

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении	ФС.3.3.1.0001.15 Взамен ГФ X, ст. 706, ФС 42-19ВС-86
---	---

Настоящая фармакопейная статья распространяется на аллерген туберкулезный рекомбинантный, который представляет собой гибридный белок с молекулярной массой около 27 кДа, состоящий из 2 антигенов CFP10-ESAT6, продуцируемый генетически модифицированной культурой *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT.

Аллерген туберкулезный рекомбинантный предназначен для диагностики туберкулеза.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата аллергена туберкулезного рекомбинантного должно осуществляться с соблюдением установленных правил организации производства и контроля качества генно-инженерных иммунобиологических лекарственных средств, гарантирующих качество и безопасность для человека.

Выращенную культуру клеток бактерий-продуцентов отделяют от среды и лизируют для высвобождения белка. Лизат клеток-продуцентов проходит стадии хроматографического выделения и очистки целевого белка-концентрата. Очищенный концентрат – полуфабрикат (субстанция) аллергена туберкулезного подлежит проверке на стерильность, отсутствие сенсibilизирующих свойств, содержание белка, специфичность, специфическую активность, аномальную токсичность. Стандартное разведение аллергена получают путем разведения концентрата

изотоническим фосфатным буферным раствором до содержания 0,2 мкг гибридного белка в 0,1 мл.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Бесцветная прозрачная жидкость без посторонних примесей.

Подлинность. Препарат при внутрикожном введении морским свинкам, зараженным тест-штаммом *Mycobacterium tuberculosis*, должен вызывать положительные кожные реакции, а у животных, иммунизированных вакциной БЦЖ, реакции должны отсутствовать (разделы «Специфическая активность», «Специфичность»).

Прозрачность. Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен быть бесцветным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Извлекаемый объем. Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

pH. От 7,35 до 7,55. Определяют потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность» на 5 мышах, тест-доза 0,5 мл.

Бактериальные эндотоксины. Не более 5 ЕЭ/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

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

Специфическая активность. В 0,1 мл препарата должно содержаться 0,2 мкг аллергена туберкулезного рекомбинантного. Индекс специфической

активности должен быть равен $(1,00 \pm 0,05)$. Испытание проводят на морских свинках, зараженных живой культурой *Mycobacterium tuberculosis*.

Морских свинок (альбиносов или белокожих Hartley) массой (350 ± 50) г содержат на постоянном пищевом рационе и в одинаковых условиях окружающей среды. Сенсибилизацию проводят путем заражения животных подкожно или аэрогенно вирулентным штаммом *M. tuberculosis*. Используют третью генерацию тест-штамма с плотной среды для выращивания микобактерий. Морских свинок используют для постановки проб не более 2 раз в период от 30 до 120 сут после инфицирования с интервалом между постановками проб не менее 30 сут. При повторном использовании животных пробы ставят на участках кожи, ранее не подвергавшихся воздействию препаратов.

За 24 ч до постановки туберкулиновых проб шерсть на спине или боках морских свинок удаляют сплошной полосой шириной 3–4 см.

Испытание препарата проводят на 6 зараженных микобактериями туберкулеза морских свинок. Заполняют 4 шприца испытуемым образцом и 4 шприца разведенным (0,2 мкг/0,1 мл) стандартным образцом (СО) аллергена туберкулезного рекомбинантного. Каждой морской свинке по методу случайных чисел вводят по 0,1 мл внутрикожно 4 пробы испытуемого образца и 4 пробы СО. Реакцию учитывают через 24 ч, измеряя 2 взаимно перпендикулярных диаметра эритемы в мм. Подсчитывают суммы реакций на испытуемый препарат и на СО. Специфическую активность оценивают по индексу специфической активности (I) – отношению суммы реакций на испытуемый препарат к сумме реакций на разведенный СО при отсутствии достоверных различий между средними реакциями на испытуемый препарат и СО. Если полученные результаты выходят за указанные пределы, испытание повторяют. Результаты 2 испытаний усредняют.

Специфичность. Морские свинки, иммунизированные вакциной БЦЖ, не должны реагировать на внутрикожное введение 0,2 мкг в 0,1 мл испытуемого аллергена туберкулезного рекомбинантного и давать

положительные реакции – папулы диаметром не менее 5 мм на 2 ТЕ в 0,1 мл СО очищенного туберкулина. Испытание проводят на 3 морских свинках не ранее чем через 30 дней после введения им по 0,5 мг вакцины БЦЖ.

Фенол. От 0,20 до 0,30 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение фенола спектрофотометрическим методом в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT – прототрофный штамм *E. coli* В (депонирован в ИБХ РАН), который обладает рядом характеристик, отличающих его от штамма предшественника: быстрый рост на минимальной среде, способность к синхронизации, устойчивый рост культуры в условиях биосинтеза белка и недостатка питательных веществ, дефектность системы рестрикции ДНК В-типа. Штамм несет оригинальную плазмиду pCFP10-ESAT6, содержащую генетическую конструкцию из 2 генов *M. tuberculosis* – *cfp10* и *esat 6* и ген устойчивости к ампициллину (*bla*). Штамм устойчив к ампициллину (100 – 150 мкг/мл) и чувствителен к остальным антибиотикам.

Для контроля качества препарата используют тест-штаммы *M.tuberculosis* (вирулентный) и *M. bovis* BCG - 1 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов.

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

Транспортирование. При температуре от 2 до 8 °С в условиях, исключающих замораживание. Допускается транспортирование при температуре не выше 18 °С в течение 15 дней.

Хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать!