

УДК 616-002.5:615.371:615.453.5

**ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРООБРАЗУЮЩИХ И ПРОТЕКТИВНЫХ  
КОМПОНЕНТОВ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ  
РЕКОМБИНАНТОГО ВИРУСА ГРИППА TB FLU ESAT6 2A  
AG85A В ПРОЦЕССЕ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ФОРМЫ  
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА**

<sup>1</sup>Далбаев Н.К., <sup>1</sup>Жилин Е.С., <sup>1</sup>Кайсенов Д.Н., <sup>1</sup>Баракбаев К.Б., <sup>1</sup>Сансызбай А.Р.,  
<sup>2</sup>Шурыгина А.-П.С., <sup>2</sup>Макарьев М.А., <sup>2</sup>Никонов Б.А.

<sup>1</sup>НИИ проблем биологической безопасности (НИИПББ),  
пгт. Гвардейский, e-mail: dnk-63@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail: borisnikonov@yandex.ru

Проводились исследования по сохранению рекомбинантного вируса гриппа TB FLU Esat6 2A Ag85A в процессе приготовления и хранения экспериментальных образцов таблетированной формы вакцины против туберкулеза для сублингвального применения. Готовые таблетки получали непосредственно лиофилизацией полуфабриката, содержащего структурообразующие и защитные компоненты, а также сублимацией полуфабриката, содержащего протективные компоненты с последующим измельчением, добавлением вспомогательных веществ и прессованием. Приемлемыми характеристиками, необходимыми для приготовления таблетированной формы вакцины обладали препараты, полученные методом прямого прессования. По результатам экспериментов выбрана оптимальная композиция, использование которой позволяет минимизировать потери вируса в процессе приготовления и хранения при испытанных температурно-временных режимах.

**Ключевые слова:** туберкулез, лиофилизация, прессование, таблетки

**INFLUENCE OF STRUCTURE-FORMING AND PROTECTIVE COMPONENTS ON  
BIOLOGICAL ACTIVITY OF RECOMBINANT INFLUENZA VIRUS TB-FLU TB FLU  
ESAT6 2A AG85A IN THE PREPARATION AND STORAGE OF EXPERIMENTAL  
SAMPLES OF TABLET FORM OF VACCINE AGAINST TUBERCULOSIS**

<sup>1</sup>Dalbayev N.K., <sup>1</sup>Zhilin Y.S., <sup>1</sup>Kaissenov D.N., <sup>1</sup>Barakbayev K.B., <sup>1</sup>Sansyzybay A.R.,  
<sup>2</sup>Shurygina A.-P.S., <sup>2</sup>Makaryev M.A., <sup>2</sup>Nikonov B.A.

<sup>1</sup>Research Institute for biological safety problems (RIBSP), Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan,  
e-mail: dnk-63@mail.ru;

<sup>2</sup>FSI «Research Institute of Influenza» of Ministry of Health of Russian Federation, Saint Petersburg,  
e-mail: borisnikonov@yandex.ru

The article presents the results of research on the preservation of recombinant influenza virus TB FLU Esat6 2A Ag85A in the preparation process and storage of experimental samples of tablet form of vaccine against tuberculosis using two methods, as well as various compositions of structure-forming and safety components of the preparation. The suitable characteristics, necessary for tablet forms of vaccine preparations were preparations, obtained by direct pressing. The optimal composition is selected by the results of the experiments, the use of which minimizes the loss of virus during the preparation and storage at tested time-temperature conditions.

**Keywords:** tuberculosis, lyophilization, pressing, tablets

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), ежегодно в мире туберкулезом (ТВ) заболевают 8,8 млн. человек, около 3 млн. погибают [7].

Основной критерий наличия эпидемии ТВ в стране – выявление 50 случаев заболевания на 100 тысяч населения в год. В мировом масштабе, по статистике ВОЗ, по количеству больных ТВ Республика Казахстан (РК) занимает 33-е место среди 212 стран мира и 4-е место в Европейском регионе и входит в число стран с высоким бременем туберкулеза [10]. Несмотря на то, что заболеваемость населения в Казахстане ТВ в 2012 году по сравнению с 2011 в це-

лом по стране снизилась на 5,8% – с 86,6 до 82,7 на 100 тыс. населения, данная проблема остается актуальной и трудноразрешимой [5].

