

УДК 615.072

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ
ПРОТИВ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**¹Кухаренко А.Е., ¹Гаврилова Н.А., ²Гравель И.В., ¹Черепушкин С.А.,
¹Орлова Н.В., ³Ловцова Л.В.**

¹ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов», Москва, e-mail: andrey.kukharenko@gmail.com;

²ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва;

³ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России,
Нижний Новгород

В ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» разработана терапевтическая вакцина на основе гибридных рекомбинантных белков (раннего онкобелка E7 вируса папилломы человека и белка теплового шока HSP70 *Mycobacterium tuberculosis*), полученных в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. В качестве адьюванта использовали алюминия гидроксид. В работе представлены данные по стандартизации и контролю качества готовой лекарственной формы терапевтической вакцины (суспензия для инъекций). Проведена валидация аналитических методов определения подлинности методом иммуноблоттинга, содержания общего белка и полноты сорбции методом Лоури, в соответствии с отечественными и международными требованиями. Исследованы основные фармако-технологические параметры трех опытно-промышленных серий готовой лекарственной формы (рН, механические включения, прозрачность и цветность раствора, инъекруемость, седиментационная устойчивость и полнота сорбции), проведен микробиологический и токсикологический контроль. Полученные результаты послужили основой для разработки проекта нормативной документации на терапевтическую вакцину против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, рекомбинантные белки, терапевтическая вакцина, суспензия для инъекций, алюминия гидроксид, стандартизация

**STANDARDIZATION OF FINISHED DOSAGE FORM OF THERAPEUTIC VACCINE
AGAINST HUMAN PAPILLOMAVIRUS-ASSOCIATED DISEASES**

**¹Kukharenko A.E., ¹Gavrilova N.A., ²Gravel I.V., ¹Cherepushkin S.A.,
¹Orlova N.V., ³Lovtsova L.V.**

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
Moscow, e-mail: andrey.kukharenko@gmail.com;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow;

³Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod

At Scientific Center «Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms» a therapeutic vaccine produced in *Saccharomyces cerevisiae* based on hybrid proteins – human papillomavirus early oncoprotein E7 and heat-shock protein HSP70 of *Mycobacterium tuberculosis* – had been developed. Aluminium hydroxide was used as adjuvant. In this paper we present data on standardization and quality control of therapeutic vaccine finished dosage form (suspension for injection). Validation of analytical methods for determining the identity by immunoblotting, total protein content and sorption completeness by Lowry method had been conducted in accordance with national and international requirements. Basic pharmacological and technological parameters of the three pilot scale batches of the finished dosage form (pH, mechanical inclusions, transparency and color of the solution, suspension particle size, sedimentation stability and completeness of sorption) had been determined, microbiological and toxicological control had been carried out. Obtained results provided the framework for development of regulatory documents relating to the therapeutic vaccine against recurrent respiratory papillomatosis and anogenital condylomatosis.

Keywords: human papillomavirus, recombinant proteins, therapeutic vaccine, suspension for injection, aluminium hydroxide, standardization

Вирус папилломы человека (ВПЧ) 6 и 11 типов принадлежит к группе малого онкогенного риска и в 90% случаев является причиной аногенитального кондиломатоза и рецидивирующего респираторного папилломатоза [8]. В настоящее время на фармацевтическом рынке отсутствуют ле-

карственные средства, специфически направленные на лечение данных заболеваний [11]. В связи с этим одним из перспективных направлений фармацевтической разработки являются терапевтические вакцины на основе онкобелка E7 ВПЧ, полученные с помощью технологии рекомбинантных

ДНК. Постоянное присутствие в инфицированных клетках и исключительно вирусное происхождение раннего онкобелка E7 делает этот антиген идеальной мишенью для высокоспецифичных способов иммунотерапии ВПЧ-ассоциированных заболеваний.

В ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» разработана терапевтическая вакцина против заболеваний, ассоциированных с ВПЧ 6 и 11 типов, в форме стерильной суспензии для инъекций [3]. Действие препарата направлено на индукцию специфических Т-клеточных иммунных ответов против ранних вирусных онкобелков, что позволит обеспечить подавление или эрадикацию существующего в организме инфекционного агента [9].

