

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017  
УДК 615.371:616.36-002-022-084

*Постнова Е.Л., Шалунова Н.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А.*

### МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТИТА В

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва

Одним из основных показателей качества вакцин для профилактики гепатита В наряду с их безопасностью является иммунологическая активность — специфическая активность. Проведен ретроспективный анализ применения лабораторных методов оценки специфической (иммуногенной) активности современных вакцин гепатита В по показателям содержания HBsAg методом *in vitro* и иммуногенной активности методом *in vivo* на мышах. Оба метода стандартизованы и содержатся в нормативных документах на зарегистрированные в РФ вакцины гепатита В отечественного производства. По показателям специфической (иммуногенной) активности вакцин гепатита В в период с 2013 по 2015 г. методом иммуноферментного анализа (ИФА) исследовано более 170 серий вакцин. На основании полученных результатов контроля подтверждены целесообразность и эффективность применения метода ИФА для определения содержания HBsAg, а также допустимость применения для испытаний методом ИФА вакцин гепатита В готовых наборов тест-систем Murex HBsAg Version 3. Анализ результатов лабораторного контроля серий вакцин гепатита В с применением биологического метода оценки иммуногенности по ED<sub>50</sub> подтверждает стабильно высокую иммуногенную активность российских коммерческих вакцин, предназначенных для профилактики гепатита В. Подтвержденная сопоставимость методов позволяет в дальнейшем уменьшить количество испытаний методом *in vivo* в пользу ИФА, достоверно характеризующего выпускаемый препарат.

Ключевые слова: *вирусный гепатит В; вакцина гепатита В; поверхностный антиген вируса гепатита В; HBsAg; специфическая активность; иммуноферментный анализ.*

*Для цитирования:* Постнова Е.Л., Шалунова Н.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А. Методы оценки специфической активности препаратов для профилактики гепатита В. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(5): 233-240.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-233-240>

*Postnova E.L., Shalunova N.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A.*

### METHODS FOR ASSESSMENT OF THE SPECIFIC ACTIVITY OF DRUGS FOR PREVENTION OF HEPATITIS B

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation

The immunologic activity (specific activity) is one of the main indicators of quality of vaccines for prophylaxis of hepatitis B, along with their safety. Retrospective analysis of the use of laboratory methods for assessment of specific (immunogenic) activity of modern vaccines against hepatitis B using indicators was carried out: *in vitro* method based on evaluation of HBsAg content and *in vivo* method based on evaluation of immunogenic activity in mice. Both methods are standardized and described in normative documents on the vaccines against hepatitis B of domestic production registered in the Russian Federation. Indicators of specific (immunogenic) activity of vaccines against hepatitis B were used to investigate more than 170 vaccine series using the ELISA method in the period from 2013 to 2015. The obtained control results confirmed the expediency and efficiency of enzyme immunoassay for determination of HBsAg content, as well as permissibility of use of ready sets of the Murex HBsAg Version 3 test systems for testing vaccines against hepatitis B by the ELISA method. Analysis of the results of laboratory control of series of vaccines against hepatitis B using a biological method for immunogenicity evaluation based on ED<sub>50</sub> analysis confirms persistently high immunogenic activity of the Russian commercial vaccines intended for prophylaxis of hepatitis B. The confirmed comparability of methods allows the number of *in vivo* tests to be further reduced in favor of the enzyme immunoassay authentically characterizing the produced drug.

Key words: *viral hepatitis B; hepatitis B vaccine; surface antigen of a virus of hepatitis B; HBsAg; specific activity; ELISA.*

*For citation:* Postnova E.L., Shalunova N.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A. Methods for assessment of the specific activity of drugs for prevention of hepatitis B. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(5): 233-240. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-233-240>

*For correspondence:* Evgeniya L. Postnova, Chief expert of Viral Vaccines Laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: [postnova@expm.ru](mailto:postnova@expm.ru)

*Для корреспонденции:* Постнова Евгения Леонидовна, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва. E-mail: [postnova@expm.ru](mailto:postnova@expm.ru)

**Information about authors:**Postnova E.L., <http://orcid.org/0000-0002-1798-4910>**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 13 June 2017

Accepted 20 June 2017

**Введение**

Вирусный гепатит В (ВГВ) вызывает разнообразные патологические процессы с поражением печени: острый циклический гепатит, хронический гепатит, носительство ВГВ, первичный рак печени, и в отличие от гепатита А значительно чаще наблюдаются среднетяжелые и тяжелые формы заболевания, возможен и фульминантный вариант [1]. Огромное число источников гепатита В и многообразие путей передачи этой инфекции обуславливают важность разработки возможных стратегий контроля и эрадикации вируса, среди которых главную роль в данный момент играет вакцинация. Длительные наблюдения за массовой вакцинацией в эндемичных районах показали, что применение вакцин на основе рекомбинантного HBsAg позволило снизить заболеваемость гепатитом В в несколько раз [2—4].

