

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 6, Number 324 (2017), 170 – 175

**A. B. Sagymbay, M. M. Kassenov, B. M. Khairullin, Ye. N. Volgin, G. Zh. Sarsenbayeva,
A. S. Nurpeisova, N. V. Bogdanov, T. E. Issagulov, R. T. Abitay**

RSE "Scientific Research Institute for Biological Safety Problems" CS MES RK, village, Gvardeyskiy.
E-mail: altinai_S@mail.ru, sultanky170@mail.ru, aziz.nk@mail.ru, nurlan.akhmetsadykov@gmail.com

**STUDY OF STABILITY OF THE DOMESTIC
ALLANTOIC INACTIVATED SPLIT TRIVALENT
VACCINE AGAINST SEASONAL INFLUENZA**

Abstract. The article presents the results of tests of the main properties of the first domestic split vaccine against seasonal influenza during long-term storage. Vaccine quality control was carried out in accordance with the regulations adopted in the biological industry in the manufacture and control of vaccines intended for health. A study of the stability of vaccine quality at a temperature of (2–8)°C showed a slight change in the indices during storage for 12 months. Acknowledgment of the stability of the quality properties of this vaccine indicates that the production series meet specifications during the entire shelf life.

Key words: seasonal influenza, split vaccine, quality control, stability.

УДК 615.371:615.076:615.077

**А. Б. Сагымбай, М. М. Касенов, Б. М. Хайруллин, Е. Н. Волгин, Г. Ж. Сарсенбаева,
А. С. Нурпейсова, Н. В. Богданов, Т. Е. Исагулов, Р. Т. Абитай**

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК,
пгт. Гвардейский

**ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ КАЧЕСТВА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ
АЛЛАНТОИСНОЙ РАСЩЕПЛЕННОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ
ТРЕХВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СЕЗОННОГО ГРИППА**

Аннотация. В статье представлены результаты испытаний основных показателей первой отечественной аллантаоисной расщепленной инактивированной трехвалентной против сезонного гриппа при длительном хранении. Контроль качества вакцины проводился в соответствии с нормативами, принятыми в биологической промышленности при производстве и контроле вакцин, предназначенных для здравоохранения. Установлено, что показатели специфической активности и других параметров остаются стабильными в течение 12 месяцев при температуре (2–8)°C. Подтверждение стабильности данной вакцины свидетельствует о том, что производственные серии соответствуют спецификациям в течение всего срока хранения.

Ключевые слова: сезонный грипп, сплит-вакцина, контроль качества, стабильность.

Введение. Перспективность борьбы с гриппом с помощью вакцинации признается специалистами всего мира, что отражено в решениях Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и официальных документах Министерства здравоохранения РК. Вакцины против сезонного гриппа, как правило, являются трехвалентными и содержат комбинацию штаммов вирусов гриппа А и В с наибольшей прогнозируемой вероятностью циркуляции в предстоящем сезоне [1, 2]. В последние годы значительно возрос интерес к сплит-вакцинам. Преимущество сплит-вакцин в том, что они

содержат как наружные, так и внутренние антигены вируса гриппа, при этом они избавлены от самого главного недостатка цельновирионных вакцин – наличия токсинов. Наличие открытых для иммунной системы внутренних антигенов вируса гриппа делает сплит-вакцины уникальными. Они защищают не только от ежегодных мутаций вируса гриппа, но частично и от всех возможных разновидностей вируса, поскольку внутренние антигены подвержены лишь незначительным мутациям [3].

Сегодня в Казахстане отсутствует собственное производство сезонных противогриппозных вакцин. Для обеспечения населения страны качественной и эффективной отечественной вакциной против сезонного гриппа на базе Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности была разработана технология изготовления и проведен контроль качества инактивированной трехвалентной сплит-вакцины против сезонного гриппа.

Качество инактивированных гриппозных вирусных вакцин гарантируется во всем мире правилами национальных контролирующих органов, которые единообразно основаны на «Требованиях к инактивированным гриппозным вакцинам» ВОЗ (WHO, 1991). В Европейской и отечественной фармакопее указаны практически все нормативные показатели каждого этапа производства инактивированной вакцины [4, 5].

Одним из важных критериев для подтверждения неизменности показателей безопасности и эффективности медицинского препарата от даты выпуска до окончания срока годности является изучение стабильности. Стабильность препарата основывается на ряде принципов, которые необходимо учитывать при производстве вакцин и при их применении в клинической практике. Требования по стабильности должны предъявляться как к основным, так и вспомогательным веществам, входящим в состав препарата [6].