Стандартизация лекарственного препарата является неотъемлемым звеном процесса фармацевтической разработки, в ходе которой разработанная стратегия контроля качества должна обеспечивать выпуск безопасного и эффективного продукта. Критическим моментом контроля качества терапевтической вакцины является отсутствие международного стандартного образца, что требует разработки внутреннего стандарта предприятия [13].

Основными критериями для выбора методов контроля качества являются физико-химические свойства целевых белков, состав вспомогательных веществ, а также чувствительность предложенных методик. Требования к контролю качества готовой лекарственной формы (ГЛФ) в виде суспензии для инъекций отражены в отечественной и зарубежных фармакопеях [2, 7].

Целью настоящего исследования является разработка методов и критериев контроля качества терапевтической вакцины против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза для подготовки проекта фармакопейной статьи предприятия.

Материалы и методы исследования

Терапевтическая вакцина содержит в прививочной дозе (0,5 мл) по 100 мкг гибридных рекомбинантных белков, представляющих собой слитые аминокислотные последовательности онкобелков E7 ВПЧ 6 и 11 типа и белка теплового шока HSP70 *Mycobacterium tuberculosis*, полученные в культуре *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Белки сорбированы на алюминия гидроксиде. Готовая форма не содержит консервантов и антибиотиков. Режим хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Для оценки подлинности использовали метод иммуноблоттинга с антителами, специфичными ко всем структурным единицам действующего вещества вакцины. Подлинность препарата оценивали по наличию на проявленных электрофореграммах

основной полосы рекомбинантного белка, соответствующей по электрофоретической подвижности стандартному образцу предприятия. Для проявления электрофореграмм использовали коммерческие антитела, специфичные к антигену E7 типа 6 (706-C5, HyTest, Финляндия), антигену E7 типа 11 (711-66, HyTest, Финляндия) и белку теплового шока 70 *Mycobacterium tuberculosis* (TS29, HyTest, Финляндия). При пробоподготовке образцов для проведения электрофоретического разделения проводили десорбцию белков стандартным буферным раствором, содержащим 2% натрия додецилсульфата и 100 мМ дитиотретола (ДТТ). Полученные образцы прогревали на водяной бане при 98–100 °С в течение 3 мин, охлаждали и центрифугировали при 1000 г в течение 10 мин. Процедуру разделения белков проводили методом Леммли в восстанавливающих условиях в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием оборудования для вертикального электрофореза Mini-protein Tetra cell (Bio-Rad, США). По окончании разделения осуществляли полусухой перенос разделенных в ПААГ белков в систему Bio-Rad Transblot SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad, США). При иммуноспецифической идентификации использовали систему антител: первичные моноклональные антитела мыши к различным структурным элементам действующего вещества вакцины в концентрации 5 мкг/мл и затем поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma, США) в разведении 1:5000. Относительную подвижность белковых полос и интенсивность окрашивания полос определяли с помощью системы для документирования гелей G-Box Chemix XR5 и программного обеспечения GeneTools (Syngene, США).

Определение содержания общего белка проводили методом Лоури с десорбцией [5]. Десорбцию 0,1 М раствором натрия гидроксида проводили в течение 30 мин при температуре 18–25 °С. Для определения общего белка использовали коммерческий набор Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo scientific, США).

Оценку полноты сорбции осуществляли путем измерения содержания белка в надосадочной жидкости сорбированного препарата методом Лоури [5].

Оценку параметров: описание, pH, механические включения, прозрачность и цветность раствора, микробиологический и токсикологический контроль проводили согласно требованиям ГФ XII изд. [1]. Параметры: извлекаемый объем, размер частиц суспензии, седиментационную устойчивость и полноту сорбции – оценивали согласно требованиям ГФ XI изд., вып. 2 [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка подлинности рекомбинантных белков включает методы определения молекулярной массы, электрофоретической подвижности, а также иммуноспецифических характеристик отдельных структурных единиц гибридных белков, сорбированных на алюминия гидроксиде [10]. При иммунопроявлении мембран антителами разной специфичности, независимо от типа антигена E7, обнаруживалась основная полоса рекомбинантного белка, под-

вижность которой соответствовала электрофоретической подвижности основной полосы стандартного образца.

