

重组三价人乳头瘤病毒疫苗的急性毒性研究

周晓冰¹, 银飞², 王超¹, 王雅君², 张頔¹, 王雪¹, 霍艳¹, 徐岚², 陈健平², 刘永江^{2*}, 李波^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176
2. 北京康乐卫士生物技术股份有限公司, 北京 100176

摘要: 目的 评价重组三价人乳头瘤病毒(HPV)疫苗的急性毒性。方法 将Wistar大鼠随机分成2组: 阴性对照组和HPV疫苗组, 每组20只, HPV疫苗组单次sc 3倍人用剂量(1.5 mL) HPV疫苗, 阴性对照组注射等体积的生理盐水。观察动物临床状态; 检测动物体质量变化; 给药后第15天, 解剖大鼠, 进行大体病理学检查。结果 动物单次给药大剂量HPV疫苗后, 临床症状未见明显异常; 与对照组比较, 给药组动物体质量增长未见显著性差异; 病理学检查未见与供试品相关的明显异常。结论 Wistar大鼠单次sc重组三价HPV疫苗总体耐受性良好, 未见明显毒性反应, 为进一步临床前评价HPV疫苗的安全性奠定了基础。

关键词: 人乳头瘤病毒; 重组疫苗; 宫颈癌; 急性毒性

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)07-0935-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.010

Acute toxicity investigation of recombinant trivalent human papillomavirus vaccine

ZHOU Xiao-bing¹, YIN Fei², WANG Chao¹, WANG Ya-jun², ZHANG Di¹, WANG Xue¹, HUO Yan¹, XU Lan², CHEN Jian-ping², LIU Yong-jiang², LI Bo¹

1. National center for safety evaluation of drugs, National Institutes for food and drug control, Beijing 100176, China
2. Beijing Health Guard Biotechnology Inc., Beijing 100176, China

Abstract: objective To evaluate the acute toxicity of recombinant trivalent human papillomavirus (HPV) vaccines. **Methods** Wistar rats were randomly divided into negative control and HPV groups with 20 rats in each group. Rats in HPV groups were sc administered with a single-dose of 1.5 mL of HPV vaccines (three times of human dose/each rat), while rats in negative control group were given equal volume of saline. The clinical state of animals was observed, and the body mass changes were detected. Rats were dissected after 15 d of treatment and examined by gross pathology. **Results** Following a single injection with high-dose HPV vaccines, there were not obvious abnormalities in clinical symptom. Compared with negative control group, the body weight of rats from HPV vaccines-treated group had no significant difference. No obvious macro-pathological change was found in all animals. **Conclusion** Single sc injection with recombinant trivalent HPV vaccines is well tolerated and no obvious toxicological change is found in Wistar rats. These results will facilitate further preclinical safety studies of HPV vaccines.

Key words: human papillomavirus; recombinant vaccine; cervical cancer; acute toxicity

宫颈癌为临床上最常见的妇科恶性肿瘤之一, 多发于发展中国家, 目前其发病率和病死率呈年轻化的趋势。研究表明, 99%以上的宫颈癌组织中发

现高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染, 明确 HPV

感染为宫颈癌最主要致病原因之一^[1-2]。由于 HPV 病毒的发现, 研究人员通过几十年的不断努力, 成功研制出了安全、有效的用于预防子宫颈癌的 HPV 疫苗。目前, 在全球范围应用的 HPV

收稿日期: 2017-01-03

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501007-004)

作者简介: 周晓冰, 副研究员, 博士, 研究方向为临床前药物安全性评价

*通信作者 李波, 研究员, 博士生导师, 研究方向为临床前药物安全性评价。Email: libo@nicpbp.org.cn

刘永江, 研究员, 研究方向为生物制品。Email: yj.liu@bj-klws.com

疫苗主要有两种, 一是由默沙东公司研发的四价 (HPV 6、11、16 和 18 型) HPV 疫苗, 另一个是由葛兰素史克研发的二价 (HPV16 和 18 型) HPV 疫苗。自 HPV 疫苗问世以来, 全球超过 170 个国家和地区准许 HPV 疫苗接种注射, 超过 50 个推行了国家疫苗接种计划^[2-5]。

当前, 这些进口 HPV 疫苗也正在中国申请注册中, 由于进口产品价格昂贵, 在发展中国家推广存在一定挑战。因此国内一些科研单位和生产厂家也在加紧 HPV 疫苗研发, 并取得一定的进展^[6]。由于疫苗主要用于健康人的免疫接种, 因此其安全性就尤为重要。作为新疫苗整体临床前安全性评价的一部分, 临床前疫苗急性毒性评价是新疫苗研制的最重要环节之一^[6]。为推动我国国产 HPV 疫苗的发展, 本研究对由北京康乐卫士生物技术股份有限公司自主研发大肠杆菌重组表达的三价 HPV (16、18 及 58 型) 疫苗进行大鼠急性毒性研究, 观察大鼠产生的急性毒性反应及其严重程度、死亡情况, 为进一步疫苗的临床前安全性评价研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

40 只 6~7 周龄 SPF/VAF 级 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 雌性 154.2~169.5 g, 雄性 164.8~196.7 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (京) 2012-0001。动物金属笼饲养 (2~3 只/笼), 每天定量给食, 自由摄食。饲养房间温度 20~26 °C, 湿度 40%~70%, 换气次数 15 次/h, 12 h 照明。

1.2 供试品

供试品重组三价人乳头瘤病毒 (16/18/58 型) 疫苗 (大肠杆菌, 批号 20140501), 为白色混悬液,

每剂 0.5 mL, 含有重组人乳头瘤病毒 L1 抗原 16、18 及 58 型, 蛋白浓度分别为 40、20、20 μg, 由北京康乐卫士生物技术股份有限公司制造提供, 2~8 °C 保存。

