

ОЦЕНКА ОБЩЕЙ ТОКСИЧНОСТИ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ НОВОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

УДК 616-006.52:615.37

Поступила 1.12.2014 г.



А.Е. Кухаренко, старший научный сотрудник отдела медицинской биотехнологии¹;
А.А. Бабаев, к.б.н., старший научный сотрудник отдела биохимии ЦНИЛ²;
Н.А. Щелчкова, к.б.н., зав. отделом молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ²;
Р.Д. Лапшин, к.б.н., зав. отделом экспериментального моделирования ЦНИЛ²;
М.В. Ведунова, к.б.н., руководитель лаборатории по разработке методов нейропротекции Нижегородского нейронаучного центра НИИ «Институт живых систем»³; старший научный сотрудник отдела биохимии ЦНИЛ²;
И.В. Гравель, д.фарм.-н., профессор, ведущий научный сотрудник НИИ фармации⁴;
И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ²; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова²; профессор кафедры нейродинамики и нейробиологии биологического факультета³;
руководитель лаборатории по изучению фармакологических свойств нейротропных лекарственных средств Нижегородского нейронаучного центра НИИ «Институт живых систем»³;
Л.В. Ловцова, д.м.н., доцент, зав. кафедрой общей и клинической фармакологии²

¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, 117545, 1-й Дорожный проезд, 1;

²Нижегородская государственная медицинская академия, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

³Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Цель исследования — изучить в эксперименте общую токсичность и иммунологическую безопасность новой отечественной терапевтической вакцины против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза при внутримышечном пути введения.

Материалы и методы. Изучены острая токсичность вакцины по параметрам: клиническая картина интоксикации, величина средней смертельной дозы, изменение массы тела выживших животных; хроническая токсичность — по динамике общего состояния животных, массы тела, гематологических и биохимических показателей периферической крови, функционального состояния центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы, почек, а также патоморфологическим изменениям внутренних органов.

Аллергенность исследовали в тестах общей и активной кожной анафилаксии. Иммунотоксичность оценивали по реакциям прямой геммагглютинации и гиперчувствительности замедленного типа, а также по активности нейтрофилов методом люминолзависимой хемилюминесценции. Оценку пролиферативной активности В- и Т-лимфоцитов по отношению к липополисахаридам и конкавалину А (Кона) проводили в реакции прямой иммунофлюоресценции иммуноцитохимическим методом с использованием моноклональных антител против белка Ki-67.

Результаты. Средние смертельные дозы (LD_{50}) для белых аутбредных крыс и мышей при внутримышечном введении исследуемой вакцины в максимально возможной однократной дозе (25 мл/кг) не были достигнуты. Многократное внутримышечное введение препарата белым аутбредным крысам и кроликам породы шиншилла в дозах соответственно 0,043; 0,43; 0,86 мл/кг и 0,023; 0,23; 0,4 мл/кг не вызывает значительных нарушений функционального состояния основных органов и систем организма экспериментальных животных.

Результаты общей анафилактической и активной кожной анафилактической реакций на препарат у морских свинок-альбиносов в дозах 0,033 и 0,33 мл/кг при внутримышечном введении свидетельствуют об отсутствии у него алергизирующих свойств.

При внутримышечном введении вакцины мышам-гибридам первого поколения (CBA×C57BL/6) F_1 в дозах 0,084; 2,5 и 25 мл/кг не наблюдается статистически значимого увеличения или снижения интенсивности воспалительной реакции относительно контрольных значений. В дозах 0,084 и 2,5 мл/кг исследуемый препарат не вызывает изменений титра сывороточных антител (IgG), активности фагоцитоза, спонтанной и индуцированной бласттрансформации лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. Введение препарата в дозе 25 мл/кг статистически значимо снижает уровень антителообразования относительно контроля, а также оказывает супрессивное влияние на спонтанную и индуцированную фагоцитарную активность и приводит к статистически значимому снижению Кона-индуцированной пролиферативной активности Т-лимфоцитов по количеству Ki-67 положительных клеток в сравнении с группой контроля.