Для оценки пригодности используемой методики проведена валидация по показателям: предел обнаружения и надежность.

Проведенные исследования показали, что использованный метод пробоподготовки образцов позволяет сохранить антигенную структуру действующего вещества вакцины. На электрофореграммах экспериментальных и стандартных образцов независимо от специфичности используемых антител детектировалась одна основная полоса с молекулярным весом около 90 кДа. Чувствительность детекции установлена на уровне не менее 25 нг белка.

Относительная подвижность основных полос образцов при проявлении антителами Mab 706-C5, 711-66 и TS29 отличалась не более чем на 5%.

Надежность метода определяли по устойчивости электрофоретической подвижности основной полосы при изменении времени пробоподготовки образцов. Результаты показали, что увеличение времени экспозиции испытуемых образцов в буферном растворе с ДТТ до 10 мин не приводило к существенному изменению относительной подвижности основной полосы (95–105% от номинального значения).

Метод Лоури с десорбцией рекомендован для сорбированных лекарственных средств с концентрацией общего белка 40–160 мкг/мл [5]. Оценка пригодности предлагаемой аналитической методики проводили по показателям: специфичность, линейность результатов, правильность, воспроизводимость, надежность.

После проведения десорбции исследуемый образец содержит только следовые количества растворителя и вспомогательных веществ, поэтому оценку специфичности методики проводили одновременно с определением правильности при использовании стандартного и экспериментального образца ГЛФ, имеющего повышенную нагрузку по сорбированному веществу (400 мкг/мл).

Проведенные исследования показали, что средняя концентрация белка в образцах ГЛФ составляла 97–114% от теоретического значения нагрузки по сорбированному веществу, которое рассчитывали исходя из концентрации белка в полупродукте до сорбции, определяемой методом с бичинхоиновой кислотой [1]. Относительное стандартное отклонение (RSD, %) по 3 независимым измерениям образцов не превышало 7%.

Для установления диапазона линейности методики использовали три экс-

периментальные серии ГЛФ с нагрузкой 50, 100 и 200 мкг по общему сорбированному белковому антигену. Рассчитанное уравнение линейной регрессии имело вид $y = 0,0012x - 0,0051$; квадрат коэффициента корреляции линейной регрессии $R^2 = 0,9798$, что подтверждает строгую линейность рассматриваемой зависимости.

Оценку повторяемости и воспроизводимости предлагаемой методики проводили путем статистической обработки результатов 5 измерений стандартного образца ГЛФ в рамках однократной постановки эксперимента и в 3 различных экспериментах, выполненных разными операторами в разные дни. Во всех случаях относительное стандартное отклонение содержания белка, рассчитанное для одного образца, не превышало 5%. Полученные результаты свидетельствуют о высокой воспроизводимости метода.

Надежность методики устанавливали по стабильности результатов, полученных для свежеприготовленного образца и образцов, приготовленных за 60 и 120 мин до измерения. Приготовленные образцы хранились при температуре от 2 до 8°C. Полученные результаты показали, что образец является стабильным в течение 120 мин. Отклонение результатов измерений в этом временном диапазоне не превышало 5%.

Основные аналитические характеристики методики для оценки полноты сорбции (специфичность, правильность, воспроизводимость, стабильность) были установлены в процессе валидации определения содержания общего белка методом Лоури с десорбцией. Для подтверждения пригодности аналитической методики определяли линейность и воспроизводимость.

В соответствии со спецификацией надосадочная жидкость ГЛФ может содержать не более 5% от сорбированного вещества, то есть от 0 до 20 мкг/мл белка, а чувствительность метода Лоури ограничивается диапазоном 20–200 мкг/мл, в качестве экспериментальных образцов использовали надосадочную жидкость стандартного образца ГЛФ, сконцентрированную в микроцентрифужных концентраторах с отсечением по молекулярной массе 10 кДа (Sartorius/Vivaspin 6, кат. № VS0651) в 5 и 10 раз. В качестве образца сравнения для оценки специфичности метода использовали раствор рекомбинантных белков до сорбции в концентрации 100 мкг/мл. По результатам измерений концентрация белка в одном и том же образце ГЛФ была кратна степени концентрирования при относительном стандартном отклонении не более 20% и не превышала 20 мкг на 1 мл надосадочной жидкости. Линейность

измерений устанавливали в полном диапазоне чувствительности метода (20–200 мкг/мл), с использованием стандартного образца раствора рекомбинантных белков. Рассчитанное уравнение линейной регрессии имело вид $y = 0,0012x + 0,0068$; квадрат коэффициента корреляции линейной регрессии $R^2 = 0,9531$, что подтверждает строгую линейность рассматриваемой зависимости в рабочем диапазоне методики.

