использовано для получения стабильных форм иммунобиологических препаратов, сохраняющих свои специфические характеристики в течение длительного времени. Стабилизирующий состав включает гидролизат протеина, сахарозу, фосфатно-солевой буфер, бактериостатик, бычий сывороточный альбумин, ЭДТА (трилон Б) и хлористый калий при следующем соотношении компонентов, мас.% : бычий сывороточный альбумин 0,1 - 3,0; сахараза

1,0 - 10,0; гидролизат протеина 1,0 - 5,0; хлористый калий 2,0 - 8,0; ЭДТА (трилон Б) 0,03 - 0,2; бактериостатик 0,01 - 0,02; фосфатно-солевой буфер остальное. В качестве гидролизата протеина используют пептон или желатин, а в качестве бактериостатика - мертиолят. Стабилизатор обеспечивает сохранение биохимических свойств препарата конъюгата анти-IgG и пероксидазы хрена в процессах лиофильного высушивания, последующего хранения и регидратации при комнатной температуре. 1 з. п. ф-лы, 3 табл.

RU 2 109 290 C1

RU 2 109 290 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 109 290** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) Int. Cl.⁶ **G 01 N 33/531, A 61 K**
39/395//((G 01 N 33/535, C 12 Q
1/28)

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96106960/13, 09.04.1996

(46) Date of publication: 20.04.1998

(71) Applicant:
 Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii
 i biotekhnologii "Vektor"

(72) Inventor: **Varaksin N.A.,**
Shalaev E.Ju., Rukavishnikov M.Ju., Kanev A.N.

(73) Proprietor:
 Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii
 i biotekhnologii "Vektor"

(54) **A STABILIZING COMPOSITION TO OBTAIN LYOPHILIZED PREPARATIONS BASED UPON CONJUGATE OF IMMUNOGLOBULIN G AND HORSE RADISH PEROXIDASE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, immunology, immunobiology. SUBSTANCE: the given stabilizing composition contains protein hydrolysate, saccharose, phosphate-saline buffer, bacteriostatic, bovine serum albumin, EDTA (trilon B) and potassium chloride at the following ratio of components, weight%: bovine serum albumin 0.1-3.0; saccharose 1.0-10.0; protein hydrolysate 1.0-5.0; potassium chloride 2.0-8.0; EDTA (trilon B) 0.03-0.2; bacteriostatic 0.01-0.02; phosphate-saline

buffer - the rest. Peptone and gelatin are used as protein hydrolysate and merthiolate is applied as bacteriostatic. Stabilizer provides the safety of biochemical properties of anti-IgG conjugate preparation and horse radish peroxidase during lyophilic drying, subsequent storage and rehydration at the room temperature. EFFECT: higher efficiency to obtain stable types of immunobiological preparations which keep their specific properties for a long period of time. 2 cl, 3 tbl

RU 2 109 290 C1

RU 2 109 290 C1

Изобретение относится к области биотехнологии и иммунологии и может быть использовано для получения стабильных форм иммунобиологических препаратов, сохраняющих свои специфические характеристики в течение длительного времени.

Известны способы получения стабилизирующих составов конъюгатов на основе белка А и антивидовых иммуноглобулинов [1, 2, 3]. Составы стабилизаторов включают углеводы в виде сахарозы или лактозы, аминокислоты и БСА.

Недостатком данных стабилизирующих составов является то, что они повышают термостабильность препаратов не более, чем на 60% и таким образом не дают возможность сохранять препараты в течение 1 года. При использовании глюкозы или лактозы в качестве углеводного компонента стабилизатора для получения конъюгатов специфическая активность препаратов снижается уже на первой стадии замораживания - оттаивания на 35-40%.

Наиболее близким техническим решением (прототипом) является стабилизирующий состав для получения лиофилизированных препаратов на основе белка А и пероксидазы хрена (КГ БА:ПХ), включающий сахарозу (1,3 - 6%, пептон 4 - 12% и фосфатно-солевой буфер (ФСБ) остальное [4].