В настоящее время на территории Российской Федерации для профилактики ВГВ используются рекомбинантные дрожжевые вакцины, характеризующиеся слабой реактогенностью, выраженной протективной активностью и безопасностью. Вакцины против гепатита В даже при введении новорожденным в первые часы после рождения хорошо переносятся, давая выраженный защитный эффект. При этом отсутствует интерференция с материнскими антителами или пассивными антителами, содержащимися в специфическом иммуноглобулине против гепатита В. Полностью отсутствует интерференция и с другими вакцинами, в том числе входящими в календари профилактических прививок [5].

На современном этапе вакцина против гепатита В отечественного производства представляет собой сорбированный на адьюванте рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) — белок, образующий наружную оболочку вируса и активно стимулирующий вирусспецифическую Т-клеточную реакцию. Вакцинный HBsAg получают путем культивирования генетически модифицированных дрожжевых клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, с последующим их разрушением и выделением белка с использованием физико-химических методов, что исключает необходимость инактивации и контроля специфической безвредности. Используемый в вакцине антиген производится культурой генетически трансформированных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* или *Hansenula polymorpha*.

На территории РФ на данный момент зарегистрировано 7 моновалентных вакцин для профилактики ВГВ различных производителей [6], две из которых отечественного производства: препарат Регевак® В производства ЗАО «Биннофарм» и «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» производства ЗАО «НПК Комбиотех». Поскольку циркулирующие в мире штаммы ВГВ однородны по антигенной характеристике HBsAg (известно несколько подтипов, различающихся субдетерминантами: ad, ay, adw, adr и другие), а наибольшее распространение (95—98%) на территории РФ имеет вирус с субтипом ayw [7], отечественные вакцины против ВГВ

содержат преимущественно HBsAg субтипа ayw либо субтипы adw и ayw одновременно.

Одним из основных показателей качества вакцин для профилактики гепатита В наряду с их безопасностью является иммунологическая активность — специфическая активность. Оценку данного показателя, согласно ФС.3.3.1.0026.15 «Вакцина гепатита В рекомбинантная» [8], проводят с использованием двух методов: твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), в основе которого лежит принцип прямого определения концентрации антигена по отношению к референс-препарату, и определения иммуногенности препарата биологическим методом *in vivo* на мышах линии Balb/c. С одной стороны, система *in vivo* наиболее приближена к естественным условиям организма, однако вследствие сложности и многоплановости происходящих в живом организме процессов, огромного количества неизвестных и неконтролируемых клеточных взаимодействий нередко невозможно дать однозначное объяснение результатов. Экспериментальные системы *in vitro* являются более определенными [9]. В соответствии с рекомендациями ВОЗ определение специфической активности методом ИФА проводится для каждой серии конечной продукции, а при разработке и внедрении новых препаратов, регистрации или внесении изменений в технологию производства обязательным условием, определяющим качество, является изучение специфической активности *in vivo* на мышах или морских свинках [10]. Для отечественных препаратов использование метода *in vivo* показано только для каждой 10-й серии [11, 12].

Гарантией качества вакцин является биологическая стандартизация, регламентирующая комплекс требований к иммунобиологическому лекарственному препарату на всех этапах производства начиная с сырья, субстрата репродукции возбудителя и заканчивая методами контроля серии готового препарата [13]. К факторам, непосредственно обуславливающим качество вакцин, относятся адекватность, эффективность и стандартность используемых для подтверждения соответствия методик. Если первые два требования можно оценить при валидации методики, для подтверждения стандартности необходимо проведение ретроспективного анализа на выборке значительного объема.

Целями данного исследования являлись ретроспективный сравнительный анализ методов *in vitro* и *in vivo*, используемых для определения специфической активности вакцин гепатита В отечественного производства, оценка сопоставимости используемых методик, определение степени корреляции между содержанием HBsAg, установленным в ИФА, и иммуногенностью на мышах.

**Материал и методы**

**Препараты.** Для исследования были использованы результаты испытаний следующих коммерческих препаратов:

— 41 серия вакцины против гепатита В рекомбинантной «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» (ЗАО «НПК Комбиотех») субтипов ауw и адw, поступавшая на контроль с 2013 по 2015 г.;

— 138 серий вакцины против гепатита В рекомбинантной Регевак® В (ЗАО «Биннофарм», Зеленоград, Москва) субтипа ауw, поступавших на контроль с 2013 по 2015 г.;

— серии референс-препаратов.

Оценку методом *in vitro* осуществляли с использованием коммерческой тест-системы Murex HBsAg Version 3 производства «DiaSorin», Великобритания, РУ № ФСЗ 2012/12279. Данный набор является чувствительным средством ферментного иммуноанализа для определения поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке или плазме крови человека.

Входной контроль тест-системы Murex HBsAg Version 3, а именно определение аналитической и диагностической чувствительности, проводили с использованием следующих стандартных образцов и панели сывороток:

— третьего международного стандарта HBsAg (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ауw1/adw2) 12/226 NIBSC;

— набора реагентов ДС-СО-HBsAg (стандартный образец поверхностного антигена вируса гепатита В ТУ 9398-035-05941003—2009);

— панели сывороток крови, содержащих разные субтипы и мутантные формы HBsAg вируса гепатита В ТУ 9398-136-23548172—2011.

