

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 615.371:579.843.94].012.072

РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ФОРМЫ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ТИПА В

О. В. Белякова, А. М. Николаева*, О. Ю. Соснина, О. С. Дрожжачих

НПО «Микроген», Пермское НПО «Биомед», г. Пермь, Россия

DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF FROZEN-DRIED VACCINE FORM FOR PREVENTION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPE B-INDUCED INFECTIONS

O. V. Belyakova, A. M. Nikolaeva*, O. Yu. Sosnina, O. S. Drozhzhachikh

SPA "Microgen", Perm SPA "Biomed", Perm, Russian Federation

Цель. Получение лиофилизированной синтетической конъюгированной вакцины для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b* (ХИБ-вакцины), ее стандартизация и доклиническая оценка.

Материалы и методы. Оценку качества ХИБ-вакцины проводили по следующим показателям: количественное определение полирибозилрибитола фосфата (*PRP*), растворимость, потеря в массе при высушивании, стерильность, осмолярность, иммуногенность. Доклиническую оценку безопасности ХИБ-вакцины выявляли на беспородных белых мышах с использованием стандартных методов, включающих изучение острой и хронической токсичности, патоморфологические, гематологические и биохимические исследования.

Результаты. Разработана технология получения лиофилизированной лекарственной формы ХИБ-вакцины. Отработаны методы контроля в соответствии с рекомендациями Европейской фармакопеи. Для определения подлинности столбнячной составляющей ХИБ-вакцины предложен оригинальный метод, основанный на реакции коагуляции. Показано, что лиофилизированная ХИБ-вакцина стимулирует выработку антител к *PRP* у кроликов на уровне, сопоставимом с вакцинами АКТ-ХИБ и Кими-ХИБ (16,91; 17,19 и 15,28 мкг/мл соответственно). В случае использования вакцин АКДС-Геп В+ХИБ и аАКДС-Геп В+ХИБ наблюдался более высокий уровень антител к полисахариду (42,91 и 40,31 мкг/мл соответственно) по сравнению с моновакцинами ($p < 0,05$). При изучении ХИБ-вакцины в тестах острой и хронической токсичности не наблюдалось снижения массы тела животных, а также существенных изменений биохимических и гематологических показателей, что свидетельствует об отсутствии токсического действия препарата.

© Белякова О. В., Николаева А. М., Соснина О. Ю., Дрожжачих О. С., 2014

e-mail: a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

тел. 8 (342) 262 32 75

[Белякова О. В. – младший научный сотрудник; Николаева А. М. (*контактное лицо) – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе и инновационному развитию; Соснина О. Ю. – кандидат биологических наук, начальник научного отдела; Дрожжачих О. С. – младший научный сотрудник].

Выводы. Изучение физико-химических свойств, стерильности, подлинности, иммуногенности и специфической безопасности показало, что лиофилизированная форма синтетической конъюгированной вакцины для профилактики гемофильной инфекции типа *b*, полученная по разработанной технологии, полностью соответствует требованиям Европейской фармакопеи и может быть использована в составе комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и гемофильной инфекции типа *b*.

Ключевые слова. Гемофильная инфекция типа *b*, ХИБ-вакцина, осмолярность, стабильность, полирибозилрибитол фосфат (PRP), доклиническое исследование, острая и хроническая токсичность, иммуногенность.

Aim. To produce a frozen-dried vaccine form for prevention of infections induced by *Haemophilus influenzae* of type *b* (HIB-vaccine), its standardization and preclinical assessment.

Materials and methods. HIB-vaccine quality was estimated by the following parameters: quantitative determination of polyribosilribitol phosphate (PRP), solubility, drying mass loss, sterility, osmolarity, immunogenicity. Preclinical assessment of HIB-vaccine safety was performed on outbred white mice using standard methods including the study of acute and chronic toxicity, pathomorphological, hematological and biochemical investigations.

Results. Technology of producing a frozen-dried drug form of HIB-vaccine was developed. To determine the identity of HIB-vaccine titeric component, an original method based on coagglutination reaction was offered. It was shown that a frozen-dried HIB-vaccine stimulates production of PRP antibodies in rabbits at the level comparable with AKT-HIB and KIMI-HIB vaccines (16,91, 17,19 and 15,28 mkg/ml, respectively). When using AKDS-Hep V+HIB and aAKDS-Hep V+HIB vaccines, a higher level of antibodies to polysaccharide (42,91 and 40,31 mkg/ml), respectively) as compared to monovaccines ($p < 0,05$) was observed. While studying HIB-vaccines in the tests of acute and chronic toxicity, no decrease in animal body mass as well as essential changes in biochemical and hematological indices was stated that proves absence of toxic effects of the drug.