Понятие «стабильность лекарственного препарата» менялось с течением времени и до сих пор по-разному трактуется международными организациями и регуляторными органами. Наиболее широкое распространение получило определение FDA (Food and Drug Administration), которое звучит как «способность лекарственного средства сохранять свое соответствие спецификации, дающая гарантии его подлинности, активности, чистоты и качества». Без данных по стабильности невозможно пройти процедуру регистрации препарата ни в одной стране мира, невозможно обосновать и получить регуляторное одобрение на вносимые изменения [7].

Стабильность иногда определяется периодом времени от момента изготовления препарата до тех пор, пока его активность не уменьшится на 10%. При оценке стабильности фармацевтических препаратов считают, что снижение количества активного ингредиента при условиях, описанных для каждого частного случая, не должно превышать 10% от указанного содержания в течение 3 месяцев для экстенпоральных лекарственных форм и в течение от 3 до 4 лет в случае готовых лекарственных форм при условии, что не должны образовываться токсичные продукты разложения и не должны изменяться физико-химические и бактериологические свойства препарата [8].

Целью данной работы является изучение стабильности качества отечественной аллантоисной расщепленной инактивированной трехвалентной вакцины против сезонного гриппа путем анализа необходимых физических, химических и микробиологических характеристик по истечению определенного времени.

Материалы и методы. Для изготовления сезонной трехвалентной противогриппозной вакцины использованы рекомбинантные штаммы NIBRG-121xp (H1N1), A/NYMCX-217 (H3N2) и V/NYMC-BX49 вируса гриппа согласно рекомбинациям ВОЗ [9].

Три опытно-промышленные серии вакцины аллантоисной расщепленной инактивированной трехвалентной против сезонного гриппа.

Контроль концентрации водородных ионов проводили по ГФ РК I, том 1, 2.2.3.

Определение стерильности проводили в соответствии с ГФ РК I, т. 2, 2.6.1.

Специфическую безопасность проверяли согласно ГФ РК I, том 1, 2.6.9.

Определение концентрации гемагглютинина проводили методом одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД) [10].

Содержания общего белка определяли методом Лоури, с предварительным осаждением белка [11].

Определение овальбумина. Для определения содержания овальбумина использовали сертифицированный набор для иммуноферментного количественного определения овальбумина в растворах «Chicken egg Ovalbumin» фирмы «Elisa Kit Alpha diagnostic international» согласно инструкции производителя.

Определения детергента проводили фотоколориметрическим методом [12].

Испытания на бактериальные эндотоксины (ЛАЛ-тест) проводили гель-тромб методом в соответствии ГФ РК I, т. 1, 2.6.14.

Результаты исследований и их обсуждение

С использованием конечных моновалентных полуфабрикатов вакцины из штаммов NIBRG-121xp (H1N1), A/NYMCX-217 (H3N2) и B/NYMC-BX49 приготовлены три опытно-промышленные серии аллантоисной расщепленной инактивированной трехвалентной вакцины против сезонного гриппа. Технология приготовления данной вакцины подробно описана в работе [13]. Для составления готовой вакцины конечные моновалентные полуфабрикаты объединяли в асептических условиях таким образом, чтобы концентрация гемагглютинаина каждого штамма в конечном препарате приближалась к 15 ± 3 мкг/доза. Результаты определения биологических и физико-химических показателей, а также требования к ним, разработанные на основе рекомендаций ВОЗ, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты контроля качества опытно-промышленных серий аллантоисной расщепленной инактивированной трехвалентной вакцины против сезонного гриппа

Наименование параметров	Норма	Результаты		
		1 серия	2 серия	3 серия
Описание	Прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость	Соответствует		
Специфическая активность, мкг/дозу NIBRG-121xp A/NYMC X-217 B/NYMC-BX49	От 12,0 до 18,75 мкг/дозу	15,5мкг/доза 14,9мкг/доза 16 мкг/доза	16,1мкг/доза 15,7мкг/доза 15,8 мкг/доза	15,4 мкг/доза 15,0мкг/доза 14,3 мкг/доза
pH	От 6,8 до 7,4	7,05	7,0	7,2
Стерильность	Должен быть стерильным	Соответствует		
Бактериальные эндотоксины, МЕ/доза	≤ 100 МЕ/доза	10 МЕ/доза	10 МЕ/доза	10 МЕ/доза
Белок, мкг/доза	≤ 300 мкг/доза	286 мкг/доза	199 мкг/доза	198 мкг/доза
Овальбумин, мкг/доза	≤ 1 мкг/доза	0,85 мкг/доза	0,7 мкг/доза	0,1 мкг/доза
Детергенты (тригон-X100), мкг/доза	≤ 500 мкг/доза	500 мкг/доза	400 мкг/доза	290 мкг/доза
Специфическая безопасность	Не должен содержать живого вируса	Соответствует		