**Пробоподготовка.** Разведение исследуемых образцов вакцины и референс-препаратов готовили в трех независимых повторностях. В качестве разбавителя использовали буфер из тест-системы с добавлением 0,1—0,2% бычьего сывороточного альбумина. Каждое разведение готовили последовательно в соответствии с указаниями нормативной документации [11, 12]. Содержимое каждой пробирки после внесения пробы перемешивали на шейкере типа Vortex в течение 10—15 с. При исследовании использовали разведения, содержащие от 10 до 0,25 нг/мл.

Постановку ИФА и учет результатов проводили в соответствии с инструкцией по применению тест-системы Murex HBsAg Version 3. Статистическую обработку результатов выполняли методом параллельных линий с использованием программы PARALINE [14], разработанной непосредственно для определения специфической активности препаратов в сравнении с референс-образцами. Используя дисперсионный анализ, получали значения относительной активности вакцинного HBsAg по отношению к референс-препарату. Одновременно оценивали соответствие критериям валидности: соблюдение линейности, параллельности, значимости регрессии. Коэффициент корреляции, коэффициент вариации, стандартное отклонение и суммарные средние показатели ( $M \pm m$ ) определяли на основании значений полученных показателей для каждой исследованной серии ( $n$ ) вакцины с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel, где  $M$  — среднееарифметическое значение определяемого показателя,  $m$  — ошибка среднего.

Оценку методом *in vivo* осуществляли на самках мышей линии Balb/c массой 12—14 г. Иммунизацию проводили внутривенно в объеме 1 мл последовательными разведениями вакцины, приготовленными в соответствии с указаниями нормативной документации. Аналогично разводили соответствующие референс-препараты. В качестве разбавителя использовали 0,9%

раствор натрия хлорида, содержащий 0,35—0,65 мг/мл алюминия гидроксида (адьюванта). Данный раствор использовали и при иммунизации животных в качестве отрицательного контроля.

Иммунизацию проводили на группах мышах по 10 особей для каждого разведения. На 30-е сутки индивидуально от каждого животного брали кровь для получения сыворотки. Полученные сыворотки контролировали на наличие антител методом ИФА с использованием зарегистрированной в РФ иммуноферментной тест-системы, предназначенной для качественного и количественного определения антител к HBsAg ВектоHBsAg-антитела производства ЗАО «Вектор-Бест», РУ ФСР 201/13922. Затем вычисляли среднее арифметическое значение оптической плотности сывороток животных, которым вводили только разбавитель (отрицательный контроль). Положительными считали сыворотки, показатели оптической плотности (ОП) которых равны или выше среднего арифметического отрицательного контроля + 2 стандартных отклонения. Для каждой группы мышей вычисляли процент эффективности (показатель сероконверсии в %), которая выражается как отношение количества сероположительных мышей в группе к общему количеству мышей в группе, умноженному на 100.

Методом пробит-анализа (Statistica 10) рассчитывали  $ED_{50}$  испытуемой серии вакцины и референс-образца. Затем находили отношение  $ED_{50}$  референс-препарата к  $ED_{50}$  испытуемой вакцины.

Все испытания проведены на базе ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ.

## Результаты

### Иммуноферментный анализ

Первоначально для испытаний вакцин гепатита В использовали тест-системы Abbott Auszyme Monoclonal фирмы «Abbott». Однако, поскольку наборы были сняты с производства, в 2011 г. была валидирована тест-система «Гепастрип» производства ООО «Ниармедик Плюс» [15]. В настоящее время используются наборы Murex HBsAg Version 3 производства «DiaSorin», валидированные производителями вакцин против ВГВ. Все указанные тест-системы имеют сходный и достаточно простой принцип применения. Методика основана на связывании исследуемого белка и специфичных антител, сорбированных на твердой фазе — полистироловом планшете, с последующим выявлением образовавшегося комплекса антиген—антитело благодаря метке, которая в свою очередь детектируется спектрофотометрически.

Для испытаний готовили ряд разведений испытуемого образца и референс-препарата в зависимости от чувствительности используемого набора. На данный момент для готовых наборов тест-систем используют разведения HBsAg, содержащегося в вакцине, в диапазоне от 10 до 0,25 нг/мл. Чувствительность тест-системы должна быть адекватна количеству HBsAg в разведениях.