Conclusion. The studied physicochemical properties, sterility, identity, immunogenicity and specific safety showed that a frozen-dried form of synthetic conjugated vaccine for prevention of type *b* hemophilic infection, produced by the developed technology, completely corresponds to the requirements of European Pharmacopeia and can be used as a component of combined vaccines for prevention of diphtheria, tetanus, whooping cough, hepatitis B and hemophilic infection of type *b*.

Key words. Type *b* hemophilic infection, HIB-vaccine, osmolarity, stability, polyribosilribitol phosphate (PRP), preclinical studies, acute toxicity, immunogenicity.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызываемые *Haemophilus influenzae* типа *b* (ХИБ-инфекции), обуславливают тяжелые инвазивные заболевания, среди которых наиболее частыми являются менингит, сепсис, эпиглоттит и пневмония. Гемофильная палочка обладает рекордной устойчивостью к антибиотикам, что делает лечение ХИБ-инфекций крайне затруднительным даже при использовании самых современных и дорогостоящих препаратов [2].

В результате многолетних мультицентровых рандомизированных клинических исследований, проведенных в разных стра-

нах, была доказана эффективность вакцинации в борьбе с ХИБ-инфекциями [5].

В настоящее время в РФ зарегистрированы и разрешены к применению моновакцины на основе капсульного полисахарида ХИБ производства Sanofi Pasteur Inc. и GlaxoSmithKline Biologicals под торговыми марками «АКТ-ХИБ» и «Хиберикс», а также комбинированные вакцины, содержащие ХИБ-компонент: «Инфанрикс Гекса» производства GlaxoSmithKline Biologicals, «Пентаксим» производства Sanofi Pasteur Inc. [2].

Кубинскими исследователями разработана технология получения конъюгата синтетического полирибозилрибитол фосфата (PRP) со столбнячным анатоксином, кото-

рый был использован в производстве жидкой лекарственной формы вакцины для профилактики гемофильной инфекции (Кими-ХИБ) [7].

Цель работы – получение лиофилизированной синтетической конъюгированной вакцины для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b* (ХИБ-вакцины), ее стандартизация и доклиническая оценка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При разработке моновакцины для профилактики гемофильных инфекций использовали синтетический полисахарид (*PRP*), конъюгированный со столбнячным анатоксином (активный фармацевтический ингредиент) производства Центра генной инженерии и биотехнологии «Эбер Биотек», Куба.

Количественное определение полирибозилрибитола фосфата оценивали в тесте «ин витро» колориметрическим методом с использованием орцинолового реактива и коммерческой D-рибозы.

Определение растворимости, потери в массе при высушивании, pH, стерильности проводили согласно Государственной фармакопеи (ГФ XII). Определение пирогенности препарата осуществляли на кроликах в соответствии с требованиями, предъявляемыми Европейской фармакопеей к конъюгированным вакцинам для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b* [1].

Осмолярность раствора ХИБ-вакцины измеряли с помощью полумикроосмометра К-7400, откалиброванного по стандартным калибровочным растворам 0, 200, 400, 800 мОсмол/кг.

За основу дизайна доклинического исследования были взяты рекомендации действующего методического руководства [4]. Изучение препаратов проводилось с соблю-

дением этических правил гуманного отношения к животным. Безопасность оценивали на беспородных мышках. Методы изучения вакцины были стандартными и включали исследование острой и хронической токсичности, патоморфологические, гематологические и биохимические анализы.