2 方法

2.1 实验分组及给药

将 Wistar 大鼠经过检疫驯化后按体质量随机分成 2 组: 阴性对照组和 HPV 疫苗组, 每组 20 只大鼠, 雌雄各半, 单次肌肉、分多点注射给予每只大鼠 1.5 mL 供试品, 而阴性对照组动物注射等体积的生理盐水。

2.2 给药后毒性观察

给药当天, 在给药后的 30、60、90 min、2 h 进行观察, 因动物均未见明显异常症状, 当天停止观察; 在给药后第 1~14 天内每天一次对动物进行临床观察。在分组当天、以及给药第 1、2、7 和 14 天测定动物体质量。

给药后第 15 天, ip 4.5% 戊巴比妥钠麻醉 (剂量为 45 mg/kg), 完全放血后处死, 解剖, 进行大体病理学检查。

2.3 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件, 应用 *t* 检验进行给药组与阴性对照组差异分析。

3 结果

给药当天, 给药后连续观察 2 h, 动物均未见明显异常。给药当天下午对动物进行观察, 未见明显异常。继续连续观察 14 d, 各组动物临床症状均未见明显异常。体质量测定结果显示, 实验期间各组动物体质量均呈明显增长趋势 (表 1), 与阴性对照组比较, 给药组动物体质量差异不显著, 表明该供试品对动物体质量增长无影响。

表 1 HPV 疫苗给药后动物平均体质量的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Group mean body weights of rats after administration with HPV vaccines ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	动物性别	体质量/g				
		给药前	给药后第 1 天	给药后第 2 天	给药后第 7 天	给药后第 14 天
溶媒对照	雄	214.61±14.0	225.79±6.0	233.39±5.8	275.28±8.6	308.68±15.3
	雌	183.18±6.2	185.05±5.7	190.02±4.7	207.88±7.0	223.39±6.8
HPV 疫苗	雄	216.00±12.4	225.98±10.9	233.72±11.7	276.71±12.9	311.33±13.2
	雌	183.13±5.4	184.00±5.6	189.32±5.3	211.86±7.8	226.87±14.8

在给药第 15 天对全部动物进行剖检, 大体病理学检查结果显示所有组织和器官均未见异常改变。

4 讨论

对于疫苗的临床前安全性, 其担忧主要来自疫

苗成分本身对机体的直接损伤、疫苗诱导免疫系统引起的免疫相关毒性反应以及工艺制备过程中污染物和残余杂质引起的毒性。按照预防用生物制品临床前安全性评价技术审评一般原则推荐, 考虑由于

疫苗的接种剂量和接种频率通常较低,对机体产生的直接损失的可能性并不大。因此在通常情况下,仅推荐采用一种动物种属动物进行急性毒性试验,就能够反应出疫苗对机体的直接损伤,从而为临床适应提供安全范围参考^[7]。本研究选用 Wistar 大鼠,该种系动物的疫苗和生物技术药物一般毒性研究中最常用的啮齿类哺乳动物,国内外背景资料丰富,动物供应充足。因此该动物种属及品系的选择具有科学合理的依据。

在疫苗毒理学研究中,无论使用什么动物模型,建议给药剂量至少为一个人用剂量^[8]。根据前期免疫原性和保护性研究结果,供试品 HPV 疫苗拟用临床人用剂量为每次 1 剂,即 0.5 mL。本实验给予大鼠 1.5 mL 供试品,基本为大鼠 sc 最大给药体积。按照人用剂量计算相当于临床拟用剂量的 3 倍,按照体质量计算(大鼠体质量按照 200 g,人体质量按照 60 kg 计算)相当于临床拟用剂量的 900 倍,也未见动物出现明显的异常临床症状反应,动物解剖结果显示,各组织脏器均未发现异常,表明该供试品耐受性良好。

综上所述, Wistar 大鼠单次 sc 重组三价 HPV 疫苗总体耐受性良好,未见明显毒性反应,其无明显毒性反应剂量 (NOAEL) 为 240 μg /只(含人乳头瘤病毒 L1 抗原 16、18 及 58 型分别为 120、60 和 60 μg),这些结果为进一步临床前评价 HPV 疫苗安全性奠定了基础。

参考文献

- [1] Forman D, de Martel C, Lacey C J, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases [J]. *Vaccine*, 2012, 30 Suppl 5: F12-23.
- [2] Kash N, Lee M A, Kollipara R, et al. Safety and efficacy data on vaccines and immunization to human papillomavirus [J]. *J Clin Med*, 2015, 4(4): 614-633.
- [3] Ault K A, Future II Study Group. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials [J]. *Lancet*, 2007, 369(9576): 1861-1868.
- [4] Paavonen J, Naud P, Salmerón J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women [J]. *Lancet*, 2009, 374(9686): 301-314.
- [5] World Health Organization. WHO position on HPV vaccines [J]. *Vaccine*, 2009, 27(52): 7236-7237.
- [6] Wu T, Hu Y M, Li J, et al. Immunogenicity and safety of an E. coli-produced bivalent human papillomavirus (type 16 and 18) vaccine: A randomized controlled phase 2 clinical trial [J]. *Vaccine*, 2015, 33(32): 3940-3496.
- [7] 国家食品药品监督管理总局. 预防用疫苗临床前研究技术指导原则 [S]. 2015.
- [8] Sun Y, Gruber M, Matsumoto M. Overview of global regulatory toxicology requirements for vaccines and adjuvants [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2012, 65(2): 49-57.