



Створення комбінованих стабілізуючих композицій для збереження активності гонадотропінів у рідкій формі препарату

О. В. Штапенко¹, І. І. Гевкан¹, В. Я. Сирватка², О. Ю. Сливчук¹,
О. О. Корбецька¹, С. Б. Корнят¹, І. М. Яремчук¹

shtapenko31@gmail.com

¹Інститут біології тварин НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна, inenbiol@mail.lviv.ua

²Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна

Активність розчинених ферментних препаратів протягом зберігання зменшується, що призводить до втрати їхньої біологічної активності, а отже, знижується ефективність дії препарату за їх використання. Тому розробки композицій, здатних підтримувати високу активність гормону у розчиненому виді впродовж тривалого зберігання, є актуальними. Результати досліджень показали, що застосування цукрози як стабілізуючого компонента для збереження активності гонадотропіну є ефективним. Встановлено, що впродовж восьми тижнів зберігання кращі результати на збереження активності гонадотропіну при зберіганні за температури 40°C отримано у зразках з вмістом 75 мг/мл цукрози порівняно зі зразком контрольної групи. Проте найвищу активність гонадотропіну виявлено за використання як стабілізаторів 10 мг/мл L-лізину та 75 мг/мл цукрози. Вивчення динаміки активності гонадотропіну впродовж тривалого зберігання за температури 18–20°C показали, що додавання L-лізину та цукрози як стабілізуючих речовин у формі ліпосомальної емульсії на 11,4% підвищує збереження активності хоріонічного гормону впродовж 2 тижнів зберігання, порівняно з аналогічною за складом фармакологічною композицією препарату у водній формі.

Ключові слова: хоріонічний гормон людини, активність, стабілізація, цукроза, манітол, лізин

Гонадотропіни представлені групою структурно пов'язаних глікопротеїнових гормонів. До гонадотропіних гормонів належать фолікулоstimулюючий (ФСГ), лютеїнізуючий (ЛГ) та тиреотропний гормони гіпофіза, а також гормон плаценти — хоріонічний гонадотропін (ХГ). Хоріонічний гонадотропін людини (ХГл) — плацентарний глікопротеїновий гормон, який діє через зв'язування з рецептором, зв'язаним з G-білком, що призводить до збільшення активності аденілатциклази [8].

ХГл — димер, який складається з двох зв'язаних між собою нековалентним зв'язком субодиниць α і β , кожна з яких кодується окремим геном, розміщених в 7 і 19-ій хромосомах відповідно. [6]. Біологічна активність залежить від зв'язку цих субодиниць. Обидві субодиниці є глікозилітованими і глікозилування під час біосинтезу є необхідним для правильної побудови кожної субодиниці. Обидві вони мають декілька дисульфідних мостиків, а кристалічні структури ХГл і люд-

ського ФСГ показують, що три із дисульфідних мостиків обидвох субодиниць утворюють цистеїнові вузли. Альфа-субодиниця ХГл ідентична α -субодиниці гомологічних гіпофізарних гормонів (ЛГ, ФСГ, ТТГ) і містить 92 амінокислотні залишки [2, 3]. Бета-субодиниця ХГл визначає біологічну специфічність та виконує особливі біологічні функції. Вона складається з 145 амінокислотних залишків, на 80% близька за структурою до β -субодиниці лютеїнізуючого гормону, однак відрізняється подовженням C-кінцевої ділянки на 24 амінокислотних залишки [12]. Біля 30% молекулярної маси ХГл становлять вуглеводні залишки — переважно аспарагіну (N-глікозидний зв'язок) та серину (O-глікозидні зв'язки), які є необхідними для з'єднання субодиниць гормону, підтримки функціональної конформації поліпептидного ланцюга [2, 3, 5, 7, 11].