Поскольку чувствительность наборов Murex HBsAg Version 3 не указана в инструкции по применению, выполняли процедуру установления аналитической чувствительности. Экспериментально было установлено, что с использованием третьего международного стандарта HBsAg (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ауw1/adw2) аналитическая чувствительность набора составляет 0,05 МЕ, а с использованием набора реагентов ДС-СО-HBsAg «Стандартный образец поверхностного

Таблица 1

**Результаты анализа специфической активности (содержания HBsAg) методом ИФА**

Препарат	Год/число серий	Норма по нормативной документации, мкг/мл	Средние показатели специфической активности, установленные методом ИФА, мкг/мл		
			$M \pm m$	$\sigma$	$V_\sigma, \%$
Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая	2013/16	Не менее 17	21,2 ± 0,63	2,53	11,9
	2014/7				
	2015/18				
Регевак® В	2013/53	От 17 до 23	19,7 ± 0,21	1,5	7,6
	2014/61				
	2015/24				

Примечание.  $M$  — среднее за год;  $\sigma$  — стандартное отклонение;  $V_\sigma$  — коэффициент вариации.

антигена вируса гепатита В» — 0,01 МЕ, что, согласно нормативной документации, позволяет использовать данную тест-систему.

Отечественные вакцины содержат как ауw-, так и адw-субтипы поверхностного антигена ВГВ, поэтому специфичность используемых наборов тест-систем также должна быть установлена в обязательном порядке. С этой целью было проведено тестирование образцов сывороток крови, содержащих разные субтипы и мутантные формы HBsAg ВГВ, входящие в набор «HBsAg — стандартная панель сывороток» производства ЗАО «Вектор-Бест». Каждая сыворотка представлена в трех разведениях (0,1, 0,5, < 0,05 МЕ/мл). Результаты тестирования сывороток показали, что специфичность тест-системы Murex HBsAg Version 3 составляет 100%.

**Определение содержания HBsAg методом ИФА**

Методом ИФА с использованием тест-системы Murex HBsAg Version 3 были проанализированы 138 серий препарата Регевак® В и 41 серия препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая».

Полученные результаты оценки представлены в табл. 1 как среднее значение содержания HBsAg за год.

Для препаратов «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» и Регевак® В среднее значение содержания

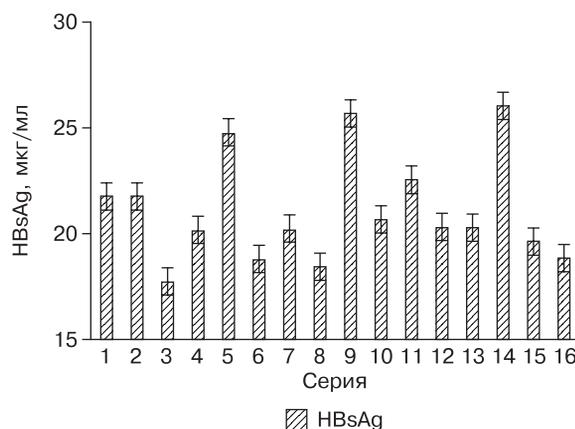


Рис. 1. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» за 2013 г.

HBsAg за 3 года составило 22,5 и 19,6 мкг/мл соответственно. Коэффициенты вариации для препарата Регевак® В находились в диапазоне от 5,27 до 7,6%, что говорит о незначительной степени рассеяния данных. Для препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» коэффициент составил 11,9—12,4%, степень рассеяния данных в этом случае считается средней.

На рис. 1—6 отражены результаты посерийного контроля. Полученные данные наглядно демонстрируют, что все испытанные серии соответствуют допустимым пределам, предусмотренным требованиями утвержденных нормативных документов.

**Определение иммуногенной активности на мышцах биологическим методом (тест in vivo)**

Проанализированы результаты испытаний иммуногенности 11 серий препарата Регевак® В и 4 серий препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая». Полученные за 3 года результаты подтверждают соответствие изученных серий вакцин требованиям нормативных документов: для препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» отношение  $ED_{50}$  референс-вакцины к  $ED_{50}$  серии испытуемого препарата варьировало от 0,7 до 2,27, для препарата Регевак® В — от 0,69 до 1,97; установленные коэффициенты ва-

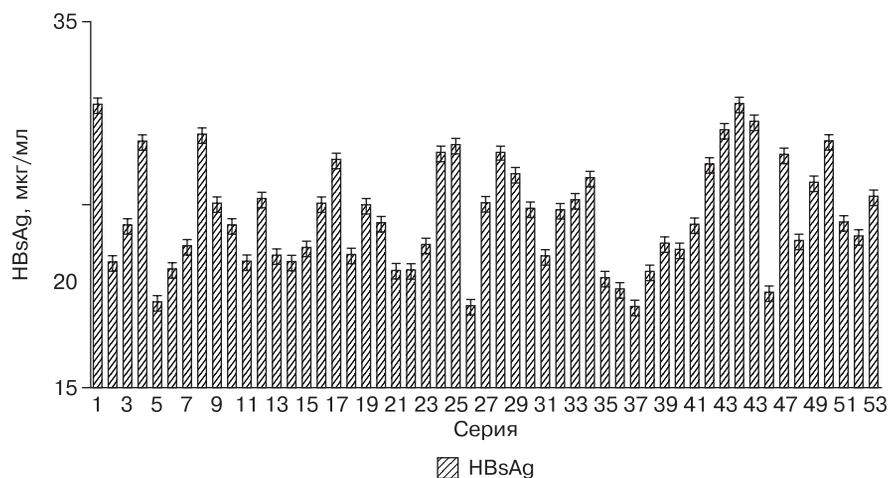


Рис. 2. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата Регевак® В за 2013 г.