Иммуногенную активность ХИБ-вакцины, как монопрепарата, так и в составе комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, гепатита В, коклюша с цельноклеточным (АКДС-Геп В+ХИБ) и бесклеточным (аАКДС-Геп В+ХИБ) компонентами оценивали в опытах на кроликах. Иммунизацию проводили двукратно в вакцинальной дозе 0,5 мл внутримышечно с интервалом 14 суток. Определение антител к полисахариду *H. influenzae* типа *b* в сыворотках крови кроликов осуществляли с помощью тест-системы Rabbit Anti-*Haemophilus influenzae* type *b* IgG ELISA Assay (XpressBio, США), в которой в качестве положительного контроля использовали кроличью сыворотку, откалиброванную нами относительно международного стандарта Anti-Hib Human Reference Serum (NIBSC, 96/536). Кроме того, в сыворотках иммунизированных кроликов титр специфических антител определяли для каждого антигена, входящего в состав комбинированных вакцин, методом иммуноферментного анализа (ИФА): к коклюшным антигенам *Bordetella pertussis*, дифтерийному и столбнячному анатоксинам с помощью тест-систем (НПО «Биомед», г. Пермь); анти-НВс с помощью тест-системы «Микрат Анти-НВс» («Имбио», г. Нижний Новгород).

В качестве препаратов сравнения использовали комбинированную вакцину «Пентаксим» (Sanofi Pasteur Inc., Франция) и моновакцины против ХИБ-инфекции: «АКТ-ХИБ» (Sanofi Pasteur Inc., Франция) и «Кими-Хиб» («ЭберБиотек», Куба).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов описательной статистики. Достоверность разли-

чий между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. В работе применяли пакеты статистических программ MS Excel, DIASTA (МГУ, Россия), программу статистической обработки результатов ИФА методом параллельных линий, программу «Биостат».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В мировой практике для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b* используется лиофилизированная форма конъюгированной вакцины на основе капсульного полисахарида. Данный подход к получению лекарственной формы препарата позволяет избежать деполимеризации конъюгата, которая может иметь место при хранении в водных условиях, а также в присутствии адъювантов на основе гидроксида алюминия [6].

В связи с этим на первом этапе работы нами были проведены эксперименты по разработке состава ХИБ-вакцины и стабилизации синтетического полирибозилрибитола фосфата (PRP), конъюгированного со столбнячным анатоксином, методом лиофилизации.

В качестве вспомогательных веществ для создания стабилизирующей системы для лиофилизации использовали наиболее доступный углевод – сахарозу в концентрации 8,5%, а для создания буферности системы – натрийфосфатные соли.

В результате проведенных исследований был выбран следующий состав одной дозы (0,5 мл) препарата:

– полирибозилрибитола фосфат, конъюгированный;

– со столбнячным анатоксином (АО «ЭберБиотек», Куба) – 10 мкг;

Вспомогательные вещества:

– сахароза (Ph.Eur., ГОСТ 5833–75) – 42,5 мг;

– натрия дигидрофосфат (Ph.Eur., ГОСТ 245–76) – 0,16 мг;

– динатрия гидрофосфат (Ph.Eur., ГОСТ 4172–76) – 0,50 мг.

Отработку процесса лиофилизации осуществляли с учетом его влияния на физические свойства и специфическую активность ХИБ-вакцины. В результате был разработан следующий режим лиофилизации: замораживание препарата при температуре -35 ± 5 °С и выдерживание при этой температуре не менее 8 часов; проведение стадии лиофилизации при глубине вакуума не менее 16 Па, температуре конденсатора не выше -50 °С; досушивание препарата при плюсовых температурах в течение 15 часов. Общая продолжительность процесса сублимации составила 30 ± 4 ч, конечная температура препарата -33 ± 4 °С.

Установлено, что разработанный режим лиофилизации и выбранная концентрация криопротектора (8,5%) обеспечивали сохранение необходимых технологических характеристик лиофилизированной формы ХИБ-вакцины. Все образцы препарата были однородны по внешнему виду и представляли собой аморфную массу белого цвета, легко растворимую при добавлении воды для инъекций. Кроме того, показатель потери в массе при высушивании (остаточная влажность) не превышал 3% во всех исследуемых образцах.

С целью стандартизации разработанной лекарственной формы ХИБ-вакцины нами были отработаны методы контроля в соответствии с рекомендациями Европейской фармакопеи.

Одним из основных требований, предъявляемых Европейской фармакопеей к конъюгированным вакцинам для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b*, является определение специфической активности по содержанию полирибозилрибитола фосфата. В предварительных исследованиях было установлено, что присутствие сахарозы не позволяет достоверно определять количественное содержание PRP. В связи с этим проведены исследования по удалению сахарозы из препарата с использо-

ванием ультрафильтрационных ячеек с двойной вертикальной мембраной (Vivaspin Turbo 15, Sartorius Stedim) и порогом отсечения 30 кДа. Предложенная пробоподготовка позволила полностью освободиться от сахарозы в образцах и использовать колориметрический метод с орцином для оценки подлинности и количественного определения PRP в лиофилизированной форме ХИБ-вакцины.