Недостатками данного стабилизатора является то, что он хорошо сохраняет препарат КГ БА:ПХ, но не полностью предохраняет конъюгат антииммуноглобулина G и пероксидазы хрена (КГ анти- IgG:ПХ) на стадии лиофильного приготовления, а также не обеспечивает сохранение специфического узнавания иммуноглобулинов после продолжительного хранения сухого препарата при положительных температурах.

Поставлена задача создания стабилизатора такого состава, который обеспечивал бы сохранение биохимических свойств препарата КГ анти-IgG:ПХ в процессах лиофильного высушивания, последующего хранения и регидратации при комнатной температуре.

Поставленная задача решается тем, что стабилизирующий состав для получения лиофилизированных препаратов на основе конъюгата антииммуноглобулина G и пероксидазы хрена, включающий гидролизат протеина, сахарозу, фосфатно-солевой буфер и бактериостатик, согласно изобретению, дополнительно содержит бычий сывороточный альбумин, ЭДТА (трилон Б) и хлористый калий при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Бычий сывороточный альбумин - 0,1-3,0

Сахароза - 1,0-10,0

Гидролизат протеина - 1,0-5,0

Хлористый калий - 2,0-8,0

ЭДТА (трилон Б) - 0,03-0,2

Бактериостатик - 0,01-0,02

Фосфатно-солевой буфер - Остальное

Причем в качестве гидролизата протеина используют пептон или желатин, а в качестве бактериостатика - мертиолят.

Сравнение заявляемого стабилизирующего состава с известными аналогами показывает, что отличительные от прототипа признаки проявляют новое, неизвестное ранее свойство, а именно полное сохранение активности препарата КГ

анти-IgG: ПХ на стадии лиофилизации и увеличение по сравнению с прототипом и другими аналогами срока его хранения при положительных температурах как в сухой форме, так и в регидратированном состоянии, что свидетельствует о состоянии предлагаемого технического решения критерию "изобретательский уровень".

Такое сохранение активности конъюгата, вероятно, обусловлено следующими причинами. Во-первых, гидролизат в отличие от нативного протеина содержит короткие пептиды, которые значительно легче и проще вступают во взаимодействия как с гидрофильными, так и с гидрофобными группами на поверхности конъюгата в отличие от громоздких полимерных исходных молекул протеинов. Во-вторых, введение ЭДТА - в форме его растворимой соли трилона Б - известной своими хелатирующими свойствами, защищает геминную группу пероксидазы хрена от повреждающих взаимодействий с ионами тяжелых металлов. В этих взаимодействиях активные ионы металлов замещаются на пассивные к обмену ионы калия при введении соли KCl.

Пример 1. Технология приготовления стабилизирующего состава для получения лиофилизированных препаратов.

Сначала готовят гидролизат протеина путем высокотемпературного расщепления 10%-ного раствора пептона по ГОСТ 13805-76 [5] или желатина пищевого по ГОСТ 11293-78 [6] (рН = 7,0) при 135°C в течение 3,5 ч. Гидролизованные пептон и желатин характеризуют по аминокислотному составу, вязкости, а фракционный состав характеризуют методами гель-фильтрации и криоскопии.

Компоненты стабилизатора (сахароза, БСА, гидролизат протеина и KCl) растворяют в фосфатно-солевом буфере при нагревании до 40°C при перемешивании до полного исчезновения осадка. Ко всей массе раствора добавляют требуемое количество трилона Б. В качестве бактериостатика используют мертиолят в количестве 0,01%.

Полученный состав фильтруют через стеклянный фильтр, а затем через фильтр "Millipor" с размерами пор 0,45 мкм.

Фильтрат охлаждают в снежной бане и добавляют в него при перемешивании раствор препарата КГ анти-IgG: ПХ, достигая разведения в 500 - 1000 раз в зависимости от титра конъюгата, определяемого в прямой реакции ИФА со стандартными иммуноглобулинами.