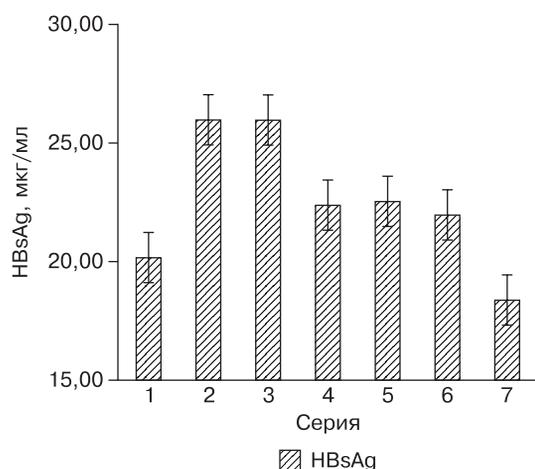


Рис. 3. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» за 2014 г.

риации позволяют сделать вывод о неоднородности анализируемых данных (табл. 2).

Сопоставление результатов, полученных с помощью ИФА и биологического метода с использованием мышей (см. табл. 2), показало, что для препарата Регевак® В коэффициент корреляции составил 0,7, для препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» — 0,98.

Одним из подтверждений стандартности методики является воспроизводимость результатов. В связи с отсутствием международного стандарта вакцинного HBsAg была проведена статистическая обработка значений ОП, полученных для референс-препарата вакцины гепатита В на основе 17 независимых испытаний с использованием метода ИФА. Статистической обработке подвергли также полученные методом *in vivo* значения ED<sub>50</sub> референс-препарата Регевак® В. Результаты представлены в табл. 3.

### Обсуждение

ИФА основан на прямом выявлении вакцинного HBsAg и последующей обработке полученных результатов методом параллельных линий с использованием дисперсионного анализа [15]. Определение содержания HBsAg в испытуемых образцах вакцины проводят параллельно с определением содержания антигена в

референс-вакцине. Ввиду отсутствия международного стандарта для оценки иммуногенности рекомбинантных вакцин против гепатита В в качестве препаратов сравнения используют аналогичные вакцины того же производства — вакцинные референс-препараты, представляющие собой часть серии, иммуногенная активность которой первоначально была подтверждена в клинических испытаниях [10]. Испытания на специфическую активность проводят с использованием иммуноферментных тест-систем, предназначенных для определения HBsAg, зарегистрированных в РФ и валидированных для применения относительно конкретного препарата [16—18]. Получаемые с помощью ИФА данные позволяют в течение одного дня оценить иммуногенность производственных серий вакцины и подтвердить заявленное количество HBsAg.

В настоящем исследовании для испытаний использовали наборы тест-системы Murex HBsAg Version 3, чувствительность и специфичность которых были подтверждены и составили 0,05 МЕ/мл и 100% соответственно. Среднее значение содержания HBsAg за 3 года составило 22,5 мкг/мл для 41 серии препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» и 19,6 мкг/мл для 138 серий препарата Регевак® В. Установленные коэффициенты вариации подтверждают низкую вариабельность данных. Все испытанные серии также соответствуют допустимым пределам, предусмотренным требованиями утвержденных нормативных документов. Более узкий разброс полученных значений активности для препарата Регевак® В, а именно 19,5—19,7 мкг/мл HBsAg, связан с обусловленными фармакопейной статьей предприятия более жесткими требованиями — ограничением верхнего предела содержания антигена — не более 23 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют о стабильности технологии производства.

Другим способом оценки специфической активности вакцин гепатита В является исследование иммуногенности биологическим методом с использованием самок белых линейных мышей Balb/c массой 12—14 г. Исследование антигенной активности вакцин гепатита В проводят посредством оценки гуморального иммунитета в серологической реакции. Активность испытуемого вещества в этом случае выражается в единицах действия (ЕД). Согласно требованиям ФС.3.3.1.0026.15 «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая», вакцина должна стимулировать выработку антител к HBsAg у однократно иммунизированных мышей. Отношение дозы иммуногенной активности референс-

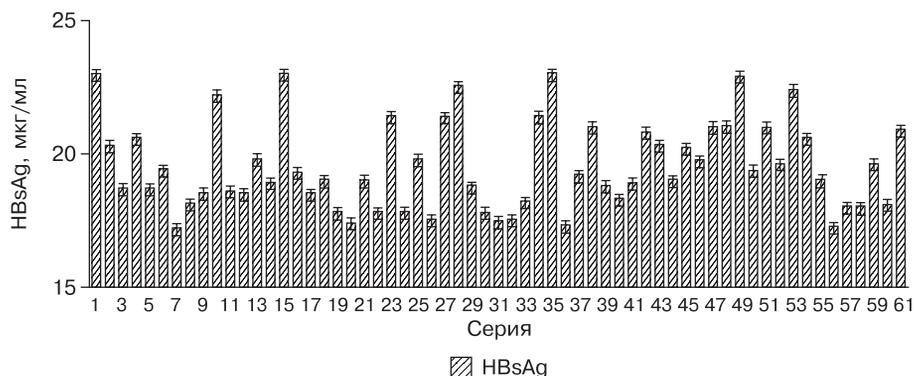


Рис. 4. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата Регевак® В за 2014 г.