Вакцина имела вид прозрачной слегка опалесцирующая жидкости без осадка и посторонних включений, показатель pH составляли 7,05, 7,0 и 7,2. При определении подлинности было показано, что вакцина взаимодействовала с гомологичными типоспецифическими сыворотками и не взаимодействовала с гетерологичными сыворотками других типов и подтипов вируса гриппа. Образцы инактивированной трехвалентной сплит-вакцины против сезонного гриппа были стерильны, не содержали микоплазм и посторонних вирусов. Специфическая активность вируса гриппа в вакцине для каждого штамма варьировала от 14,3 мкг/доза до 16,1 мкг/доза. При изучении специфической безопасности на развивающихся куриных эмбрионах было установлено отсутствие живого вируса. Результаты контроля таких параметров, как бактериальные эндотоксины, общий белок, овальбумин и детергенты показали, что указанные параметры соответствует предъявляемым требованиям Государственной фармакопеи Республики Казахстан и Европейской фармакопеи.

Далее были проведены исследования по изучению стабильности качества вакцины. Для изучения стабильности использовались пять временных точек (0 мес., 3 мес., 6 мес., 9 мес., 12 мес.) в течение одного года хранения при температуре (2–8) °С. По истечению времени были изучены такие основные параметры качества и безопасности вакцины как внешний вид, pH, стерильность и специфическая активность. Степень варибельности отдельных серий должна обеспечивать уверенность в том, что будущие производственные серии будут соответствовать спецификациям в течение всего срока хранения. Внешний вид вакцины в течение 12 месяцев не был подвержен изменениям, вакцина также представляла собой слегка опалесцирующую бесцветную жидкость, посторонних образований не обнаружено. Концентрация водородных ионов вакцины для первой серии снизилась с 7,05 до 6,85, для второй серии с 7,0 до 6,9, для третьей серии с 7,2 до 7,05, что свидетельствует о незначительном изменении (не более 3%) концентрации водородных ионов. Все три опытно-промышленные серии инактивированной трехвалентной сплит-вакцины против сезонного гриппа были стерильны в каждой временной точке. В исследовании стабильности геммагглютинирующей активности при сравнении в исходных образцах вакцины и в образцах выдержанных в течение 12 месяцев при температуре (2–8)°С снижение активности составляло не более 1мкг/доза или не более 6,5%, что подтверждает стабильность вакцины. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты контроля стабильности качества опытно-промышленных серий аллантоисной расщепленной инактивированной трехвалентной вакцины против сезонного гриппа

Температура хранения	Серия вакцины	Сроки хранения, мес.	Показатели					
			Внешний вид	pH (от 6,8 до 7,4)	Стерильность	Специфическая активность		
						A/NIBRG-121x, мкг/доза	B/NYMC X-217, мкг/доза	B/NYMC BX-49, мкг/доза
2–8°С	Серия 1	0	Соответствует	7,05	Стерильно	15,5	14,9	16,0
		3	Соответствует	7,0	Стерильно	15,3	14,7	15,9
		6	Соответствует	6,9	Стерильно	15,1	14,5	15,7
		9	Соответствует	6,9	Стерильно	15,0	14,5	15,5
		12	Соответствует	6,85	Стерильно	14,6	14,3	15,0
	Серия 2	0	Соответствует	7,0	Стерильно	16,1	15,7	15,8
		3	Соответствует	7,0	Стерильно	16,0	15,5	15,4
		6	Соответствует	7,0	Стерильно	15,8	15,4	15,1
		9	Соответствует	6,95	Стерильно	15,5	15,2	14,9
		12	Соответствует	6,9	Стерильно	15,1	15,0	14,7
	Серия 3	0	Соответствует	7,2	Стерильно	15,4	15,0	14,3
		3	Соответствует	7,2	Стерильно	15,2	14,8	14,1
		6	Соответствует	7,1	Стерильно	15,0	14,5	14,0
		9	Соответствует	7,1	Стерильно	14,7	14,4	13,9
		12	Соответствует	7,05	Стерильно	14,5	14,2	13,6