Основной мерой борьбы и профилактики распространения данной инфекции является иммунизация вакцинами, изготовленными на основе производных штамма БЦЖ Мусобacterium bovis Pasteur, полученного еще в 1921 г. Ввиду несостоятельности вакцин БЦЖ против отдельных форм туберкулеза, большим количеством осложнений, связанных с вакцинацией данным типом препаратов требуется разработка новых препаратов, лишённых указанных недостат-

ков. Одним из перспективных направлений при создании эффективных и безопасных противотуберкулезных препаратов нового поколения является разработка векторных вакцин, экспрессирующих протективные антигены ТВ.

Продемонстрирована способность векторов вируса гриппа NS-ESAT-6 в инициации специфического Th1 иммунного ответа у мышей. Более того, интраназальная иммунизация мышей и морских свинок данным препаратом векторов индуцировала защиту от микобактериального заражения, подобную индуцированной вакцинацией БЦЖ. Также выявлено, что данная конструкция позволяет не только создать дополнительный стимул для иммунной системы при сублингвальной вакцинации, но и обеспечивает эффективное проникновение антигена и активаторов в организм через эпителий слизистой оболочки ротовой полости [8, 9].

Данный тип иммунизации возможно проводить как жидкими формами препаратов (готовые, ресуспендированные), так и таблетированными. Для создания твердых дозированных лекарственных форм применяют следующие технологические приемы: а) прессование предварительно подготовленных гранул, б) прямое прессование. Последний метод благодаря своей экономичности становится более актуальным по сравнению с процедурой влажной грануляции, т.к. прессование предварительно подготовленных гранул требует реализации дополнительных стадий [3,1]. Для прямого прессования применяют более 500 наименований различных вспомогательных веществ (ВВ), большая часть из них включена в национальные и межнациональные фармакопеи (Eur.Ph., Br.Ph., USP, JP) [4,6].

В рамках республиканской научно-технической программы «Разработка вакцины против туберкулеза для здравоохранения Республики Казахстан» в НИИПББ был получен рекомбинантный штамм вируса гриппа ТВ FLU Esat6 2A Ag85A, экспрессирующий соответствующие протективные белки ТВ. Целью проведенных исследований являлось изучение влияния структурообразующих, защитных и вспомогательных веществ на качество и стабильность таблетированных форм рекомбинантной векторной вакцины для сублингвального применения.

#### Материалы и методы исследований

В работе был использован рекомбинантный штамм вируса ТВ FLU Esat6 2A Ag85A, репродуцирующийся в культуре клеток Vero с использованием бессывороточной среды Opti Pro SFM (Invitrogen). В качестве структурообразователей, стабилизаторов и вспомогательных веществ применяли: агар-агар, пектин цитрусовый, D-сорбит, желатин пищевой,

сахароза, лактоза, гидролизат лактальбумина (ГЛА), D-маннит, аэросил А-380, поливинилпирролидон (ПВП)-К25, тальк (ФС42-0066-01), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ, ФС 42-3728-99), полигликолин (М.м. 50000-70000 Д), аминоксол, SPGN-буфер.

При получении таблетированных форм вакцины против ТВ использовали два метода. В первом случае готовые таблетки получали непосредственно путем лиофилизации. При этом вирусосодержащую культуральную жидкость (ВКЖ) смешивали с различными защитными веществами, в полученный таким образом полуфабрикат (ПФ) добавляли структурообразующие компоненты, разливали по 1,5 мл в алюминиевые колпачки для флаконов ФО-10 и лиофилировали с целью получения готовых таблеток.

Во втором варианте для получения таблеток использовали метод прямого прессования. В качестве стабилизатора использовали 20%-й раствор лактозы, который смешивали с ВКЖ в соотношении 1:1. ПФ разливали в кассеты размером 10×20 см и подвергали сублимационному высушиванию, после чего измельчали в фарфорой ступке. В измельченный лиофилизат вносили ВВ в соотношении 1:1, тщательно перемешивали и получали таблетки методом прямого прессования с использованием пресса гидравлического ручного CARVER (США) при давлении 150 кг/см<sup>2</sup>.