Очищені гонадотропіни отримують в сухій формі за допомогою ліофілізації. Вони є стабільними за зберігання, проте під час процесу ліофілізації протеї-

ни схильні зазнавати значних денатураційних змін і втрачати свою біологічну активність. Крім того, перед використанням гонадотропінів у ліофілізованому вигляді необхідно відновити розчинність глікопротеїну. Проте тривалість активності гонадотропіну в розчинених препаратах дуже коротка — від кількох десятків хвилин до кількох годин, і розчинення препаратів створює незручності, бо вимагає затрат часу та обережності. Водночас ліофілізація є дорогим і трудомістким етапом в процесі одержання гонадотропінів. Тому розробки композицій, які можуть підтримувати високу активність гормону у розчиненому виді впродовж тривалого зберігання без ліофілізації, є актуальними, бо це здешевить препаратів гонадотропінів та усуне недоліки їх застосування. Однак неможливо передбачити один стандартний рецепт для всіх білків, і вибір найкращого компонентного складу вимагає значної роботи з підбору стабілізаторів. Метою роботи було дослідження динаміки активності ХГл у розчиненому стані за додавання цукрів, амінокислот та їхніх композицій впродовж восьми тижнів зберігання.

Матеріали та методи

Хоріонічний гонадотропін людини (ХГл) було отримано в Інституті біології тварин НААН з сечі вагітних жінок (12–14 тижнів вагітності). Для оцінки впливу стабілізатора на стабільність активності гонадотропінів виготовлено зразки хоріонічного гормону людини з початковою концентрацією 2,500 мМО/мл. Як стабілізатор використовували лізин (0,2 та 10 мг/мл), цукрозу і манітол (25, 50 та 75 мг/мл). Досліджувані зразки розфасовували у пеніцилінові флакони та зберігали за кімнатної температури впродовж восьми тижнів. Через кожні два тижні визначали концентрації загального (ХГл+β-ХГл) та вільного (β-ХГл) імунохемілюнесцентним методом [4]. Активність ХГл визначали за різницею (ХГл+β-ХГл) – (β-ХГл).

Для вивчення динаміки активності гонадотропіну за сумісного використання цукрів та амінокислот, ХГл розводили фосфатно-сольовим буфером рН 7,34 у розрахунку 7000 мМО/мл активності гонадотропіну та додали 10 мг L-лізину і 75 мг цукрози на 1 мл препарату. Для порівняння активності досліджуваних композицій гонадотропіну у водній та ліпосомальній формі зразки дослідної групи вводили у ліпосомальну емульсію. Препарати обох груп зберігали впродовж двох місяців за кімнатної температури 18–20°C.

Результати й обговорення

Аналіз останніх досліджень і публікацій щодо впливу лікарської форми на терапевтичну ефективність ліків показав, що оптимальна активність лікарської речовини досягається лише за умови застосування її в раціональній лікарській формі [9].

Тривалий час у розробці та виробництві лікарських засобів основну увагу зосереджували на діючих речовинах, їхніх хімічних та фармакологічних властивостях, тоді як допоміжні речовини вважались індиферентними формоутворювачами. Чисельні експериментальні дослідження комплексу «діюча речовина — допоміжна речовина» встановили здатність допоміжних речовин змінювати характер і силу терапевтичної ефективності активних фармацевтичних інгредієнтів, а, отже, і фармацевтичного препарату загалом [9]. На основі аналізу літературних даних [3, 6, 11] ми запропонували дослідити способи стабілізації гонадотропіну додаванням лізину або/та цукрози як стабілізуючих чинників або як регуляторів тонічності водної композиції.

У дослідженні впливу цукрози на стабільність активності гонадотропіну в розчиненому стані встановлено, що впродовж восьми тижнів зберігання кращі результати на збереження активності гонадотропіну при зберіганні за температури 40°C отримано у зразках із вмістом 75 мг/мл цукрози (рис. 1) порівняно зі зразком контрольної групи. Активність розчинного гонадотропіну під впливом вищих концентрацій цукрози (50 та 75 мг) впродовж досліджуваного періоду зберігання була вищою від аналогічних показників контрольної групи і показників за використання цукрози у дозі 25 мг. Водночас за зберігання ХГл у період від 6- до 8-го тижня вищу активність отримано від додавання у зразки 75 мг/мл цукрози порівняно зі зразками, концентрація цукрози в яких складала 50 мг.

Встановлено, що інкубування проб із вмістом манітолу 25 мг призводить до зниження активності ХГл впродовж усього досліджуваного періоду, тоді як вищі концентрації стабілізатора на 2-й і 4-й тижень зберігання вірогідно підвищують активність гормону, однак на 8-й тижень активність гонадотропіну контрольної групи перевищувала показники дослідних груп (рис. 2).