Заключение. Исследование у животных различных видов общей токсичности вакцины против рецидивирующего респираторного

Для контактов: Кухаренко Андрей Евгеньевич, e-mail: andrey.kukharenko@gmail.com

папилломатоза и аногенитального кондиломатоза при внутримышечном пути введения показало, что данная вакцина является мало-токсичным препаратом, иммунологически безопасным в диапазоне доз от 0,033 до 2,5 мл/кг.

Ключевые слова: терапевтическая вакцина; вирус папилломы человека; биологическая стандартизация; иммуноотоксичность вакцины.

English

Estimation of General Toxicity and Immunological Safety of a Novel Therapeutic Vaccine Against Human Papillomavirus-Associated Diseases

A.E. Kukhareenko, Senior Researcher, Department of Medical Biotechnology¹;

A.A. Babaev, PhD, Senior Researcher, Department of Biochemistry, Central Scientific Research Laboratory²;

N.A. Shchelchkova, PhD, Head of Department of Molecular and Cell Technologies, Central Scientific Research Laboratory²;

R.D. Lapshin, PhD, Head of Experimental Modeling Department, Central Scientific Research Laboratory²;

M.V. Vedunova, PhD, Head of the Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Institute of Living Systems³;

Senior Researcher, Biochemistry Department, Central Scientific Research Laboratory²;

I.V. Gravel, DSc, Professor, Leading Researcher, Research Institute of Pharmacy⁴;

I.V. Mukhina, DSc, Professor, Head of Central Scientific Research Laboratory²; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov²; Professor, Department of Neurodynamics and Neurobiology, Biological Faculty³; Head of the Laboratory for Pharmacological Properties of Neurotropic Drugs Research, Nizhny Novgorod Neuroscience Centre, Institute of Living Systems³;

L.V. Lovtsova, MD, DSc, Associate Professor, Head of the Department of General and Clinical Pharmacology²

¹Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 1 Pervy Dorozhny pr., Moscow, 117545, Russian Federation;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

³Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

⁴First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, 8, bld. 2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russian Federation

The aim of the investigation was to study in experiment total toxicity and immunological safety of a novel domestic therapeutic vaccine against recurrent respiratory papillomatosis and anogenital condylomatosis, the vaccine injected intramuscularly.

Materials and Methods. We studied acute toxicity of the vaccine by the following parameters: clinical presentation of intoxication, median lethal dose size, the change of body weight of the surviving animals; chronic toxicity — by dynamics of general condition of the animals, body weight, hematological and biochemical indices of peripheral blood, functional status of central nervous system, cardiovascular system, kidneys, as well as pathomorphological changes of viscera.

Allergenicity was studied by systemic and active cutaneous anaphylactic tests. We assessed immunotoxicity by direct hemagglutination assay and a delayed-type hypersensitivity test, as well as by neutrophilic activity using luminal-dependent chemiluminescence. Proliferative activity of B- and T-lymphocytes to lipopolysaccharides and concanavalin A (ConA) was estimated in a direct immunofluorescence test using immunocytochemical assay with anti-Ki-67 monoclonal antibodies.

Results. Mean lethal doses (LD₅₀) were not reached in white outbred rats injected intramuscularly by the tested vaccine at a maximum possible single dose (25 ml/kg). Multi-dose administration to white outbred rats and chinchilla rabbits at doses of 0.043; 0.43; 0.86 ml/kg and 0.023; 0.23; 0.4 ml/kg, respectively, did not cause significant damage of functional status of basal organs and systems of experimental animals.

The findings of systemic anaphylaxis and active cutaneous anaphylactic response to the vaccine in albino guinea pigs at the doses of 0.033 and 0.33 ml/kg intramuscularly indicated the vaccine to exhibit no allergenic properties.