Лиофилизацию в обоих случаях проводили на установке для лиофильной сушки Usifroid (Франция) при ранее отработанном режиме: температура полки – минус 55°C, время заморозки – 10 час, конденсатор – минус 64°C, общее время сушки – 35 час, досушивание при плюс 30°C 3 час.

С целью изучения стабильности препаратов образцы закладывали на хранение при различных температурно-временных режимах. Изучение биологической активности исходной ВКЖ и ТЖ, а также полученных образцов вакцины и стабильность их при хранении определяли общепринятым методом титрования на культуре клеток Vero путем последовательного десятикратного разведения в трехкратной повторности.

Учет результатов титрования на культуре клеток Vero проводили по результатам цитопатического действия вируса (ЦПД). Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lg ТИД<sub>50</sub>/мл (ВКЖ) или в lg ТИД<sub>50</sub>/г (лиофилизат, готовые таблетки).

Остаточную влажность вакцины определяли по ГОСТ 24061.

Показатели распадаемости и прочности таблеток определяли по методикам, приведенных в соответствующих разделах ГФ РК [2].

Органолептическую оценку внешнего вида таблеток проводили на основании осмотра таблеток невооруженным глазом.

#### Результаты исследования и их обсуждение

В первой серии исследований проводили изучение способности структурообразующих компонентов создавать матрицу таблетки. Для приготовления таблетированной формы в качестве структурообразователя использовали агар-агар и пектин, обладающие способностью создавать матрицу таблетки после лиофилизации. В це-

лях экономии, вирусную часть моделировали SPGN-буфером, в который добавляли структурообразующие и стабилизирующие компоненты, после чего сублимировали.

Внешний вид полученных таблеток, состав структурообразующих и защитных веществ, использованных

в процессе приготовления модельных таблетированных форм вакцины, органолептическая оценка препарата, а также результаты определения их распадаемости в воде представлены на рис. 1 и в табл. 1 (номера вариантов на рис. 1 и табл. 1 аналогичны).

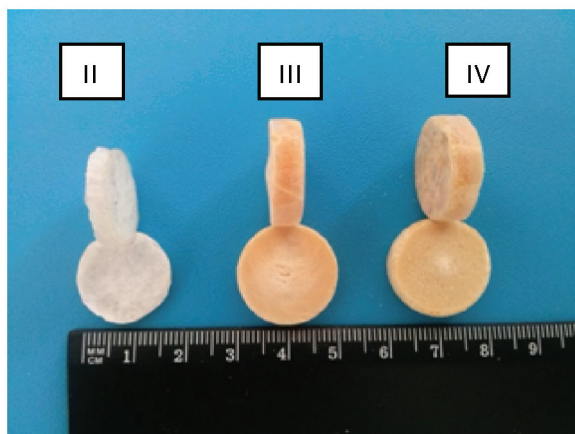


Рис. 1. Модельные образцы таблеток, полученные методом лиофилизации

Таблица 1

Результаты определения параметров качества таблеток, полученных методом лиофилизации

№ п/п	Компоненты	Концентрация, %	Органолептическая оценка		Остаточная влажность, %	Распадаемость, мин
			вид	структура		
I	агар-агар сахароза маннит	0,25 25,0 25,0	аморфный	желеобразная	12,0±0,50	более 30
II	агар-агар сахароза маннит	0,5 25,0 25,0	однородный	плотная	2,95±0,07	менее 30
III	ГЛА сахароза пектин	20,0 40,0 4,0	однородный	рыхлая	2,5±0,05	менее 1
IV	ГЛА сахароза пектин	20,0 40,0 2,0	однородный	рыхлая	2,2±0,03	менее 1

Как видно из данных, представленных в табл. 1, при использовании вариантов III и IV получены таблетки с неудовлетворительными характеристиками по структуре (рыхлая) и растворимости (менее 1 мин). Таблетки полученные на основе состава I имели желеобразную консистенцию и повышенную остаточную влажность (12,0%). Таким образом, оптимальным выглядело использование варианта II (агар-агар, сахароза и маннит в концентрациях 0,5%, 25,0% и 25,0%, соответственно).

