МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Иммуноглобулин ФС**

**человека противооспенный** Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека противооспенный, раствор для внутримышечного введения, применяемый в качестве лекарственного средства. Действующим началом препарата являются антитела, содержащиеся в иммуноглобулине G (Ig G) и обладающие специфической активностью к ортопоксвирусам.

К вспомогательным компонентам препарата относятся вещества, вносимые в препарат: стабилизатор – глицин (кислота аминоуксусная). Его количество должно быть отражено в нормативной документации производителя.

 ПРОИЗВОДСТВО

Иммуноглобулин человека противооспенный относится к специфическим иммуноглобулинам направленного действия, его выделяют только из плазмы крови здоровых доноров в соответствии с требованиями ОФС «Плазма для фракционирования».

Технология производства иммуноглобулина человека противооспенного идентична производствуиммуноглобулина человека: модифицированным методом фракционирования по Кону. Метод основан на физико-химических отличиях белков и их различной растворимости в присутствии этанола при низких температурах, различной ионной силе, диэлектрической постоянной и рН среды с использованием дополнительных методов хроматографической очистки и улучшенной технологии инактивации вирусов, гарантирующих вирусную безопасность лекарственного средства.

Выбор доноров, процессов производства и контроля на производстве иммуноглобулина противооспенного должны соответствовать требованиям ОФС «Иммуноглобулины человека». При инактивации вирусов химическими и фотохимическими методами в нормативной документации производителянеобходимо указать допустимую норму и метод определения данных веществ в готовом препарате.

Все процессы производства иммуноглобулина человека противооспенного должны быть валидированы. Производство иммуноглобулина человека противооспенного должно соответствовать правилам GMP, гарантирующим сохранение структуры и функции белков иммуноглобулина, обеспечивающих специфическую и вирусную безопасность препарата, исключающих контаминацию чужеродными агентами и включающих стадии, обеспечивающие инактивацию и элиминацию инфекционных агентов. Противовирусная эффективность препаратов иммуноглобулина человека противооспенного должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее, чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9,0 – 16,0 %).

 ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор, бесцветный или со слабо желтой окраской. В процессе хранения допускается появления незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

**Подлинность**. Испытание проводят с использованием двух методик.

1. Видоспецифичность. Должен обладать видовой специфичностью, свойственной только белкам сыворотки крови человека с использованием метода иммуноэлектрофореза в геле, указанным в нормативной документации производителя с использованием сыворотки для иммуноэлектрофореза против сывороточных белков крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи. В результате анализа, должны выявляться дуги преципитации только с сывороткой против сывороточных белков крови человека.

2. Специфичность антител. Должен содержать антитела к ортопоксвирусам. Определение проводят в реакции нейтрализации по разделу «Специфическая активность».

**Извлекаемый объем**. Извлекаемый объём должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объём лекарственных форм для парентерального применения» .

**Цветность.** Бесцветный или со светло-желтой окраской раствор (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**Прозрачность.** Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачности и степень мутности жидкостей».

**Механические включения**. Видимые механические включения должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

**рН.** От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Белок.** От 9,0 до 16,0 %. Определение проводят колориметрическим методом c биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

**Электрофоретическая однородность.** Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 97 % от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности сывороточных препаратов методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

**Молекулярные параметры.** Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЖЭХ», если нет других указаний в нормативной документации производителя. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %, фрагментов – не более 5 %.

**Фракционный состав**. Должна выявляться интенсивная дуга преципитации IgG и не более четырех дополнительных дуг. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле» с использованием сыворотки для иммуноэлектрофореза против сывороточных белков крови человека.

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Испытание проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Пирогенность.** Должен быть апирогенным**.** Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Объем вводимого препарата не должен превышать 1,5 мл на 1 кг массы кролика.

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность. Тест для вакцин и сывороток».

Препарат вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам с массой тела 17-20 г по 0,5 мл и двум морским свинкам с массой тела 250-300 г - по 5 мл (по 2,5 мл в каждый бок) подкожно. Наблюдение за животными проводят в течение 7 суток.

**Термостабильность.** Препарат в ампуле должен оставаться жидким и не образовывать гель после прогревания на водяной бане при температуре (56±1) °С в течение 4 ч. Определение проводят визуально.

**Специфическая активность (содержание антител**). Содержание антител кортопоксвирусам должен быть не менее 1:4000. Определение проводят в реакции нейтрализации. Исследуют смеси разведений иммуноглобулина с рабочим разведением вирусного материала на хорионаллантоисных оболочках (ХАО) 12-дневных куриных эмбрионов (КЭ).

Подготовка куриных эмбрионов.

Овоскопию куриных эмбрионов проводят в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Бракуют яйцо с погибшим эмбрионом или имеющее кровоизлияние под оболочкой. В центре воздушного мешка и на боковой поверхности яйца, на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3-4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл стерильного фосфатно-цитратного буферного раствора Мак-Ильвейна 0,004 М (ФЦБ), подогретого до температуры (50±5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37±1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и имеющие кровоизлияния.

Постановка реакции нейтрализации.

Для постановки реакции нейтрализации используют подготовленные куриные эмбрионы, стандартный образец активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины в качестве вируса и испытуемый иммуноглобулин.

Определяют рабочее разведение вируса титрованием на ХАО 12-дневных куриных эмбрионов. Для этого готовят ряд последовательных десятикратных разведений вируса на ФЦБ. По 6 куриных эмбрионов заражают каждым разведением вируса, нанося на ХАО по 0,1 мл. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37±1) °С, затем проводят учет результатов. Эмбрионы вскрывают, подсчитывают количество развившихся на ХАО оспин, рассчитывают среднее арифметическое для каждого разведения. Для нейтрализации используют то разведение вируса, которое дает на ХАО от 40 до 80 оспин, если нет других указаний в нормативной документации производителя.

Постановка основного опыта.

Готовят разведения иммуноглобулина человека противооспенного на ФЦБ 1:1000; 1:2000; 1:3000; 1:4000 (если нет других указаний в нормативной документации производителя) и контрольного отрицательного образца донорской сыворотки от 1:250 до 1:500 в количестве по 0,5-1,0 мл. Разведения иммуноглобулина и контрольного отрицательного образца донорской сыворотки смешивают с равным объёмом рабочего разведения вируссодержащей жидкости. После смешивания разведения удваиваются и становятся соответственно для проб иммуноглобулина: 1:2000; 1:4000; 1:6000; 1:8000, для контрольного отрицательного образца донорской сыворотки: 1:500; 1:1000. Смеси выдерживают при температуре (37±1) °С в течение двух часов. После чего наносят по 0,1 мл каждого разведения смеси на ХАО куриных эмбрионов, используя для каждой смеси по 5-6 эмбрионов. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37±1) °С. Эмбрионы вскрывают, рассчитывают среднее арифметическое количество оспин для каждого разведения иммуноглобулина и контрольного образца.

Чувствительность куриных эмбрионов к вирусу вакцины определяют в каждом испытании по значению показателя «Специфическая активность» стандартного образца активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины на ХАО КЭ согласно инструкции по его применению.

Учет результатов.

В исследовании должны быть подтверждены установленный показатель специфической активности стандартного образца активности специфичности и некротической активности оспенной вакцины. Титром препарата считают его конечное разведение, дающее нейтрализацию не менее 50 % оспин от числа оспин, образуемых с контрольным отрицательным образцом донорской сыворотки.

**Примечание.**

Фосфатно-цитратный буферный раствор Мак-Мльвейна 0,004 М, рН 7,2- 7,4.

Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Кислота лимонная – 2,1 г; вода очищенная − 100 мл;

Раствор 2: Натрия гидрофосфат додекагидрат – 35,6 г (перед взвешиванием просушивают при температуре от 35 до 39°С до постоянного веса), растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2,0 мл раствора 1 и 18,0 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь рН 7,2 – 7,4. Если рН полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если рН полученного раствора меньше 7,2 – приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при давлении (0,1±0,01) МПа, температуре (120±1) °С в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 суток в зависимости от способа укупорки флаконов.

**Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).** Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации.

**Антитела к вирусу гепатита С.** Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации.

**Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2).** Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена Р-24 Вич-1). Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.