Intramuscular vaccine injected to first filial hybrid mice (CBA×C57BL/6)F₁ at the doses of 0.084; 2.5 and 25 ml/kg showed neither significant increase or decrease of inflammatory response intensity relating to reference values. The vaccine at the doses of 0.084 and 2.5 ml/kg did not cause any changes of vaccination titer (IgG), phagocytic activity, spontaneous or induced blastic transformation of lymphocytes compared to the control group. The vaccine administered at the dose of 25 ml/kg significantly reduced the antibody formation level relating to the controls, as well as produced a suppressive effect on spontaneous and induced phagocytic activity resulting in the significant reduction of ConA-induced proliferative activity of T-lymphocytes by the number of Ki-67 positive cells compared to the control group.

Conclusion. The animal study of different types of general toxicity of the vaccine against recurrent respiratory papillomatosis and anogenital condylomatosis, the vaccine injected intramuscularly, showed the vaccine to be low toxic and immunologically safe in the dose range from 0.033 to 2.5 ml/kg.

Key words: therapeutic vaccine; human papillomavirus; biological standartization; vaccine immunotoxicity.

Вирусы папилломы человека (ВПЧ), типы 6 и 11, относятся к группе вирусов малого онкогенного риска и связаны с развитием таких заболеваний, как аногенитальный кондиломатоз и рецидивирующий респираторный папилломатоз [1, 2]. Действие профилактических вакцин против ВПЧ — Gardasil® (Merck & Co, США) и Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Бельгия) — направлено на создание специфического гуморального иммунитета к капсидным белкам вируса (L-белки), что приводит к предотвращению развития инфекции. Однако на фармацевтическом рынке отсутствуют специфические лекарственные средства, направленные на лечение уже установленной патологии, вызванной ВПЧ [1, 2]. Терапевтические вакцины против ВПЧ-ассоциированных заболеваний должны быть предназначены для специфической иммунотерапии хронической инфекции у пациентов путем активации клеточного звена иммунитета, в частности цитотоксического ответа Т-лимфоцитов [3].

В Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов разработана инновационная терапевтическая вакцина против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза на основе гибридных рекомбинантных белков — онкобелков E7 ВПЧ (типы 6 и 11), сшитых с белками теплового шока 70 *Mycobacterium tuberculosis*. В качестве продуцента для получения целевых рекомбинантных белков используются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* [4].

Выбор раннего онкобелка E7 в качестве мишени обусловлен высокой консервативностью аминокислотной последовательности белка, его ключевой ролью в жизненном цикле вируса и способностью конститутивно экспрессироваться в пораженных вирусом эпителиальных клетках [5]. Белок теплового шока необходим для увеличения иммуногенности рекомбинантного антигена путем активации антигенпрезентирующих клеток и участия в процессинге антигена [6].

В рамках фармацевтической разработки необходимо проводить оценку общей токсичности и иммунологической безопасности разрабатываемого препарата как элементов биологической стандартизации при контроле его качества. Изучение неспецифического влияния разрабатываемого препарата на иммунную систему животных является обязательным разделом в ходе доклинических исследований оригинального лекарственного средства [7, 8]. При этом следует учитывать, что присутствие остаточных количеств белка штамма-продуцента в препарате, а также включение в состав готовой лекарственной формы сорбента алюминия гидроксида как активатора системы врожденного иммунного ответа могут привести к развитию аллергических реакций [8, 9].

Цель исследования — изучить в эксперименте общую токсичность и иммунологическую безопасность новой отечественной терапевтической вакцины против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза при внутримышечном пути введения.

Материалы и методы. Исследование проведено в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), и одобрено Этическим комитетом НижГМА.

Терапевтическая вакцина против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза представляет собой стерильную суспензию для инъекций, которая содержит в прививочной дозе (0,5 мл) гибридные рекомбинантные белки — онкобелок E7 ВПЧ типов 6 и 11 и белок теплового шока 70 *Mycobacterium tuberculosis* (200 мкг), сорбированные на гидроксиде алюминия (не более 1,25 мг алюминия на 1 дозу).