Для изучения влияния структурообразующих и защитных компонентов композиции II на сохранение титра рекомбинантного вируса TB FLU Esat6 2A Ag85A в процессе сублимации, а также с целью изучения оптимального состава таблетированной формы препарата по физическим параметрам, было осуществлено высушивание двух экспериментальных серий вакцинной жидкости, различных по исходной биологической активности. Результаты испытаний отражены в табл. 2.

Таблица 2

Физические и биологические свойства таблеток, полученных лиофилизацией

№ опыта	Биологическая активность, lg ТИД <sub>50</sub> /мл		Органолептические показатели		Распадаемость, мин
	до сушки	после сушки	вид	структура	
1	7,06 ± 0,08	4,89 ± 0,17	однородный	плотная	до 30
2	8,10 ± 0,13	5,02 ± 0,17	однородный	плотная	до 30

Полученные данные свидетельствуют о значительном снижении (на 2-3 порядка) биологической активности в образцах вакцины после высушивания. Существенные расхождения между показателями в первом и втором опытах можно объяснить эффектом агрегации частиц вируса полимерным материалом, что может внести большую погрешность в показатели биологической активности высушенного препарата.

Исходя из полученных данных, в последующих экспериментах провели поиск альтернативного структурообразующего компонента. С этой целью, наряду с применением агар-агара, дополнительно использовали желатин и провели сравнительную оценку по результатам сохраняемости биологической активности в процессе лиофилизации и стабильности готовых таблеток при температуре плюс 4°C в течение 2 и 6 мес. Составы композиций и результаты полученных данных представлены в табл. 3.

Таблица 3

Влияние структурообразующих компонентов на биологические свойства таблетированной формы вакцины

№ п/п	Состав композиции	%	Биологическая активность			
			lg ТИД <sub>50</sub> /мл	lg ТИД <sub>50</sub> /г		
				Исходная ТЖ	Готовая таблетка	Хранение при +4°C, (мес.)
			2			6
I	агар-агар сахароза маннит	0,5 25,0 25,0	8,0 ± 0,13	6,6 ± 0,08	6,4 ± 0,17	5,2 ± 0,08
II	желатин сахароза маннит	3,5 25,0 25,0	8,0 ± 0,13	7,6 ± 0,17	7,5 ± 0,13	6,5 ± 0,08

Анализ изучения биологической активности вируса показал, что полученные таблетированные образцы вакцины имели титры вируса: композиция с агаром – 6,6 lg ТИД<sub>50</sub>/г; композиция с желатином – 7,6 lg ТИД<sub>50</sub>/г, т.е. снижение биологической активности вируса составило 1,4 lg ТИД<sub>50</sub>/г и 0,4 ТИД<sub>50</sub>/г, соответственно. Потери активности вируса после хранения при плюс 4°C были сопоставимыми при использовании первого и второго компонентного

составов и составили 0,2 lg и 0,1 lg после 2 мес хранения, 1,3 lg и 1,1 lg после 6 мес хранения, соответственно.

На следующем этапе исследований изучали возможность получения таблеток методом прямого прессования. Внешний вид готовых таблеток, полученных прямым прессованием, представлен на рис. 2. Состав ВВ, их концентрация, органолептические и физико-химические характеристики таблеток приведены в табл. 4.

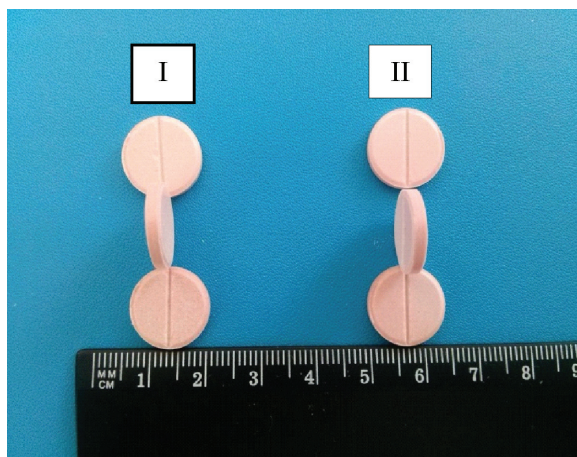


Рис. 2. Внешний вид таблеток, содержащих рекомбинантный вирус TB FLU Esat6 2A Ag85A

**Таблица 4**

Органолептические и физико-химические характеристики таблеток, полученных методом прямого прессования