Количественное определение содержания адьюванта является неотъемлемой частью процесса контроля качества сорбированных вакцин. Содержание алюминия гидроксида в препарате установлено в соответствии с отечественными и меж-

дународными требованиями на уровне, не превышающем допустимый лимит (не более 1,25 мг алюминия), и составляет не менее 0,32 и не более 0,48 мг на дозу [5, 7, 12]. Определение проводили методом комплексонометрического титрования [1].

Спецификация показателя рН в диапазоне от 7,0 до 7,6 [6] введена на основании данных по стабильности белка и оптимальных условиях его сорбции. В соответствии с требованиями к растворам для инъекций терапевтическую вакцину контролировали по показателям: механические включения, прозрачность и цветность раствора, а также извлекаемый объем [2, 4].

Параметры качества терапевтической вакцины

Наименование показателя	Метод испытания	Спецификация	Терапевтическая вакцина, серия		
			1	2	3
Описание	ГФ XII, визуальный	Суспензия серовато-белого цвета, разделяющаяся при стоянии на рыхлый осадок серовато-белого цвета, разбивающийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость	Соответствует		
Подлинность	Вестерн-блот после десорбции	На электрофореграмме испытуемого образца должна обнаруживаться одна основная полоса, соответствующая по подвижности основной полосе стандартного образца	Соответствует		
рН	ГФ XII, потенциометрический	От 7,0 до 7,6	7,2	7,3	7,2
Содержание белка	ГФ XII, модифицированный метод Лоури с предварительной десорбцией	Не менее 90 и не более 110 % от номинального значения	98 %	103 %	107 %
Извлекаемый объем	ГФ XI, вып. 2	Не менее номинального	Соответствует		
Стерильность	ГФ XII, метод прямого посева	Должна быть стерильной	Соответствует		
Бактериальные эндотоксины	ГФ XII, качественный анализ (Метод А)	Не более 20 ЕЭ/мг белка	Соответствует		
Аномальная токсичность	ГФ XII, биологический	Должна быть нетоксичной	Соответствует		
Полнота сорбции	ГФ XII, модифицированный метод Лоури	Не менее 95 %	97,2 %	96,8 %	96,7 %
Алюминий	ГФ XII ч.1, комплексонометрическое титрование	Не менее 0,32 и не более 0,48 мг/доза	0,41 мг/доза	0,43 мг/доза	0,39 мг/доза
Размер частиц сорбента	ГФ XI, визуальный	Суспензия вакцины должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840	Соответствует		
Время седиментационной устойчивости	ГФ XII, визуальный	Суспензия вакцины не должна расслаиваться в течение 5 мин после встряхивания	Соответствует		

Фармако-технологическими параметрами, необходимыми при контроле суспензий для инъекций согласно требованиям ОФС «Суспензии», являются размер частиц сорбента (который определяет способность суспензии вакцины свободно проходить в шприц с иглой № 0840 (0,8×40 мм)) и оценка времени седиментационной устойчивости (препарат не должен расслаиваться в течение 5 минут после встряхивания) [2].

Кроме вышеперечисленных критериев, проводили определение непрогнозируемой токсичности препарата («Тест для вакцин и сывороток» ОФС «Аномальная токсичность») и содержания бактериальных эндотоксинов (ОФС «Бактериальные эндотоксины») [1]. Оценку стерильности осуществляли методом прямого посева [1], так как алюминия гидроксид исключает возможность применения метода мембранной фильтрации.

На основании установленных критериев и методов контроля качества был проведен анализ трех серий терапевтической вакцины и разработана спецификация (таблица).