В экспериментах использовались клинически здоровые животные, находившиеся в одинаковых условиях содержания и кормления. Животные получены из филиала «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий РАМН.

Оценку **острой токсичности** препарата выполняли на белых аутбредных мышах и крысах обоего пола, количество животных в каждой группе равнялось 12.

Диапазон испытанных доз составил от 5 до 25 мл/кг, рассчитанных по лекарственной форме. Максимальный объем при внутримышечном введении составил: для мышей — 0,5 мл/20 г массы тела, для крыс — 5,0 мл/200 г. С целью достижения необходимых для введения объемов и в качестве контроля использовали стерильный изотонический раствор натрия хлорида. Описывали клиническую картину интоксикации, развивающуюся в течение 4 ч после однократного введения максимальных доз препарата. Кроме того, на 7-е и 14-е сутки после однократного введения препарата определяли массу тела животных. После окончания эксперимента всех животных выводили из эксперимента помещением в CO₂-камеру и последующим обескровливанием методом декапитации для определения массовых коэффициентов внутренних органов и их патоморфологического исследования.

В исследовании **хронической токсичности** использовали белых аутбредных крыс и кроликов породы шиншилла обоего пола, количество животных в группе составило 20 и 12 соответственно. При выборе доз руководствовались средней терапевтической дозой, в которой изучаемый препарат планируется для клинического применения. Пересчет доз с человека на животных осуществляли по методу эквитерапевтических доз с учетом коэффициента поверхности тела [7]. Исследования проводили при внутримышечном введении крысам в дозах 0,043; 0,43 и 0,86 мл/кг; кроликам — в дозах 0,023; 0,23 и 0,4 мл/кг. Введение препарата в опытных группах и изотонического раствора натрия хлорида в контрольных группах осуществляли через день в течение 90 сут.

Для оценки хронической токсичности регистрировали общее состояние животных, динамику массы тела. На 30, 60, 90-е сутки наблюдения и через 30 сут после отмены препарата оценивали гематологические и

биохимические показатели периферической крови, функциональное состояние центральной нервной и сердечно-сосудистой систем, почек, а также проводили патоморфологическое исследование внутренних органов.

Согласно отечественным рекомендациям, программа исследования иммунологической безопасности включает оценку аллергенности и иммунотоксичности, в том числе гуморального, клеточного и неспецифического иммунного ответа. В соответствии с международными требованиями дополнительно в программу включена оценка пролиферативной активности В- и Т-лимфоцитов к липополисахаридам (ЛПС) и конкавалину А (КонаА) [10].

Определение **аллергенности** проводили на морских свинках-альбиносах обоего пола в тестах общей и активной кожной анафилаксии. Количество животных в каждой группе равнялось 10. В опытных группах вводили исследуемый препарат в эквитерапевтической дозе (0,033 мл/кг) и в дозе, в 10 раз ее превышающей (0,33 мл/кг), внутримышечно, по схеме, описанной в официальном руководстве [7]. В качестве отрицательного контроля использовали стерильный изотонический раствор натрия хлорида, в качестве положительного контроля при оценке общей анафилаксии — 0,6% раствор белка куриного яйца, при оценке активной кожной анафилаксии — 2,4-динитрохлорбензол (2,4-ДНХБ).

Исследование **иммунотоксичности** проводили на мышах обоего пола, гибридах первого поколения (СВА×С57BL/6)F₁, в дозах 0,084; 2,5 и 25 мл/кг. Количество животных в контрольной и опытной группах равнялось 10. **Гуморальный иммунный ответ** оценивали с помощью определения титра сывороточных антител (IgG) в реакции прямой гемагглютинации с Т-зависимым антигеном (эритроцитами барана) [7]. При постановке опыта мышей контрольной и опытной групп иммунизировали эритроцитами барана в количестве $6 \cdot 10^6$ /мл внутривенно. Сыворотку иммунизированных животных опытной группы получали через 7 сут внутримышечного введения препарата в указанных дозах (или изотонического раствора натрия хлорида животным контрольной группы). Затем готовили двукратные разведения в объеме 0,2 мл, начиная с разведения 1:5.

