

БЕЛКИ-НОСИТЕЛИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОНЬЮГИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Использование альтернативных белков-носителей, методов производства и испытаний приемлемо при условии, что они были разрешены уполномоченным органом.

Бактериальные полисахариды не способны индуцировать зависимый от Т-клеток иммунный ответ В-клеток, необходимый для ответной реакции иммунологической памяти, и, как правило, имеют слабую иммуногенность у детей в возрасте до двух лет. Данное ограничение преодолевается конъюгированием полисахаридов с белками-носителями. Высоко иммуногенные белки-носители, конъюгированные с бактериальными полисахаридами, увеличивают способность полисахаридов вызывать защитную ответную реакцию у младенцев.

В настоящее время в качестве белков-носителей, в полисахаридных вакцинах используют: анатоксины, нетоксичные мутантные токсины, оболочки или поверхностные мембранные белки, выделенные из микроорганизмов. Микроорганизмы, используемые при производстве белков, могут иметь генетически модифицированное происхождение.

Метод производства, используемый для белков-носителей, должен обеспечивать постоянство производства серий белков-носителей, подходящих для конъюгации с полисахаридными антигенами.

Перед конъюгацией с полисахаридом могут быть установлены соответствующие критерии приемлемости низкой бионагрузки. Обязательным условием является фильтрация белка-носителя перед хранением через фильтр, задерживающий бактерии, и принятие соответствующих мер для предотвращения контаминации и роста микроорганизмов во время хранения.

Производство белков-носителей основывается на системе посевного материала. Должно быть подтверждено отсутствие контаминации посевного материала с использованием подходящего метода с соответствующей чувствительностью. Культура клеток может быть инактивирована, белки-носители очищают подходящим методом.

Белки характеризуют одним или более подходящими методами (например, электрофорез в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом, изоэлектрическое фокусирование, высокоэффективная жидкостная хроматография, эксклюзионная хроматография/гель-хроматография с детекцией многоугольного лазерного рассеивания, аминокислотный анализ, аминокислотное секвенирование, круговой дихроизм, флуоресцентная спектрометрия,

пептидное картирование и масс-спектрометрия). Чистоту белков подтверждают подходящим методом. Для подтверждения, что продукт не содержит специфических токсинов, где это применимо, выполняют соответствующее испытание в процессе валидации или рутинного анализа. В случае проведения этапа очистки проводят мониторинг удаления отдельных производственных примесей и остатков для подтверждения постоянства процесса очистки. В случае использования рекомбинантных белков-носителей выполняют испытания, как минимум, для следующих примесей:

- остаточные белки клеток-хозяев, включая белковые остатки экспрессионного вектора;
- остаточная ДНК клетки-хозяина.

Для приготовления конъюгатов могут быть использованы только белки-носители, выдерживающие следующие испытания.

Идентификация. Для подтверждения подлинности белка-носителя используют подходящий метод.

pH (2.1.2.3). Где применимо, проводят испытание белка-носителя до конъюгирования на соответствие пределам, одобренным уполномоченным органом для конкретного препарата.

Содержание белка. Содержание белка-носителя определяют с использованием подходящего метода на соответствие пределам одобренным, уполномоченным органом.

Бактериальные эндотоксины (2.1.6.8). Содержание бактериальных эндотоксинов определяют на соответствие пределам, одобренным уполномоченным органом для конкретного препарата.

Кроме того, к белкам-носителям применяют следующие требования.

Дифтерийный анатоксин. Дифтерийный анатоксин, произведенный как описано в частной фармакопейной статье на вакцину для профилактики дифтерии адсорбированную, должен выдерживать требования указанной частной фармакопейной статьи для нерасфасованного очищенного анатоксина, за исключением испытания на стерильность.

Столбнячный анатоксин. Столбнячный анатоксин, произведенный как описано в частной фармакопейной статье на вакцину для профилактики столбняка адсорбированную, должен выдерживать требования указанной частной фармакопейной статьи для нерасфасованного очищенного анатоксина, за исключением того, что антигенная чистота допускается не менее 1500 Lf на миллиграмм белкового азота, и испытание на стерильность не требуется.

Дифтерийный белок CRM 197. Дифтерийный белок CRM 197 производят при культивировании генетически модифицированных (C7/β197) или генетически не модифицированных (mCRM) микроорганизмов *Corynebacterium diphtheriae*, или производят с помощью технологии рекомбинантных ДНК в таких микроорганизмах, как *Escherichia coli*. Супернатант культуры клеток может быть сконцентрирован ультрафильтрацией и очищен путем последовательных стадий осаждения, фильтрации и хроматографирования. В случае, когда дифтерийный белок CRM 197 производится на той же производственной площадке, что и дифтерийный токсин, он должен иметь отличия от активного токсина, четко определяемые подходящим методом. Чистота дифтерийного белка CRM 197 должна быть не менее 90 %.

Поверхностный мембранный белковый комплекс *Neisseria meningitidis* группы В. Поверхностный мембранный белковый комплекс *Neisseria meningitidis* группы В выделяют из бактериальной клеточной культуры с использованием буферного раствора, содержащего детергент. Первым удаляют клеточный дебрис. Мембранный белковый комплекс может быть сконцентрирован и очищен последовательно фильтрацией и дополнительными подходящими стадиями очистки. Содержание липополисахаридов не должно превышать 8 %. Относительное количество основных поверхностных мембранных белков должно быть утверждено уполномоченным органом. Поверхностный мембранный белковый комплекс должен выдерживать испытание на пирогенность (2.1.6.2): каждому кролику вводят по 0,25 мкг поверхностных мембранных белков на килограмм массы тела.

Рекомбинантный белок D. Белок D – поверхностный белок нетипичной *Haemophilus influenzae*. Его производят, используя специфический штамм *E. coli*, несущий плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую белок D. Для активации экспрессии белка D, модифицированный штамм культивируют в подходящей жидкой питательной среде. В конце культивирования выполняют стадию очистки. Чистота белка D должна быть не менее 95 %.