З метою дослідження можливості сумісного використання цукрів та амінокислот на збереження активності ХГл відібрано зразки в тих концентраціях стабілізаторів, які проявляли кращий стабілізуючий ефект. Вищою активність ХГл при зберіганні впродовж 2-х місяців за температури 40°C залишалась у зразках з використанням як стабілізатора 10 мг/мл L-лізину та 50 і 75 мг цукрози порівняно з показниками контрольної групи (рис. 3).

Активність гонадотропіну на 2-й тижень зберігання була у 2,28 та 2,51 раза вищою від контролю за додавання до рецептів дослідних серій зразків 0,25 мг/мл L-гліцину та 50 або 75 мг/мл цукрози відповідно. Впродовж зберігання активність гонадотропіну поступово знижувалася і на 8-ий тижень в 1,72 та 2,77 раза перевищувала відповідний показник контрольної групи.

Отримані нами дані зі стабілізації ХГл підтверджуються дослідженнями інших авторів, які довели доцільність використання метіоніну і гістидину (від

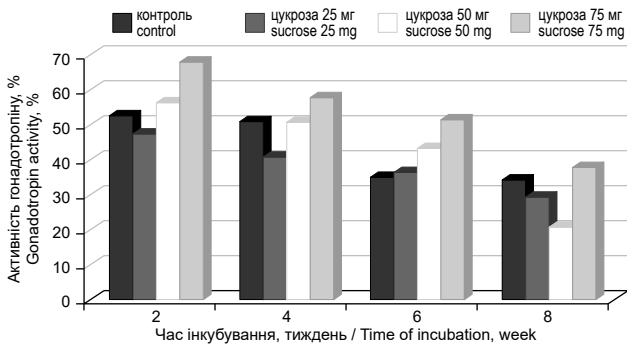


Рис. 1. Динаміка активності ХГл при додаванні цукрози до стабілізаційних композицій за умов тривалого зберігання в розчинному стані

Fig. 1. Dynamics of hCG activity with addition of sucrose to the stabilizing compositions under conditions of long-term storage in soluble state

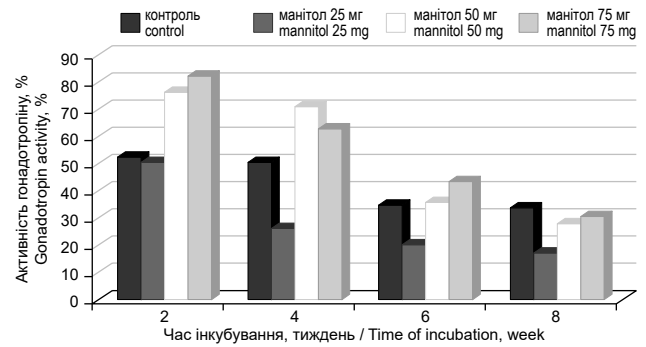


Рис. 2. Динаміка активності ХГл за додавання манітолу до стабілізаційних композицій за умов тривалого зберігання в розчинному стані

Fig. 2. Dynamics of hCG activity with addition of mannitol to the stabilizing compositions under conditions of long-term storage in soluble state

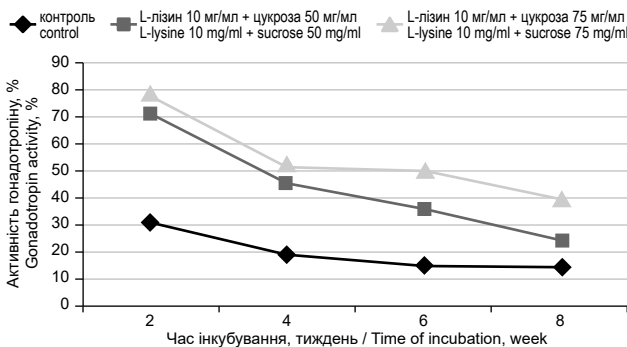


Рис. 3. Динаміка активності гонадотропіну за додавання до розчинника L-лізину і цукрози

Fig. 3. Dynamics of gonadotropin activity with addition of L-lysine and sucrose to the solvent