Для определения подлинности столбнячной составляющей был предложен оригинальный метод, основанный на реакции коагуляции (РКОА) с использованием диагностикума на основе аффинно-очищенных антител кролика против столбнячного анатоксина, сорбированных на белке А инактивированного стафилококка штамма Cowan I. Наблюдения показали, что реакция коагуляции является экспрессным, специфичным и легко выполнимым методом для контроля подлинности столбнячного компонента конъюгированных ХИБ-вакцин [3].

Проведенные валидационные исследования предложенных нами методов контроля подтвердили свою пригодность и возможность включения в нормативную документацию на вакцинные препараты, содержащие лиофилизированную ХИБ-вакцину. В экспериментально-производственных условиях получены три серии лиофилизированной ХИБ-вакцины, результаты изучения которых представлены в табл. 1.

Из представленных данных видно, что разработанный технологический процесс воспроизводим и позволяет получать стандартные препараты, соответствующие требованиям Европейской фармакопеи, предъявляемым к конъюгированным вакцинам для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b*.

К числу важных критериев, определяющих качество препаратов, относится стабильность. Как показали наши наблюдения, разработанная технология обеспечивает получение стабильной ХИБ-вакцины: при хранении не наблюдалось деполимеризации конъюгата полисахарида со столбнячным анатоксином, что подтверждалось определением содержания связанного полисахарида, которое на протяжении наблюдения (максимальный срок 3 года) оставалось в пределах нормы, установленной Европейской фармакопеей (не менее 80% от номинального содержания).

Далее представлялось целесообразным изучить иммуногенные свойства лиофилизированной ХИБ-вакцины (как монопрепарата, так и в составе комбинированных вакцин АКДС-Геп В+ХИБ и аАКДС-Геп В+ХИБ); результаты представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что лиофилизированная ХИБ-вакцина стимулирует выработку антител к полирибозилрибитол фосфату у кроликов на уровне, сопоставимом

Таблица 1

Характеристика экспериментально-производственных серий ХИБ-вакцины

№ серии	Показатели качества по Европейской фармакопее							
	Содержание связанного PRP (не менее 80%)		Содержание свободного PRP (не более 20%)	Специфическая активность, % сероконверсии (не менее 50%)	рН	Потеря в массе при высушивании, % (не более 3%)	Пирогенность, сумма изменений температуры	Осмолярность*, мОсмоль/л (239–376 мОсм/л)
	мкг	%	%					
1	9,4±0,7	94,0±6,8	6,0±6,8	100	6,9	1,4	0,7	268,0±18,0
2	8,8±0,2	88,0±1,6	12,0±1,6	100	6,9	1,5	0,6	300,0±2,0
3	9,9±0,3	99,0±2,8	1,0±2,8	100	7,1	2,1	0,5	293,0±5,0

Примечание: * требование к инъекционным растворам.

Таблица 2

**Иммунный ответ на компоненты вакцин в опытах на кроликах
(средняя геометрическая титра)**

Наименование образца	Средняя геометрическая титра				
	ХИБ-компонент, мкг/мл	Столбнячный компонент, МЕ/мл	Дифтерийный компонент, МЕ/мл	Коклюшный компонент, ИЕ*/мл	Гепатитный, мМЕ/мл
АКТ-ХИБ	17,19 [2,99–97,75]	0,05 [0,01–0,27]	–	–	–
Кими-ХИБ	15,28 [7,29–32,03]	0,04 [0,01–0,19]	–	–	–
ХИБ-вакцина	16,91 [2,05–89,21]	0,04 [0,01–0,12]	–	–	–
АКДС-Геп В+ХИБ	42,91 [2,09–88,07]	11,32 [9,41–12,00]	8,72 [4,29–18,31]	1207,54 [177,52–8111,19]	794,01 [74,23–8348,61]
аАКДС-Геп В+ХИБ	40,31 [15,12–108,01]	14,12 [10,51–19,02]	13,02 [6,81–25,12]	1142,32 [728,71–1790,72]	687,74 [218,12–2168,91]
Пентаксим	34,81 [12,31–98,71]	9,61 [5,82–15,82]	14,32 [9,61–21,41]	142,62 [44,62–455,41]	–

Примечание: * иммуноферментные единицы.