Вариант	ВВ	Концентрация, %	Органолептические показатели		Физические свойства	
			Внешний вид	Структура	Распадаемость, мин	Прочность (Ньютон)
I	Лактоза Сахароза Стеарат Mg Аэросил	88,0 10,0 1,0 1,0	однородный	плотная	до 15	5,69±0,015
II	Крахмал МКЦ ПВП K25 Стеарат Mg Аэросил	44,7 49,8 3,5 1,0 1,0	однородный	плотная	до 15	7,82±0,012

Как следует из данных, представленных в таблице 4, внешний вид таблеток однородный, структура – плотная. механическая прочность составила 6,63 Ньютона (вариант I) и 7,82 Ньютона (вариант II), распадаемость таблеток в воде – до 15 мин.

Параллельно изучали влияние протективных компонентов в процессе высушивания и внесение ВВ при последующем прессовании на биологическую активность рекомбинантного вируса гриппа в конечном продукте. Данные проведенных исследований приведены в табл. 5.

**Таблица 5**

Результаты изучения биологической активности вируса в процессе лиофилизации и прессования, содержащих рекомбинантный штамм TB FLU Esat6 2A Ag85A

Вариант	ВВ	Биологическая активность		
		lg ТИД <sub>50</sub> /мл ТЖ	lg ТИД <sub>50</sub> /г	
			Лиофилизат	Таблетка
I	Лактоза Сахароза Стеарат Mg Аэросил	8,08±0,07	7,50±0,12	6,83±0,07
II	Крахмал МКЦ ПВП K25 Стеарат Mg Аэросил	8,08±0,07	7,50±0,12	6,75±0,18

Данные табл. 5 свидетельствуют о том, что падение биологической активности вируса после лиофилизации составило 0,58 lg, а после прессования таблетной массы дополнительно на 0,67 lg (вариант I) и 0,75 lg (вариант II). Указанное снижение биологической активности рекомбинантного вируса можно объяснить тем, что таблетки на 50 % состоят из ВВ.

Окончательный выбор ВВ для прямого прессования с целью получения таблетированных форм противотуберкулезной вакцины проводили по результатам изучения сохраняемости биологической активности рекомбинантного вируса при плюс 4°C. Данные проведенных исследований представлены в табл. 6.

**Таблица 6**

Стабильность прессованных таблеток, содержащих рекомбинантный штамм TB FLU Esat6 2A Ag85A при плюс 4°C

Вариант	ВВ	Биологическая активность, ТИД <sub>50</sub> /г после хранения при плюс 4°C (мес.)		
		исходная	2	6
I-A	Лактоза Сахароза Стеарат Mg Аэросил	7,62±0,08	7,53±0,08	6,95±0,14
I-B	Крахмал МКЦ ПВП K25 Стеарат Mg Аэросил	7,70±0,00	7,48±0,12	6,20±0,12

Данные таблицы свидетельствуют о том, что композиция ВВ, содержащая лактозу, сахарозу, стеарат Mg и аэросил способствует лучшей сохраняемости вируса, так при ее использовании снижение биологической активности после 6 мес хранения составило 0,67 lg ТИД<sub>50</sub>/мл, тогда, как при внесении композиции I-B отмечено снижение на 1,50 lg ТИД<sub>50</sub>/мл.

**Обсуждение результатов.** Изучение возможности получения таблетированных форм вакцины методом сублимации без прессования показало, что при данном методе необходимо введение в вирусосодержащую суспензию структурообразующего компонента, образующего матрицу таблетки. С этой целью использовали агар-агар, пектин и желатин в различных концентрациях. В качестве защитных добавок применяли сахарозу, маннит, ГЛА. В ходе проведенных экспериментов установлено, что удовлетворительные органолептические свойства и показатели распадаемости таблеток получены при использовании таких структурообразователей, как агар-агар (0,5 %) и желатин (3,5 %) с добавлением в обоих случаях аналогичных протекторов – сахарозы (25 %) и маннита (25 %).