Выводы

Проведена разработка критериев и методов контроля качества терапевтической вакцины против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза. Выбранные параметры качества подтверждены на 3 сериях препарата.

Полученные данные послужили основой для разработки проекта фармакопейной статьи предприятия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Государственного контракта № 16.N08.12.1024 от 14 июня 2012 г. по теме «Доклинические исследования отечественной терапевтической вакцины против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза, произведенной на основе клеток эукариот».

Список литературы

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII. Часть I. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008.
2. Государственная Фармакопея СССР XI изд., вып. 2. – М.: Медицина, 1990. – 398 с.
3. Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Губайдуллин И.И., Ефремов Б.Д., Тюрин О.В., Залуниин И.А. Способ получения белка E7-HSP70 и штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для его осуществления. Патент РФ № 2489481, 2013.
4. ОСТ 91500.05.001-00. «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения»
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 536 с.
6. Ураков А.Л., Уракова Н.А., Михайлова Н.А., Решетников А.П., Шахов В.И. Местная постинъекционная агрессивность растворов лекарственных средств в инфильтрированных тканях и способы ее устранения // Медицинский альманах. – 2007. – № 1. – С. 95–97.
7. European Pharmacopoeia, 7 ed. (Electronic). – 2011.
8. Herman BE, Corneli HM A practical approach to warts in the emergency department // *Pediatr Emerg Care.* – 2008. – № 24(4). – P. 246–51.

9. Hung C.F. Wu T.C., Monie A., Roden R. Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer // *Immunol Rev.* – 2008. – (Apr) 222. – P. 43–69.

10. ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/365/96).

11. Katsenos S, Becker H.D. Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: apropos of two cases and a brief literature review // *Case Rep Oncol.* – 2011. – № 4(1). – P. 162–71.

12. Note for guidance on pharmaceutical and biological aspects of combined vaccines (CPMP/BWP/477/97).

13. WHO Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology.

References

1. Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii XII. Chast' I. M.: Nauchnyj centr jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya; 2008.
2. Gosudarstvennaja Farmakopeja SSSR XI izd., vyp. 2. M.: Medicina, 1990. 398 p.
3. Kozlov D.G., Cheperegin S.Je., Gubajduillin I.I., Efremov B.D., Tjurin O.V., Zalunin I.A. Sposob polucheniya belka E7-HSP70 i shtamma drozhzhej *Saccharomyces cerevisiae* dlja ego osushhestvleniya. Patent RF no. 2489481, 2013.
4. OST 91500.05.001-00. «Standarty kachestva lekarstvennyh sredstv. Osnovnye polozhenija»
5. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv (immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty). Chast' vtoraja / Pod red. A.N. Mironova. M.: Grif i K, 2012. 536 p.
6. Urakov A.L., Uraкова N.A., Mihajlova N.A., Reshetnikov A.P., Shahov V.I. Mestnaja postinekcionnaja agressivnost' rastvorov lekarstvennyh sredstv v infil'trirovannyh tkanjah i sposoby ee ustraneniya // *Medicinskij al'manah.* 2007; 1: 95–97.
7. European Pharmacopoeia, 7 ed. (Electronic). 2011.
8. Herman BE, Corneli HM A practical approach to warts in the emergency department // *Pediatr Emerg Care.* 2008; 24(4): 246–51.
9. Hung C.F. Wu T.C., Monie A., Roden R. Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer // *Immunol Rev.* 2008; (Apr) 222: 43–69.
10. ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/365/96).
11. Katsenos S., Becker H.D. Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: apropos of two cases and a brief literature review // *Case Rep Oncol.* 2011; 4(1): 162–71.
12. Note for guidance on pharmaceutical and biological aspects of combined vaccines (CPMP/BWP/477/97).
13. WHO Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology.

Рецензенты:

Ураков А.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии, ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, научный сотрудник отдела термомодеформационных процессов Института механики Уральского отделения РАН, главный внештатный специалист по фармакоэкономике Минздрава РФ, эксперт секции медико-биологических и фармацевтических наук ВАК Минобрнауки РФ, г. Ижевск;

Кононова С.В., д.ф.н., заведующий кафедрой управления и экономики фармации и фармацевтической технологии, ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 26.12.2014.