Оценку **клеточного иммунного ответа** выполняли по реакции гиперчувствительности замедленного типа к корпускулярному антигену и гаптену. В опытных группах мышам через 1 ч после введения сенсибилизирующей дозы ($1 \cdot 10^7$ /100 мкл эритроцитов барана) подкожно в межлопаточную область или 0,2 мл 10 мМ раствора 2,4,6-тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС) в основание хвоста, а также в течение последующих 4 сут (ежедневно) вводили препарат в указанных дозах внутримышечно. Контрольным животным вводили стерильный изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,5 мл внутримышечно. Разрешающую дозу антигена — $1 \cdot 10^8$ /20 мкл эритроцитов барана — вводили интраплаттарно на 5-е сутки после сенсибилизации (или 0,02 мл 10 мМ раствора ТНБС на 6-е сутки после сенсибилизации). Учет интенсивности воспалительной реакции осуществляли через 24 ч после введения раз-

решающей дозы антигена путем измерения среднего диаметра отека участка на лапе. Определяли интенсивность воспалительной реакции по разнице между диаметром отека на лапе с введенным антигеном и на лапе с введенным стерильным фосфатным забуференным физиологическим раствором (рН=7,4).

Неспецифический иммунный ответ оценивали по реактивным изменениям нейтрофилов крови, в частности по показателям метаболической активации клеток, фиксируемой методом люминолзависимой хемилюминесценции. Для оценки активности фагоцитов использовали гепаринизированную кровь мышей через 24 ч после однократного внутримышечного введения препарата в указанных дозах. Гепаринизированную кровь разводили в отношении 1:100 раствором Хенкса (без фенолового красного). Для стимуляции хемилюминесценции использовали раствор люминола (Chemrol, Чехия). Результаты регистрировали на хемилюминометре Luminoskan Ascent (Thermo Scientific, Швейцария) при температуре 37°C. Оценку активности фагоцитов осуществляли по параметрам спонтанной и индуцированной фитогемагглютинином (ФГА) хемилюминесценции [11].

О **функциональной активности Т- и В-лимфоцитов**, свидетельствующей о выраженности специфической сенсибилизации организма, судили по реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ): Т-лимфоцитов — с использованием митогена КонаА, В-лимфоцитов — с использованием ЛПС. Оценку пролиферации спленоцитов в РБТЛ проводили с помощью иммуноцитохимического метода с использованием в качестве метки ядерного антигена, выявляемого в реакции прямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител против белка Ki-67 [12]. Препарат в опытных группах вводили в указанных дозах, внутримышечно, в течение 4 сут. Контрольным животным вводили изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,5 мл внутримышечно. Через час после последнего введения животных выводили из эксперимента вышеуказанным способом, извлекали селезенку в стерильных условиях и готовили клеточную суспензию. Селезенки гомогенизировали в 5 мл среды 199 (НПО «Микроген», Россия) с 1% раствором эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Полученные спленоциты дважды отмывали средой 199 с 1% раствором ЭТС. Постановка реакции осуществлялась на модели как индуцированной, так и спонтанной бласттрансформации с моноклональными антителами к Ki-67, мечеными фикоэритрином (Sigma, США), в разведении 1:20. Полученные препараты изучали с помощью флуоресцентного прибора Cell-Q (Carl Zeiss, Германия) с подсчетом количества клеток, имеющих светящиеся фокусы в области ядра, и путем предварительной оценки количества клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии (DM1000, Leica, Германия).

