

### 2.1.11.32. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТИТА В (РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК)

Количественное определение антигенной активности вакцины для профилактики гепатита В (рекомбинантной ДНК) проводят *in vivo* методом определения иммуногенной активности путем сравнения ее способности индуцировать в данных условиях выработку специфических антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) у мышей или морских свинок с такой же способностью стандартного образца (метод 1) или *in vitro*, методом иммунохимического определения содержания антигена (метод 2).

#### МЕТОД 1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VIVO*

Метод основан на определении дозы вакцины, вызывающей образование антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) у 50 % животных.

**Выбор и распределение животных.** В испытании используют здоровых мышей из одной партии, возрастом около 5 недель. Линия мышей, используемая в данном испытании должна обеспечивать получение значительного наклона кривой зависимости отклика (реакции на антиген) от дозы антигена («доза – отклик»). Подходящими являются мыши гаплотипов H-2<sup>a</sup> или H-2<sup>d</sup>. Также возможно использование здоровых морских свинок из одной партии, возрастом около 7 недель и весом от 300 г до 350 г. Все животные должны быть одного пола и возраста. Животных делят не менее чем на 7 равных групп в количестве, необходимом для выполнения требований испытания.

**Определение активности испытуемого образца.** Готовят не менее трех разведений испытуемого образца и соответствующих разведений стандартного образца, используя раствор

9 г/л натрия хлорида Р с добавлением алюминиевого адъюванта, применяемого для производства вакцины, или другой подходящий растворитель. Каждое из разведений назначают одной из групп животных; каждому животному в группе вводят внутрибрюшинно не более 1,0 мл разведения, назначенного данной группе животных. Контрольной невакцинированной группе вводят внутрибрюшинно растворитель в том же объеме, что и испытуемый образец. Через соответствующий промежуток времени (например, от 4 недель до 6 недель) всех животных анестезируют, затем производят забор крови, готовят сыворотки и хранят их отдельно друг от друга. Определяют содержание специфических антител против HBsAg в каждом образце сыворотки с помощью подходящего иммунохимического метода (2.7.1).

**Расчеты.** Вычисления проводят с помощью статистических методов, предназначенных для количественных определений с качественным (альтернативным) типом ответа (2.3.12.0).

На основании распределения уровней реакции, определенных во всех сыворотках группы невакцинированных животных, вычисляют максимальный уровень реакции, который можно ожидать у невакцинированных животных для данного испытания. Любой иммунный ответ в группе вакцинированных животных, превышающий данный уровень, является по определению сероконверсией.

Проводят подходящее преобразование (например, пробит-преобразование) процентной численности животных с сероконверсией в каждой из групп и анализируют данные с помощью модели параллельных прямых логарифмической зависимости «доза – отклик». Определяют активность испытуемого образца относительно стандартного образца.

**Критерии достоверности.** Результаты испытания считают достоверными, если:

- ED<sub>50</sub> как для испытуемого образца, так и для стандартного образца находится в

пределах от наименьшей до наибольшей дозы, вводимой животным;

- статистический анализ не показывает значительного отклонения от линейности и параллельности;

- доверительный интервал ( $P = 0,95$ ) относительной активности составляет не менее 33 % и не более 300 % от установленной активности.

**Требование для относительной активности.**

Верхняя граница доверительного интервала ( $P = 0,95$ ) вычисленной относительной активности должна быть не менее 1,0.

## МЕТОД 2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VITRO*

Содержание антигена вируса гепатита В определяют иммунохимическим методом (2.7.1) с учетом критериев приемлемости, установленных результатов при валидации методики испытания *in vivo*.

Для количественного определения можно применять метод твердофазного иммуноферментного анализа и радиоиммунологический метод анализа с использованием моноклональных антител, специфичных в отношении иммуногенных эпитопов HBsAg. Для испытания используют подходящее количество разведений испытуемого образца и стандартного образца. Полученные данные анализируют с помощью модели параллельных прямых. Для определения HBsAg *in vitro* возможно использование коммерческих тест-систем, адаптированных к оценке количественного определения антигенной активности *in vitro*.

Критерии приемлемости для используемого стандартного образца утверждает уполномоченный орган на основании результатов валидации.