Таблица 2

Сравнение результатов испытания методом ИФА и на мышах

Препарат	Серия вакцины	ИФА, мкг/мл	Отношение ЕД <sub>50</sub> референс-вакцины к ЕД <sub>50</sub> испытуемой серии	Коэффициент корреляции	Коэффициент вариации ИФА/ коэффициент вариации «отношение ЕД <sub>50</sub> референс-вакцины к ЕД <sub>50</sub> испытуемой серии», %
Регевак® В	1	19,4	0,69	0,7	8,6/41,9
	2	20,0	1,6		
	3	17,2	0,63		
	4	17,66	0,62		
	5	17,58	0,7		
	6	19,8	1		
	7	21,44	1,1		
	8	18,16	0,79		
	9	20,32	1,97		
	10	22,4	1,4		
	11	20,3	1,1		
«Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая»	1	19,4	0,7	0,98	12,3/50,2
	2	26,1	2,27		
	3	22,0	1,0		
	4	23,14	1,5		

препарата вакцины гепатита В, вызывающей выработку антител у 50% мышей (ЕД<sub>50</sub> референс-препарата), к ЕД<sub>50</sub> испытуемой вакцины должно быть не менее 0,5. В качестве препарата сравнения также используют референс-препарат производителя. Анализ полученных с использованием метода *in vivo* результатов подтвердил соответствие изученных серий требованиям фармакопейных статей предприятий. Установленные коэффициенты вариации позволяют сделать вывод о низкой однородности результатов испытаний.

Сравнительная оценка результатов испытаний 15 серий вакцин гепатита В позволила установить зависимость иммуногенности препарата при определении на мышах от количества HBsAg, определенного в ИФА. Для препарата Регевак® В коэффициент корреляции составил 0,7, для препарата «Вакцина гепатита В реком-

бинантная дрожжевая» — 0,98. Различия в полученных значениях коэффициентов корреляции могут быть связаны как с объемом выборки, так и с различиями в составе вакцин.

Ввиду невозможности увеличения кратности испытаний одних и тех же серий вакцин воспроизводимость применяемых методик оценивали, используя результаты, полученные для референс-препарата вакцины Регевак® В. Коэффициент вариации для ОП референс-препарата вакцины гепатита В составил 11,4%, что подтверждает однородность совокупности и позволяет сделать вывод о воспроизводимости используемой методики ИФА для оценки специфической активности. Коэффициент вариации для ЕД<sub>50</sub> референс-препарата составил 55%, что говорит о значительной вариабельности данных.

**Заключение**

Мировая тенденция развития вакцинологии диктует необходимость максимального сокращения количества экспериментальных животных, используемых в процессе производства и контроля препаратов [19]. Одним из факторов гармонизации российских требований с требованиями международных фармакопей является отказ от практики использования лабораторных животных при

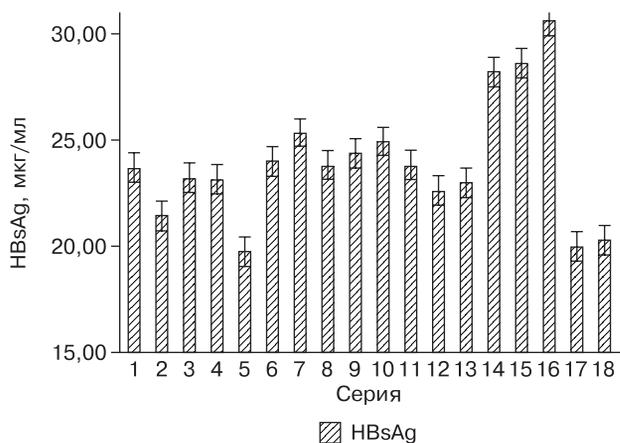


Рис. 5. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата «Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая» за 2015 г.