Препарат разливают в ламинарном шкафу по 0,2 мл во флаконы объемом 5 мл, закрывают резиновыми пробками и размещают в металлические кассеты для замораживания. Замораживание препарата во флаконах проводят при температуре прилавка - 60°C в течение 10-12 ч.

Замороженный препарат во флаконах переносят в сублимационную камеру лиофильной установки TG-50, полки которой охлаждены до минус 35°C. Температуру препарата на стадии сублимационного обезвоживания поддерживают ниже температуры его стеклования (-30 °C). Средняя скорость нагревания материала на этапе досушивания составляет 6 °C/мин, время выдерживания при 27 °C составляет 10 ч.

Лиофильно высушенный препарат имеет остаточное содержание воды около 1,0 - 2,0 мас.%. Определение проводят по методике [7]. Флаконы с препаратом укупоривают под вакуумом.

Активность конъюгата контролируют на всех этапах приготовления сухой формы: при розливе, замораживании и после лиофилизации. В качестве ИФА тест-системы используют специально отобранные из одной качественной партии комплекты "РекомбиБест анти - ВИЧ 1+2". ИФА выполняют в соответствии с Инструкцией применения указанной тест-системы.

Для обоснования количественного содержания компонентов в стабилизирующем составе приготовлены вышеописанным способом варианты предлагаемого состава (1-6) и состав-прототип (7). Данные приведены в табл. 1.

Пример 2. Исследование сохранения активности конъюгата анти-IgG:ПХ на стадии лиофилизации.

Проведены сравнительные исследования по сохранению активности препарата, содержащего заявляемый стабилизирующий состав с разным количественным содержанием компонентов (составы 1-6) или использующего стабилизатора состав-прототип (состав 7). Данные приведены в табл. 2.

Результаты показывают, что наиболее устойчивыми при замораживании и обезвоживании являются варианты препарата с составами 1 и 2, в одном из которых содержится оптимальное количество гидролизата, а в другом - желатины.

Как следует из результатов табл. 2, все составы обеспечивают сохранение активности конъюгата на стадии лиофильного приготовления и в пределах точности постановки ИФА отличия статистически незначимы.

Пример 3. Исследование активности препарата, содержащего разные варианты стабилизирующих составов, в процессе хранения

Для проверки эффективности действия стабилизаторов при хранении препаратов при положительных температурах закладывают в термостаты 30 флаконов с конъюгатом анти-IgG:ПХ, имеющем различные варианты составов стабилизаторов, и хранят указанные препараты при температуре 4 и 37°C. Результаты приведены в табл. 3. Активность конъюгата анти-IgG:ПХ при хранении определяют в % от сухой формы этого препарата, хранившегося при -20 °C ($\sigma = \pm 5\%$).

Результаты анализа табл. 3 показывают, что при хранении препарата при 4°C в течение 6 мес предлагаемый стабилизирующий состав (N 1 и N 2) имеет более высокие характеристики сохранения препарата, чем состав-прототип. Характеристики становятся статистически значимыми при хранении препарата 2 мес при 37°C. С увеличением времени хранения препарата преимущества заявляемого стабилизатора становятся еще более очевидными.

Следует отметить, что нижние концентрации компонентов стабилизатора определяются минимальной концентрацией

гидролизата протеина и сахарозы, необходимых для формирования препарата в форме таблетки с равномерно распределенными порами. Суммарную концентрацию белка и сахарозы подбирают не менее 5%. Верхний предел концентрации нативных протеинов ограничивается их растворимостью в ФСБ.

Минимальная концентрация ЭДТА недостаточно надежно защищает ион железа от примесных ионов в растворе препарата, а максимальная концентрация обеспечивает избыток хелатирующего агента, который связывает частично и активное железо.

Таким образом, экономическая эффективность применения предлагаемого изобретения состоит в следующем. Стабилизирующий состав (1 и 2) на основе гидролизата протеина, сахарозы и ЭДТА (табл. 2) позволяет лиофильно высушивать конъюгат анти-IgG:ПХ без потери активности.