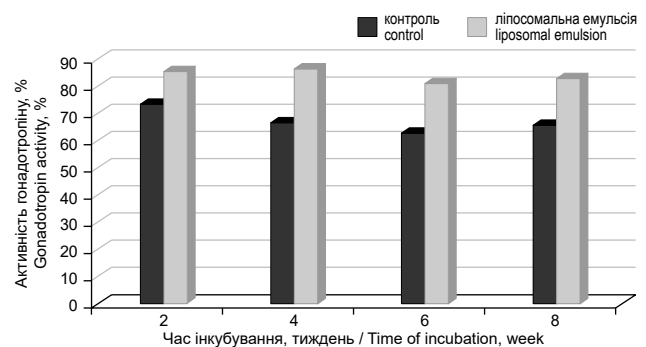


Рис. 4. Динаміка активності гонадотропіну за додавання стабілізуючих композицій у формі ліпосомальної емульсії впродовж 2-х місяців зберігання

Fig. 4. Dynamics of gonadotropin activity with addition of stabilizing compositions in form of liposomal emulsion during 2 months of storage

0,05 до 10 мг/мл), цукрози, *Tween 80* для стабілізації водної фармацевтичної композиції, котра містить фолікулостимулюючий гормон [1]. У міжнародних патентних заявках WO 2004/037607 описано водні лікарські форми ФСГ, які містять гліцин, метіонін, неіонну поверхнево-активну речовину і фосфатний буфер як стабілізатори [13].

Вивчення динаміки активності гонадотропіну в ліпосомальних препаратах впродовж тривалого зберігання за температури 18–20°C протягом 2 тижнів зберігання показали, що додавання L-лізину та цукрози як стабілізуючих речовин до гонадотропіну у формі ліпосомальної емульсії на 11,4% підвищує збереження активності хоріонічного гормону порівняно з аналогічною за складом фармакологічною композицією препарату у водній формі (контроль) (рис. 4). На 4-й тиждень активність гонадотропіну в контрольних зразках знизилась на 7,2% щодо показника на 2-й тиждень, тоді як в дослідному зразку активність не змінилася. Зберігання препаратів за кімнатної температури впродовж 6-ти і 8-ми тижнів призвело до зниження активності гонадотропіну в обох групах зразків, при цьому активність ХГл у ліпосомальних

препаратах, відповідно, на 18,2 і 17,1% перевищувала показники контрольної групи.

Отже, використання допоміжних багатофункціональних речовин — таких, як цукри і амінокислоти — забезпечує довготривалу стабільність, підвищує терапевтичну дію активного фармацевтичного інгредієнта лікарського препарату, зокрема хоріонічного гонадотропіну людини, і створює передумови для оптимізації технологічного процесу з його використанням у тваринництві для стимуляції зниженої репродуктивної функції у сільськогосподарських тварин.

Висновки

Доведено стабілізуючу здатність цукрози та L-лізину за їх додавання після розчинення гормону для збереження активності хоріонічного гормону людини та зберігання впродовж двох місяців за температури 40°C. Сумісне додавання 10 мг/см³ L-лізину та 75 мг/см³ цукрози забезпечує вищі показники активності гонадотропіну порівняно з контролем та застосуванням інших композицій впродовж всього

терміну досліджень. Додавання до фармакологічних композицій L-лізину та цукрози забезпечує до 82,8% збереження активності хоріонічного гормону у ліпосомальних препаратах впродовж 8-ми тижнів зберігання за температури 18–20°C, що на 17,1% більше порівняно з аналогічним за складом препаратом гонадотропіну у водній формі.

Перспективи подальших досліджень

За умов значних порушень репродуктивних функцій у високопродуктивних тварин для оптимізації технологічного процесу відтворення молочної худоби відкриваються перспективи нових досліджень зі збереження активності хоріонічного гормону у різних формах препаратів для його використання у тваринництві з метою стимуляції зниженої репродуктивної функції у сільськогосподарських тварин.