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакета программ Statistica 5.5. Уровень статистической значимости различий между выборками, имеющими распределение, не отличающееся от нормального, определяли с помощью t-критерия Стьюдента; между выборками, имеющи-

ми распределение, отличное от нормального, — с помощью критериев Вилкоксона и Манна–Уитни. Полученные результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

При проведении исследований **острой токсичности** средние смертельные дозы (LD_{50}) для белых аутбредных крыс и мышей (даже при введении максимально возможной однократной дозы 25 мл/кг) не были достигнуты. Это свидетельствует о том, что при однократном внутримышечном введении исследуемый препарат является малотоксичным. При этом животные опытных групп накапливали массу тела в течение всего периода наблюдения. Различий в ее приросте по сравнению с контрольными группами не выявлено (табл. 1). Не зарегистрировано видимых различий в двигательном и пищевом поведении животных, в состоянии внешних покровов и видимых слизистых оболочек, в реакциях на внешние раздражители. По данным морфологических исследований изучаемых органов различий между опытными и контрольными группами животных также не установлено. В месте введения препарата (мышца бедра) не выявлено покраснений, некроза, отека и других изменений тканей.

Результаты изучения **хронической токсичности** исследуемого препарата показали, что его многократное внутримышечное введение в исследуемых дозах не вызывало значительных нарушений функционального состояния основных органов и систем организма. Отмечалось лишь транзиторное статистически значи-

мое повышение массовых коэффициентов тимуса и яичников у животных, получавших длительно препарат в дозе 0,86 мл/кг (для крыс) и 0,4 мл/кг (для кроликов).

Результаты исследования **общей анафилактической реакции** на препарат в дозах 0,033 и 0,33 мл/кг свидетельствовали об отсутствии у него аллергизирующих свойств (табл. 2). По-видимому, это обусловлено тем, что механизм действия исследуемой терапевтической вакцины связан преимущественно со стимуляцией Th1-лимфоцитов, и это объясняет отсутствие развития сильных аллергических реакций при ее введении.

Активная кожная анафилактическая реакция на препарат в исследуемых дозах (0,033 и 0,33 мл/кг) практически отсутствовала как у самок, так и у самцов. Диаметр пятна в опытных группах и группах отрицательного контроля не превышал $0,28 \pm 0,12$ мм на фоне выраженной реакции на 1% раствор 2,4-ДНХБ ($8,32 \pm 0,26$ мм).

Исследования **гуморального иммунного ответа** показали, что препарат в дозах 0,084 и 2,5 мл/кг не вызывает статистически значимых изменений титра сывороточных антител (IgG) ($32,0 \pm 4,2$ и $26,4 \pm 3,9$ соответственно) по сравнению с контрольной группой ($33,6 \pm 5,9$). В дозе 25 мл/кг (0,5 мл на мышь) выявлено статистически значимое снижение антителообразования (титр $19,2 \pm 3,6$) относительно контрольной группы ($33,6 \pm 5,9$; $p=0,045$), что, возможно, обусловлено введением больших доз алюминия гидроксида, входящего в состав препарата.

Изучение влияния исследуемого препарата на **клеточный иммунный ответ** показало, что при его введении во всех группах экспериментальных животных не наблюдалось статистически значимого увеличения или снижения интенсивности воспалительной реакции относительно контрольных значений, что, по-видимому, обусловлено низкой продукцией провоспалительных цитокинов в ответ на введение препарата.

При исследовании **неспецифического иммунного ответа** результаты спонтанной хемилюминесценции продемонстрировали статистически значимое снижение активности фагоцитирующих клеток при воздействии препарата лишь в дозе 25 мл/кг (0,5 мл на мышь) относительно контрольной группы (табл. 3). Результаты индуцированной хемилюминесценции показали, что реактивность нейтрофилов, т.е. способность клеток отвечать на стимулы, также снижалась статистически значимо относительно контрольных значений только на фоне введения препарата в дозе 25 мл/кг (0,5 мл на мышь).

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение препарата в дозах 0,084 и 2,5 мл/кг не воздействует на активность фагоцитоза, а в дозе 25 мл/кг (0,5 мл на мышь) оказывает супрессивное влияние на спонтанную и индуцированную фагоцитарную активность.