При анализе биологической активности вируса в образцах вакцины, полученных с данными композициями, получены следующие результаты: с использованием агар-агара – 6,6 lg ТИД<sub>50</sub>/г, с желатином – 7,6 lg ТИД<sub>50</sub>/г. Изучение стабильности пригото-

вленных таблеток при плюс 4°C показало, что потери биологической активности вируса в обоих случаях сопоставимы. Существенным фактором является значительное упрощение технологического процесса при использовании желатина, что позволяет считать приемлемым использование состава с включением в качестве структурообразователя желатина с использованием защитных компонентов (сахароза, маннит) обеспечивает более высокую сохраняемость вируса, как при высушивании, так и при хранении.

Таким образом, при выборе протективных сред и структурообразующих компонентов для приготовления таблетированной противотуберкулезной формы вакцины, полученной методом сублимации без прессования, оптимальной является композиция, содержащая желатин –3,5 %, сахарозу и маннит по 25 %. Данный состав обеспечивает более высокую сохраняемость биологической активности вируса в таблетках после их высушивания и последующего хранения при плюс 4°C (снижение биологической активности в течение 6 мес. составило 1,1 lg).

При анализе данных, полученных в процессе таблетирования методом прямого прессования, установлена достаточно высокая эффективность использования 20%-го раствора лактозы, как защитного компонента на стадии лиофилизации и внесения на конечном этапе в соотношении 1:1 комбина-

ции следующих вспомогательных веществ: лактоза – 88,0%, сахароза – 10,0%, стеарат магния – 1,0%, аэросил – 1,0%. Указанная пропись способствует получению таблеток с приемлемыми органолептическими, физико-химическими и биологическими свойствами, стабильными в процессе хранения при плюс 4 °С (снижение биологической активности в течение 6 мес составило 0,67 lg). Вероятно, что это связано с высоким процентным содержанием углеводов в данном составе.

### Заключение

В результате проведенных исследований установлено: при получении таблеток без прессования, содержащих рекомбинантный вирус гриппа ТВ FLU Esat6 2A Ag85A, оптимальным структурообразующим и защитным компонентом является композиция, содержащая желатин, сахарозу и маннит; при изготовлении таблетированной формы препарата методом прямого прессования оптимальные результаты получены при использовании лактозы на стадии лиофилизации и таких вспомогательных веществ, как лактоза, сахароза, стеарат Mg и аэросил на стадии прессования.

В таблетках, полученных методом прямого прессования, сохраняемость биологической активности рекомбинантного вируса в условиях хранения при плюс 4 °С в течение 6 мес выше, чем в препаратах, изготовленных методом сублимации без прессования, что позволяет рекомендовать данный

метод как способ получения таблетированной формы противотуберкулезной вакцины, содержащей рекомбинантный вирус гриппа, экспрессирующий протективные микобактериальные антигены ESAT-6 и Ag-85A.

### Список литературы

1. Алексеев К.В. Технологические аспекты производства современных твердых лекарственных форм // Производство лекарств по GMP // Изд. «Медицинский бизнес». М. – 2005. – С. 165–176. Медицинский бизнес. 2005. С. 165–176.
2. Государственная фармакопея республики Казахстан. Первое издание. – Астана, 2008. – С. 249, 548.
3. Корягин Д.А. Эволюция технологии производства твердых лекарственных форм за последние 20 лет // Производство лекарств по GMR. – М., 2005. – С. 183–187.
4. Кузнецов А.В. Разработка метода оптимизации выбора вспомогательных веществ при таблетировании прямым прессованием // Фармация. – 2002. – № 2. – С. 21–23.
5. Пресс-конференция по итогам республиканского месячника по профилактике туберкулеза и Всемирного дня борьбы с туберкулезом. Источник: Казинформ 3.03.2013.
6. Сульдин А.С. и др. Сравнительное изучение вспомогательных веществ, применяемых при таблетировании методом прямого прессования // VIII Международный конгресс молодых ученых «Науки о человеке»: сборник материалов: – Томск. – 2007. – С. 238–240.
7. Global tuberculosis control: WHO report 2011.
8. Rowland R., McShane H. Tuberculosis vaccines in clinical trials // Expert Rev. Vaccines – 2011. – V.10. – P. 645–658.
9. Sereinig S., Stukova M., Zabolotnyh N. [et al.] Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. Clin Vaccine Immunol. 2006 Aug;13(8):898–904.
10. Global tuberculosis report. 2012 Annex. – URL: [www.who.int/tb/data](http://www.who.int/tb/data).