Таблица 3

Результаты статистической обработки значений ОП и ЕД<sub>50</sub>, полученных для референс-препарата Регевак® В в испытаниях

Статистический параметр	Значения ОП, полученные для 1 нг/мл HBsAg	ЕД <sub>50</sub> референс-препарата
Среднее значение ( $M \pm m$ )	1,187 ± 0,287	1,945 ± 0,406
Стандартное отклонение	0,172961	1,07
Коэффициент вариации, %	11,4	55
Дисперсия	0,03158	1,15

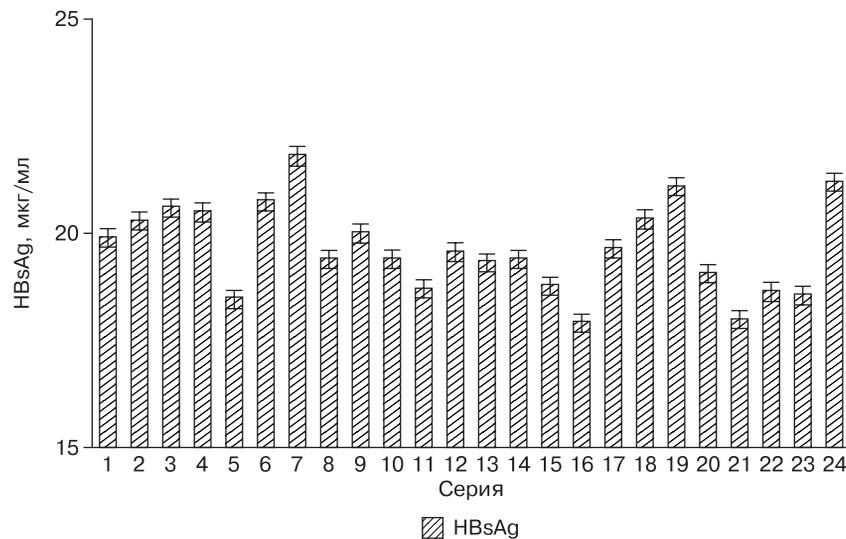


Рис. 6. Результаты оценки специфической активности методом ИФА препарата Регевак® В за 2015 г.

определении таких показателей качества, как иммунная активность, специфическая активность, токсичность, безвредность, и переход на методы *in vitro* [20]. Полученные результаты позволяют сделать вывод о сопоставимости методов и возможности уменьшения использования теста *in vivo* при рутинном анализе в пользу ИФА как основного метода для оценки специфической активности вакцин гепатита В.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 10, 17, 18 см. REFERENCES)

- Зверев В.В., Юминова Н.В. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций от Э. Дженнера до настоящего времени. *Вопросы вирусологии*. 2012; (S1): 33—42.
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году». Available at: [http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/22c/gd\\_2014\\_seb\\_dlya-sayta.pdf](http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/22c/gd_2014_seb_dlya-sayta.pdf)
- Грачев В.П., Карганова Г.Г., Хапчаев Ю.Х. Критерии оценки качества вирусных вакцин для профилактики актуальных вирусных инфекций. *Биопрепараты*. 2005; (1): 2—3.
- Бектимиров Т.А., Горбунов М.А., Шалунова Н.В., Павлова Л.И. Результаты регистрационных испытаний вакцины Эувак В для профилактики гепатита В. *Вирусный гепатит В: 350 млн. хронических носителей*. 1999; №4(4). Available at: <https://medi.ru/info/6079>
- Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>
- Комбиотех. Справка о значении соответствия вакцины субтипу поверхностного антигена вируса гепатита В. Available at: <http://www.combiotech.com/serotypes.htm>
- ФС.3.3.1.0026.15. Вакцина гепатита В рекомбинантная. М.; 2015.
- Кондратьева И.А., Ярилин А.А., Егорова С.Г., Фрезе К.В., Воробьева Н.В., Буракова О.В. и др. *Практикум по иммунологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений*. М.; Академия; 2004.
- ФСП Р N003741/01-040310. «Регевак В», вакцина против гепатита В, рекомбинантная дрожжевая жидкая, суспензия для внутримышечного введения 20 мкг/мл.
- ФСП Р N000738/01-191107. Вакцина гепатита В рекомбинантная дрожжевая, суспензия для внутримышечного введения.
- Воробьева М.С., Афонина О.С., Бархалева О.А., Щербинина М.С., Саркисян К.А., Рукавишников А.В. и др. Анализ многолетнего опыта изучения инактивированных культуральных вакцин для профилактики клещевого энцефалита отечественного и зарубежного производства по показателю качества — специфическая активность (иммуногенность). *Биопрепараты*. 2015; (4): 4—10.
- Петухов В.Г. Метод параллельных линий для количественной оценки качества стандартных образцов и других МИБП в иммуноферментном анализе. *Биопрепараты*. 2004; (1): 19—23.
- Коровкин А.С., Шалунова Н.В. Изучение возможности применения отечественных коммерческих иммуноферментных тест-систем для определения специфической активности вакцин против гепатита В. *Биофармацевтический журнал*. 2011; 3(4): 34—40.
- Бектимиров Т.А. Международные требования к испытанию стабильности медицинских иммунобиологических препаратов. *Биопрепараты*. 2006; (3): 28—9.
- Эльберт Л.Б., Воронич М.Ф., Тимофеев А.В. Сравнительный анализ тестов *in vitro* и *in vivo* количественной оценки иммуногенности вакцины клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1998; 43(5): 23—8.
- Мовсесянц А.А., Бондарев В.П., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Шимчук Л.Ф. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016; (2): 38—41.