Таблица 1

Динамика массы тела крыс и мышей после однократного внутримышечного введения препарата в острых дозах, г ($M \pm m$)

Этап исследования	Контрольные животные (n=12)		Опытные животные (n=12)	
	самцы	самки	самцы	самки
Крысы				
Фон	182,20±2,12	180,70±2,17	185,80±0,98	183,20±0,76
Через 7 сут	193,30±2,47	191,20±2,23	196,20±1,08	193,60±0,79
Через 14 сут	202,20±2,47	200,00±2,28	205,70±0,91	202,90±0,76
Мыши				
Фон	18,70±0,25	18,30±0,17	19,30±0,28	18,30±0,23
Через 7 сут	21,30±0,44	20,50±0,26	21,50±0,28	20,70±0,23
Через 14 сут	23,10±0,37	22,30±0,31	23,60±0,29	22,70±0,24

Таблица 2

Результаты теста на общую анафилактическую реакцию морских свинок в ответ на введение препарата, баллов ($M \pm m$)

Пол животных	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Опытные животные (вакцина, мл/кг)	
			0,033	0,33
Самцы	0	2,20±0,21	0	0
Самки	0	2,40±0,19	0	0

Результаты исследования **функциональной активности Т- и В-лимфоцитов** показали, что введение препарата в дозах 0,084 и 2,5 мл/кг не приводило к статистически значимым изменениям активности спонтанной и индуцированной бласттрансформации спленоцитов по сравнению с контрольной группой (табл. 4). Однако после введения препарата в дозе 25 мл/кг (0,5 мл на мышь) наблюдалось статистически значимое снижение Кона-индуцированной пролиферативной активности по количеству Ki-67 положительных клеток в сравнении с группой контроля, что свидетельствует об уменьшении выраженности специфической сенсибилизации организма при введении препарата в указанной дозе.

Полученные результаты могут быть использованы для получения разрешения на проведение клинических исследований эффективности и безопасности изучаемой терапевтической вакцины.

Заключение. Изучение общей токсичности и иммунологической безопасности новой отечественной вакцины для лечения ВПЧ-ассоциированных заболеваний (рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза) позволяет утверждать, что в отношении общей токсичности препарат является малотоксичным; в отношении иммунологической безопасности — безопасным в диапазоне доз от 0,033 до 2,5 мл/кг (для экспериментальных животных различных видов). Введение препарата в дозе 25 мл/кг оказывает иммуносупрессивное действие на гуморальный иммунный ответ, фагоцитарную активность, а также снижает митогениндуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов.

Финансирование исследования. 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 зукариот».

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Barr E., Sings H.L. Prophylactic HPV vaccines: new interventions for cancer control. *Vaccine* 2008 Nov 18; 26(49): 6244–6257, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.056>.
2. Kahn J.A. Vaccination as a prevention strategy for human papillomavirus-related diseases. *J Adolesc Health* 2005 Dec; 37(6 Suppl): S10–S16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jadoheal.2005.08.018>.
3. Мазитова Л.П., Асламазян Л.К., Намазова Л.С.,

Таблица 3

Показатели спонтанной и ФГА-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов крови мышей на фоне введения препарата, мВ/мин (M±m)

Хемилюминесценция	Контрольные животные (n=10)	Опытные животные (вакцина, мл/кг) (n=10)		
		0,084	2,5	25
Спонтанная	80,6±21,6	99,2±11,9	74,0±25,9	51,4±22,1 p=0,039
ФГА-индуцированная	111,0±4,3	82,5±23,2	119,2±2,7	90,5±3,9 p=0,047

Примечание: p — уровень значимости различий значений с контрольной группой животных.