Таблица 3

Изменение массы тела беспородных мышей при изучении острой и хронической токсичности ХИБ-вакцины*

Срок эвтаназии	Опыт (масса тела, г)		Контроль (масса тела, г)
	10 доз	100 доз	Раствор натрия хлорида 0,9%-ный
Острая токсичность			
24 часа	15,93±1,00	15,17±0,91	15,61±0,87
7 суток	19,41±1,04	18,17±1,87	18,81±1,12
14 суток	21,41±1,04	21,32±1,59	20,84±1,15
Хроническая токсичность			
24 часа	22,05±0,62	22,84±1,05	21,41±2,14
7 суток	25,22±1,24	25,56±1,07	25,37±0,78
21 сутки	28,42±1,48	28,98±1,70	29,17±0,58

Примечание: * статистически значимых различий между опытными и контрольной группами не выявлено ($p > 0,05$).

с коммерческими моновакцинами (АКТ-ХИБ и Кими-ХИБ), вызывая минимальный иммунный ответ на столбнячный анатоксин, что отвечает требованиям Европейской фармакопеи, предъявляемым к белкам-носителям конъюгированных вакцин. В случае использования комбинированных вакцин АКДС-Геп В+ХИБ и аАКДС-Геп В+ХИБ наблюдался более высокий уровень антител к полисахариду *H. influenzae* типа *b* по сравнению с моновакцинами ($p < 0,05$), при этом не отмечено снижения гуморального иммунного ответа

на дифтерийный, столбнячный, коклюшный и гепатитный компоненты.

Одним из важнейших этапов оценки новых вакцинных препаратов является анализ их безопасности. В связи с этим целью следующего этапа работы явилось изучение острой и хронической токсичности лиофилизированной синтетической конъюгированной ХИБ-вакцины.

При изучении ХИБ-вакцины в тестах острой и хронической токсичности не наблюдалось снижения массы тела (табл. 3),

гибели животных, изменения поведенческой и двигательной активности. Не было обнаружено патологических, в том числе дистрофических и некробиотических изменений во внутренних органах животных.

Существенных изменений биохимических и гематологических показателей не было выявлено, что свидетельствует об отсутствии токсического действия препарата.

Выводы

Изучение физико-химических свойств, стерильности, подлинности, специфической безопасности и иммуногенности показало, что лиофилизированная форма синтетической конъюгированной вакцины для профилактики гемофильных инфекций типа *b*, полученная по разработанной технологии, полностью соответствует требованиям, предъявляемым Европейской фармакопеей к качеству вакцин.

Проведенные исследования, доказавшие безопасность и эффективность лиофилизированной ХИБ-вакцины в отношении формирования гуморального иммунитета как в моно-, так и в составе комбинированных вакцин, послужили основанием для разработки промышленной технологии ее изготовления и оформления проектов нормативно-технической документации (регламенты производства и фармакопейные статьи предприятия на вакцины АКДС-Геп В+ХИБ и аАКДС-Геп В+ХИБ).

Библиографический список

1. Вакцина для профилактики инфекции, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b*, конъюгированная. Европейская фармакопея 7.0 2011; 1119–1123.
2. Вакцины и вакцинация: национальное руководство / под ред. В. В. Зверева, Б. Ф. Семенова, Р. М. Хаитова. М.: ГЭОТАР-Медиа 2011; 880.
3. Калашиникова Е.А., Николаева А.М., Сперанская В.Н., Соснина О.Ю. Разработка тест-набора для определения дифтерийного, столбнячного и коклюшных антигенов в реакции коагутинации и его экспериментальная оценка. Биопрепараты 2013; 4 (48): 18–23.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты) / под ред. А. Н. Миронова. М.: Гриф и К 2012; II: 536.
5. Plotkin S.A. Vaccines, 6th Edition. Elsevire. Inc. 2013; 3690.
6. Sturgess A. W. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine stability: catalytic depolymerisation of PRP in the presence of aluminum hydroxide. Vaccines 1999; 1169–1178.
7. Verez-Bencomo V. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type *b*. Science 2004; 305: 522–525.

Материал поступил в редакцию 17.01.2013