#### REFERENCES

- Zverev V.V., Yuminova N.V. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date. *Problems of Virology. Voprosy virusologii*. 2012; (S1): 33—42. (in Russian)
- Ni Y.H., Chang M.H., Huang L.M., Chen H.L., Hsu H.Y., Chiu T.Y. et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents in a hyperendemic area: 15 years after mass hepatitis B vaccination. *Ann. Intern. Med.* 2001; 135(9): 796—800.
- State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2014». Available at: [http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/22c/gd\\_2014\\_seb\\_dlya-sayta.pdf](http://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/22c/gd_2014_seb_dlya-sayta.pdf) (in Russian)
- Grachev V.P., Karganova G.G., Khapchaev Yu.Kh. Criteria for assessing the quality of viral vaccines for the prevention of topical viral infections. *Biopreparaty*. 2005; (1): 2—3. (in Russian)
- Bektimirov T.A., Gorbunov M.A., Shalunova N.V., Pavlova L.I.

- Results of registration tests of the Euvax B vaccine for the prevention of hepatitis B. *Virusnyy gepatit B: 350 mln. khronicheskikh nositeley*. 1999; №4(4). Available at: <https://medi.ru/info/6079> (in Russian)
6. State Register of Medicinal Products. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (in Russian)
  7. Combiotech. Reference on the importance of vaccine compliance with the subtype of the surface antigen of the hepatitis B virus. Available at: <http://www.combiotech.com/serotypes.htm> (in Russian)
  8. Pharmacopoeia article 3.3.1.0026.15. Recombinant hepatitis B vaccine. Moscow; 2015. (in Russian)
  9. Kondrat'eva I.A., Yarinin A.A., Egorova S.G., Freze K.V., Vorob'eva N.V., Burakova O.V., et al. *Practical Work on Immunology: Textbook for Students of Higher Educational Institutions [Praktikum po immunologii: Uchebnoe posobie dlya studentov vysshikh uchebnykh zavedeniy]*. Moscow: Akademiya; 2004. (in Russian)
  10. WHO. Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines. Available at: [http://www.who.int/biologicals/HEP\\_B\\_Recomm\\_after\\_ECBS\\_endorsment\\_final.pdf](http://www.who.int/biologicals/HEP_B_Recomm_after_ECBS_endorsment_final.pdf)
  11. Pharmacopoeial article N003741/01-040310. «Regevak B» Hepatitis B vaccine, recombinant yeast liquid, suspension for intramuscular injection of 20 µg/ml. (in Russian)
  12. Pharmacopoeial article N000738/01-191107. Hepatitis B recombinant yeast, suspension for intramuscular injection. (in Russian)
  13. Vorob'eva M.S., Afonina O.S., Barkhaleva O.A., Shcherbinina M.S., Sarkisyan K.A., Rukavishnikov A.V., et al. The analysis of long-term experience of studying inactivated culture vaccines for the prevention of tick-borne encephalitis of domestic and foreign production in terms of the quality index is a specific activity (immunogenicity). *Biopreparaty*. 2015; (4): 4—10. (in Russian)
  14. Petukhov V.G. Method of parallel lines for the quantitative evaluation of the quality of standard samples and other MIBP in enzyme immunoassay. *Biopreparaty*. 2004; (1): 19—23. (in Russian)
  15. Korovkin A.S., Shalunova N.V. Study of the possibility of using domestic commercial immunoenzyme test systems to determine the specific activity of vaccines against hepatitis B. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal*. 2011; 3(4): 34—40. (in Russian)
  16. Bektimirov T.A. International requirements for testing the stability of medical immunobiological drugs. *Biopreparaty*. 2006; (3): 28—9. (in Russian)
  17. Expert committee on biological standardization. WHO GMP for Biological Products. Proposed replacement of: TRS 822, Annex 1. Geneva; 2015. Available at: [http://www.who.int/biologicals/BS2253\\_GMP\\_For\\_Biologicals\\_clean.pdf?ua=1](http://www.who.int/biologicals/BS2253_GMP_For_Biologicals_clean.pdf?ua=1)
  18. Giffroy D., Mazy C., Duchêne M. Validation of a new ELISA method for in vitro potency assay of hepatitis B-containing vaccines. *Pharmeuropa Bio*. 2006; (1): 7—14.
  19. El'bert L.B., Vorovich M.F., Timofeev A.V. Comparative analysis of in vitro and in vivo tests for the quantitative evaluation of the immunogenicity of tick-borne encephalitis vaccine. *Voprosy virusologii*. 1998; 43(5): 236—8. (in Russian)
  20. Movsesyants A.A., Bondarev V.P., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Shimchuk L.F. Quality standards for immunobiological medicinal products - new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2016; (2): 38—41. (in Russian)

Поступила 13.06.17

Принята в печать 20.06.17