Таблица 4

Спонтанная и индуцированная бласттрансформация лимфоцитов по количеству Ki-67 положительных клеток, % от количества клеток в поле зрения (M±m)

Бласттрансформация	Контрольные животные (n=10)	Опытные животные (вакцина, мл/кг) (n=10)		
		0,084	2,5	25
Спонтанная	5,22±1,55	5,47±0,82	4,75±0,60	3,04±0,69
ЛПС-индуцированная	4,68±0,73	4,61±0,49	3,53±0,43	3,79±0,66
Кона-индуцированная	7,38±1,17	8,22±1,13	6,72±0,96	3,87±0,67 p=0,01

Примечание: p — уровень значимости различий значений с контрольной группой животных.

Шаипов Т.С. Особенности клинического течения, диагностика и подходы к терапии папилломавирусной инфекции в детском возрасте. *Педиатрическая фармакология* 2006; 3(6): 51–54.

4. Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Губайдуллин И.И., Ефремов Б.Д., Тюрин О.В., Залуниин И.А. Способ получения белка E7-HSP70 и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для его осуществления. Патент РФ 2489481. 2013.

5. Chu N.R., Wu H.B., Wu T., Boux L.J., Siegel M.I., Mizzen L.A. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) HSP65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* 2000 Aug; 121(2): 216–225, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01293.x>.

6. Chu N.R. Therapeutic vaccination for the treatment of mucosotropic human papillomavirus-associated disease. *Expert Opin Biol Ther* 2003 Jun; 3(3): 477–486, <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.3.3.477>.

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. Миронина А.Н. М: Гриф и К; 2012; 944 с.

8. ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002828.pdf.

9. Ураков А.Л. Основы клинической фармакологии. Ижевск: Ижевский полиграфкомбинат; 1997; 164 с.

10. Note for guidance on repeated dose toxicity. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003102.pdf.

11. Allen R.C. Chemiluminescence and the study of phagocyte redox metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1982; 141: 411–421, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-8088-7_39.

12. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983 Jan 15; 31(1): 13–20, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910310104>.

References

1. Barr E., Singh H.L. Prophylactic HPV vaccines: new interventions for cancer control. *Vaccine* 2008 Nov 18; 26(49): 6244–6257, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.056>.

2. Kahn J.A. Vaccination as a prevention strategy for human papillomavirus-related diseases. *J Adolesc Health* 2005 Dec; 37(6 Suppl): S10–S16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jadohealth.2005.08.018>.

3. Mazitova L.P., Aslamazian L.K., Namazova L.S., Shaipov T.S. Peculiarities of clinical treatment, diagnostics and approaches to papilloma viral therapy in childhood. *Pediatricheskaya farmakologiya* 2006; 3(6): 51–54.

4. Kozlov D.G., Cheperegin S.E., Gubaydullin I.I., Efremov B.D., Tyurin O.V., Zalunin I.A. *Sposob polucheniya belka E7-HSP70 i shtamm drozhzhey Saccharomyces cerevisiae dlya ego osushchestvleniya* [Method for E7-HSP70 production, and *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain for its implementation]. Patent RF 2489481. 2013.

5. Chu N.R., Wu H.B., Wu T., Boux L.J., Siegel M.I., Mizzen L.A. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) HSP65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* 2000 Aug; 121(2): 216–225, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01293.x>.

6. Chu N.R. Therapeutic vaccination for the treatment of mucosotropic human papillomavirus-associated disease. *Expert Opin Biol Ther* 2003 Jun; 3(3): 477–486, <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.3.3.477>.

7. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*. Ch. 1 [Manual on conducting preclinical drug trials. Part 1]. Pod red. Mironova A.N. [Mironov A.N. (editor)]. Moscow: Grif i K; 2012; 944 p.

8. ICH guideline S6 (R1) — preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002828.pdf.

9. Ураков А.Л. *Osnovy klinicheskoy farmakologii* [Basic clinical pharmacology]. Izhevsk: Izhevskiy poligrafkombinat; 1997; 164 p.

10. Note for guidance on repeated dose toxicity. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003102.pdf.

11. Allen R.C. Chemiluminescence and the study of phagocyte redox metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1982; 141: 411–421, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-8088-7_39.

12. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983 Jan 15; 31(1): 13–20, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910310104>.