При хранении конъюгата анти-IgG:ПХ при 37 °C в течение 10 мес заявляемый стабилизирующий состав (табл. 3) обеспечивает сохранение исходной активности на 80%, а прототип - на уровне 50% от исходной активности. Таким образом, по сравнению с прототипом предложенный стабилизирующий состав снижает потери специфической активности препарата в полтора раза при хранении его длительное время (10 мес и более).

Промышленная применимость. Изобретение может быть использовано в биотехнологии, медицине и ветеринарии при приготовлении иммунобиологических препаратов.

Источники информации

1. Патент США N 4504579, кл. C 12 Q 1/28, C 12 N 9/96, опубл. 19/6 г. (аналог).

2. Воробьева М.С., Шаламберидзе А.Г., Канев А.Н. и др. Вопросы вирусологии. - 1992, N 2.

3. Naofumi Hanafusa. - Contributions from the Institute of Low Temperature Science. Ser. B, 1972, N 17, p. 1-38 (аналог).

4. Патент Российской Федерации N 2046342, кл. G 01 N 33/535, C 12 N 9/96, опубл. 1995 г. (прототип).

5. ГОСТ 13805-076. Пептон ферментативный. Госстандарт СССР, 1976.

6. ТУ 11293-78. Желатин пищевой. Госстандарт СССР, 1978.

7. МИ 123. 39. 002-88. Методика определения остаточной влажности малых количеств материала. - 1988. 7 с.

Формула изобретения:

1. Стабилизирующий состав для получения лиофилизированных препаратов на основе конъюгата антииммуноглобулина G и пероксидазы хрена, включающий гидролизат протеина, сахарозу, фосфатно-солевой буфер и бактериостатик, отличающийся тем, что он дополнительно содержит бычий сывороточный альбумин, ЭДТА (трилон Б) и хлористый калий при следующем соотношении компонентов, мас. %:

Бычий сывороточный альбумин - 0,1 - 3,0

Сахароза - 1,0 - 10,0

Гидролизат протеина - 1,0 - 5,0

Хлористый калий - 2,0 - 8,0

ЭДТА (трилон Б) - 0,03 - 0,2

Бактериостатик - 0,01 - 0,02

Фосфатно-солевой буфер - Остальное

2. Состав по п.1, отличающийся тем, что в качестве гидролизата протеина используют

пептон или желатин, а в качестве бактериостатика - мертиолят.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-5-

RU 2109290 C1

RU 2109290 C1

Таблица 1

Данные по количественному содержанию (мас. %) компонентов в заявляемом стабилизирующем составе и составе - прототип

Компоненты стабилизаторов	№ состава						
	1	2	3	4	5	6	7
	заявляемые составы						прот.
1. БСА	1,5	1,5	3,0	3,0	0,1	0,1	-
2. пептон	7,3	-	7,3	-	7,3	-	8,0
3. желатин	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-
4. сахароза	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	2,0
5. KCl	6,7	6,7	8,0	2,0	8,0	2,0	-
6. трилон"Б"	0,05	0,05	0,15	0,15	0,15	0,15	-
7. ФСБ	80,35	82,65	77,45	85,75	80,35	88,7	90,0

Таблица 2

Данные по сохранению активности препарата со стабилизирующим составом на стадии лиофилизации

№ состава	% активности конъюгата относительно его жидкой формы, $\sigma = \pm 5,0\%$
1 (заявляемый)	100
2 то же	98
3 "-	96
4 "-	94
5 "-	95
6 "-	97
7 (прототип)	97

Таблица 3

Данные по сохранению активности конъюгата анти-IgG:ПХ в процессе хранения

№ состава стабилизатора	Время хранения при +4°C 6 месяцев	Время хранения при +37°C	
		2 месяца	10 месяцев
1 (заявляемый)	93	95	81
2 то же	94	98	82
3 "-	85	76	58
4 "-	87	79	65
5 "-	78	65	53
6 "-	67	61	47
7 (прототип)	90	87	50

RU 2109290 C1

RU 2109290 C1