Главной особенностью отечественной аллантоисной расщепленной инактивированной трехвалентной вакцины против сезонного гриппа является отсутствие консерванта (тиомерсала) в составе вакцины. Данные по контролю опытно-промышленных серий свидетельствуют о том, что данная вакцина соответствует требованиям нормативной документации по всем показателям и практически не имеют различий с вакцинами с добавлением консерванта, например, таких как Ваксигрип («Санофи Пастер», Франция), Флюарикс (GlaxoSmithKline, Бельгия), Гриппол (Россия) и т.д. В условиях хранения при температуре от 2 до 8°С отечественная вакцина без тиомерсала по физико-химическим свойствам и безопасности стабильны в течение всего срока годности, установленного для препаратов, содержащих тиомерсал.

Закключение. В результате проведенных исследований был проведен контроль качества первой отечественной аллантоиновой расщепленной инактивированной трехвалентной вакцины против сезонного гриппа. Получены три опытно-промышленные серии вакцины, которые по всем показателям соответствовали требованиям нормативной документации.

Изучение стабильности качества трех опытно-промышленных серий вакцины против сезонного гриппа подтвердило сохранение специфической активности и других параметров вакцины на уровне исходных. Подтверждение стабильности показателей качества данной вакцины свидетельствует о том, что производственные серии соответствуют спецификациям в течение всего срока хранения.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Шаханина И. Грипп и острые респираторные заболевания – приоритетная социально-экономическая проблема здравоохранения // Сб. Вакцинопрофилактика гриппа. – 1998. – С. 10-16.
- [2] WHO. A review of production technologies for influenza virus vaccines, and their suitability for deployment in developing countries for influenza pandemic preparedness // Contributed by J. Hickling, E. D'Hondt. Initiative for Vaccine Research. – Geneva, Switzerland – 2006. – 76 p.
- [3] WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifty-fourth report. WHO technical report series; 927. Annex 3. Recommendations for the production and control of influenza vaccines (inactivated). – Geneva, Switzerland, 2003. – P. 99-135.
- [4] European Pharmacopoeia 5.0. – 2005. – 671 p.
- [5] Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Т. 1. – Алматы: «Жібек жолы», 2008. – 592 с.
- [6] Миронов А.Н., Меркулов В.А., Бунятин Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). – М.: Гриф и К, 2012. – 536 с.
- [7] Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. ICH Revision 2. – November 2003.
- [8] Каковы фармакопейные требования на лекарственные препараты? [Электрон.ресурс]. URL:<http://pharmspravka.ru/farmatsevticheskie-vorosyi-i-otvetyi/kakovyi/kakovyi-farmakopeynye-trebovaniya-na-lekarstvennyie-prepar.html> (дата обращения: 26.05.2015)
- [9] Методические указания МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа». – 2003. – 31 с.
- [10] ФС 42-344 ВС-90 Фармакопейная статья. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Минздрав СССР. – 64 с.
- [11] Spectrophotometric method for the determination of nonionic surfactant [Электрон. ресурс]. – URL: <https://dowac.custhelp.com/ci/fattach/get/15510/0/filename/UV+Colorimetric+Method.pdf> (дата обращения: 14.04.2014).
- [12] Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season (en-GB). World Health Organization.
- [13] Асаджанова Н.Н., Кыдырбаев Ж.К., Рыскельдинова Ш.Ж., Касенов М.М., Хайруллин Б.М., Табынов К.К. Технологические аспекты изготовления первой казахстанской сплит-вакцины против сезонного гриппа // Биотехнология. Теория и практика. – 2016. – № 2. – С. 70-79.