1. Agostinetti R, Samaritani F, Del Rio A, Richard J. LH liquid formulations. Patent for invention no. US-8664369-B2 from 04.03.2014. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-8664369-B2>
2. Choi J, Smitz J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: distinguishing unique physiologic roles. *Gynecol. Endocrinol.* 2014; 30 (3): 174–181. DOI: 10.3109/09513590.2013.859670.
3. Choi J, Smitz J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference. *Mol. Cell Endocrinol.* 2014; 383 (1–2): 203–213. DOI: 10.1016/j.mce.2013.12.009.
4. Chu C, Li L, Li S, Li M, Ge S, Yu J, Yan M, Song X. Fluorescence-based immunoassay for human chorionic gonadotropin based on polyfluorene-coated silica nanoparticles and polyaniline-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Microchim. Acta.* 2013; 180: 1509–1516. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1067-7>.
5. Fernández-Tejada A, Vadola PA, Danishefsky SJ. Chemical synthesis of the β -subunit of human luteinizing (hLH) and chorionic gonadotropin (hCG) glycoprotein hormones. *J. Am. Chem. Soc.* 2014; 136 (23): 8450–8458. DOI: 10.1021/ja503545r.
6. Fournier T. Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Ann. Endocrinol. (Paris).* 2016; 77 (2): 75–81. DOI: 10.1016/j.ando.2016.04.012.
7. Griffin D, Feinn R, Engmann L, Nulsen J, Budinetz T, Benadiva C. Dual trigger with gonadotropin-releasing hormone agonist and standard dose human chorionic gonadotropin to improve oocyte maturity rates. *Fertil. Steril.* 2014; 102 (2): 405–409. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.028.
8. Lawrenz B, Samir S, Garrido N, Melado L, Engelmann N, Fatemi H. Luteal coasting and individualization of human chorionic gonadotropin dose after gonadotropin-releasing hormone agonist triggering for final oocyte maturation — a retrospective proof-of-concept study. *Front. Endocrinol.* 2018; 9: 33. DOI: 10.3389/fendo.2018.00033.
9. Odintsova V, Bidnenko O. Selection of the excipients to create tablets of adamantane-1-ammonium 2-((5-(adamantane-1-yl)-4-phenyl-4h-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate by the method of wet granulation. Part 1. *ScienceRise: Pharm. Sci.* 2017; 1 (5): 49–53. DOI: 10.15587/2519-4852.2017.93722.
10. Pertsev I, Dmitrievsky, Rybachuk V. *Excipients in Drug Technology: the impact on technological, consumer, economic characteristics and therapeutic efficacy.* A textbook for students. Kharkiv, Golden Pages, 2010: 600 p. ISBN 978-966-400-178-3. (in Ukrainian)
11. Schanz A, Lukosz M, Hess AP, Baston-Büst DM, Krüssel JS, Heiss C. hCG stimulates angiogenic signals in lymphatic endothelial and circulating angiogenic cells. *J. Reprod. Immunol.* 2015; 110: 102–108. DOI: 10.1016/j.jri.2015.01.011.
12. Slyvchuk Y, Matiukha I, Syrvatka V, Hevkan I, Shtapenko O, Broda N. The influence of physical and chemical factors on HCG conservation activity for a long stored in the dilution state. *ScienceRise: Biol. Sci.* 2015; 11 (6/16): 18–22. DOI: 10.15587/2313-8416.2015.53805.
13. Stolzenberger S., Kohler E. Liquid formulation of FSH. Patent for invention no. CN-101970010-A from 09.02.2011. Available at: <https://testpubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/CN-101970010-A>

Creation of combined stabilizing compositions to preserve the activity of gonadotropins in liquid form

O. V. Shtapenko¹, I. I. Gevkan¹, V. Y. Syrvatka², O. Y. Slyvchuk¹, O. O. Korbetska¹, S. B. Kornyat¹, I. M. Yaremchuk¹

¹Institute of Animal Biology NAAS,
38 V. Stusa str., Lviv, 79034, Ukraine, inenbiol@mail.lviv.ua

²Ivan Franko National University of Lviv,
4 M. Hrushevskoho str., Lviv, 79005, Ukraine

The activity of dissolved enzyme preparations during storage decreases, what leads to the loss of their biological activity and, as a result, reduces the effectiveness of the drugs. Therefore, the development of compositions that are able to maintain high activity of the hormone in dissolved form during long-term storage is relevant. The results of studies have shown that using sucrose as a stabilizing component for maintain gonadotropin activity is effective. It was found that during eight weeks of storage the best results on the preservation of gonadotropin activity during storage at 40°C were obtained in samples containing 75 mg/ml of sucrose compared to the sample of the control group. However, the highest gonadotropin activity was found when — 10 mg/ml L-lysine and 75 mg/ml sucrose were used as stabilizers. Studies of the dynamics of gonadotropin activity during long-term storage at 18–20°C showed that the addition of L-lysine and sucrose as stabilizing substances in the form of liposomal emulsion increases the preservation of chorionic hormone activity for 2 weeks of storage by 11.4% compared to similar composition pharmacological composition of the drug in aqueous form.

Key words: human chorionic hormone, activity, stabilization, sucrose, mannitol, lysine