REFERENCES

- [1] Shahanina I. (1998) Influenza and obstructive respiratory infections - priority social and economic problem health [Gripp i ostryerespiratornye zabolevaniya – prioritetnaja social'no-jekonomicheskaja problema zdavoohranenija]: 10-16. (In Russ.)
- [2] WHO. A review of production technologies for influenza virus vaccines, and their suitability for deployment in developing countries for influenza pandemic preparedness // Contributed by J. Hickling, E. D'Hondt. Initiative for Vaccine Research, 2006, 76 p. (in Eng.)
- [3] WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifty-fourth report. WHO technical report. Recommendations for the production and control of influenza vaccines (inactivated), 2003, 927, 3, 99-135. (in Eng.)
- [4] European Pharmacopoeia 5.0., 2005, 671 p. (in Eng.)
- [5] The state pharmacopoeias of the Republic of Kazakhstan [Gosudarstvennaja farmakopeja Respubliki Kazahstan]. Almaty: «Zhibekzholy», 2008. 592 p. (In Russ.)
- [6] Mironov AN., Merkulov VA., Bunjatin ND. Doclinic Medicine Research (Immunobiologicheskyye Druzy). [Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskijh issledovanij lekarstvennyh sredstv (Immunobiologicheskyye lekarstvennyye preparaty)]. M.: Grif i K, 2012. 536 p. ISBN: 978-5-8125-17667-0. (In Russ.)
- [7] Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. ICH Revision 2, 2003. (in Eng.)
- [8] URL: <http://pharmspravka.ru/farmatsevticheskie-vorosyi-i-otvetyi/kakovyi/kakovyi-farmakopeynye-trebovaniya-na-lekarstvennyie-prepar.html>. (In Russ.)
- [9] Methodological indications MU 3.3.2.1758-03 "Methods of identification of immunobiological preparations for diagnostics and diagnostics of influenza." [Metody opredelenija pokazatelej kachestva immunobiologicheskijh preparatov dlja profilaktiki i diagnostiki grippa], 2003. 31 p. (In Russ.)

[10] FS 42-344 VS-90 Pharmacopoeia article. Physico-chemical, chemical, physical and immunochemical methods of controlling medical immunobiological preparations. Ministry of Health of the USSR [Farmakopejnajastat'ja. Fiziko-himicheskie, himicheskie, fizicheskie i immunohimicheskie metody kontrolja medicinskih immunobiologicheskikh preparatov]. Minzdrav SSSR. 64 p. (In Russ.).

[11] Spectrophotometric method for the determination of nonionic surfactant. URL: <https://dowac.custhelp.com/ci/fattach/get/15510/0/filename/UV+Colorimetric+Method.pdf>

[12] Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season (en-GB). World Health Organization.

[13] Asanzhanova NN., KydyrbaevZhK., Ryskel'dinova ShZh., Kasenov MM., Khajrullin BM., Tabynov KK. (2016) Technological aspect of the first Kazakh Split Vaccine against the seasonal influenza [Tehnologicheskie aspekty izgotovlenija pervoj kazahstanskoj split-vakciny protiv sezonogo grippa] 2: 70-79. (In Russ.).

**А. Б. Сағымбай, М. М. Касенов, Б. М. Хайруллин, Е. Н. Волгин, Г. Ж. Сарсенбаева,
А. С. Нурпейсова, Н. В. Богданов, Т. Е. Исагулов, Р. Т. Әбітай**

РМК «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты»
ҒК БҒМ ҚР, Гвардейск қалашығы

ОТАНДЫҚ АЛЛАНТОИСТЫ ЫДЫРАТЫЛҒАН ИНАКТИВТЕЛГЕН МАУСЫМДЫҚ ТҰМАУҒА ҚАРСЫ ҮШ ВАЛЕНТТІ ВАКЦИНАНЫҢ САПА ТҰРАҚТЫЛЫҒЫН БАҚЫЛАУ

Аннотация. Аталмыш мақалада маусымдық тұмау вирусына қарсы отандық аллантоисты ыдыратылған инактивтелген үш валентті вакцинаның сапасын тексеру жұмыстарының нәтижелері көрсетілген. Сапалық көрсеткіштері бақылау денсаулық сақтау саласына арналған вакциналардың биологиялық өндіріс барысында дайындау мен сапасын қадағалау жөнінде қабылданған нормалар бойынша жүргізілді. Вакцинаның сапа тұрақтылығын 12 ай бойы (2–8)°С температура жағдайында зерттеу нәтижесінде, вакцинаның спецификалық белсенділігі мен басқа көрсеткіштері елеусіз өзгерістерге ұшырайтыны анықталды. Вакцинаның сапа тұрақтылығының расталғаны өндірістік сериялардың барлық көрсетілген сақтау мерзімдерінде препарат спецификалығына сәйкес келетінін дәлелдейді.

Түйін сөздер: маусымдық тұмау, сплит-вакцина, сапалық бақылау, тұрақтылық.