

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Анатоксин дифтерийно-столбнячный

ФС.3.3.1.0003.15

адсорбированный с уменьшенным

содержанием антигенов

(АДС-М-анатоксин)

Взамен ФС 42 -3358 - 97

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологический лекарственный препарат - анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин), который представляет собой дифтерийный и столбнячный анатоксины, полученные из соответствующих экзотоксинов путем обезвреживания формальдегидом при нагревании; анатоксины очищены и адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

АДС-М-анатоксин предназначен для специфической профилактики дифтерии и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Все этапы производства АДС-М-анатоксина должны быть валидированы с целью подтверждения установленных требований и должны гарантировать безопасность его применения.

Столбнячный анатоксин

При производстве столбнячного анатоксина используют штаммы/штамм *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию столбнячного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение

свойств штаммов и предотвращать их контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, рН и содержание токсина.

Для производства столбнячного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее $15 \text{ L+}/_{100}$ в 1 мл. Детоксикация столбнячного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Определение специфической безопасности столбнячного анатоксина. Испытание проводят на 5 морских свинках массой 250–350 г, которым вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра) столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться признаки столбняка (ригидность лапки, искривление позвоночника или сочетание указанных признаков) и потери массы тела. Если более 1 животного гибнут по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдают гибель более 1 животного, столбнячный анатоксин испытание не проходит.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. Готовят раствор, содержащий столбнячный анатоксин, консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, вторую – при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам массой 250 – 350 г в объеме 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). Наличие признаков столбняка в течение 21 сут наблюдения за животными свидетельствует о присутствии в пробе столбнячного токсина.

Для характеристики очищенного столбнячного анатоксина определяют его рН, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность).

Столбнячный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-М-анатоксина используют только стерильный и безопасный столбнячный анатоксин с антигенной чистотой не менее 1000 ЕС (или Lf) на мг белкового азота.

Дифтерийный анатоксин

При производстве дифтерийного анатоксина используют токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae*, полученный и депонированный в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую продукцию дифтерийного токсина. Методы культивирования должны гарантировать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Токсинсодержащую культуральную жидкость, освобожденную от микробных клеток и продуктов их распада, проверяют на стерильность, рН и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина должна обеспечивать сохранение антигенной активности анатоксина и гарантировать его безопасность: отсутствие остаточной токсичности (специфическая безопасность) и реверсии токсических свойств.

Определение специфической безопасности дифтерийного анатоксина. Испытание проводят на 5 морских свинках массой 250 – 350 г, которым вводят подкожно 1500 Lf (суммарно в оба бока) дифтерийного анатоксина. В течение 42 сут наблюдения у животных не должны обнаруживаться изъязвления, инфильтраты, абсцессы, некрозы на местах инъекции и потеря массы тела. Если наблюдается гибель хотя бы 1 животного от дифтерийной интоксикации (красные надпочечники при

аутопсии погибших животных), дифтерийный анатоксин применению не подлежит. Если установлена гибель более 1 животного по причине, не связанной с дифтерийной интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель более 1 животного, дифтерийный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности дифтерийного анатоксина. Готовят раствор, содержащий дифтерийный анатоксин и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученную смесь делят на 2 части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. По 0,1 мл каждого образца вводят внутрикожно 2 морским свинкам массой 250 – 350 г или кролику массой $(2,5 \pm 0,5)$ кг в объеме 0,2 мл. Наличие реакций на месте инъекции в течение 4 сут наблюдения свидетельствует о присутствии во введенном растворе дифтерийного токсина.

Для характеристики очищенного дифтерийного анатоксина определяют его рН, специфическую (антигенную) активность, содержание общего и белкового азота, антигенную чистоту (удельную активность). Дифтерийный анатоксин должен быть очищен от примесей, вызывающих побочные реакции при введении человеку.

Для производства АДС-М-анатоксина используют только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин, содержащий не менее 1500 Lf на мг белкового азота.

Показатели, которые влияют на качество, но не могут быть определены в конечном продукте, должны быть проверены на промежуточных стадиях производства, что должно быть отражено в нормативной документации производителя.

Прививочная доза АДС-М-анатоксина (0,5 мл) содержит 5 Lf дифтерийного и 5 Lf/ЕС столбнячного анатоксинов. В состав лекарственного средства может входить консервант.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Опалесцирующая жидкость белого цвета, которая может иметь сероватый или желтоватый оттенок. При отстаивании разделяется на рыхлый осадок белого или белого с сероватым или желтоватым оттенком цвета, легко диспергирующийся при встряхивании, и прозрачную бесцветную надосадочную жидкость. Испытания проводят визуально в проходящем свете.

Подлинность. Должен обладать специфической (иммуногенной) активностью, обеспечивая защиту от действия дифтерийного и столбнячного токсинов (раздел «Специфическая активность»). Могут быть использованы альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного и столбнячного анатоксинов, обладающих антигенной активностью.

Механические включения. Видимые механические включения должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

pH. От 6,4 до 7,3, если нет других указаний в нормативной документации. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным АДС-М-анатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Размер частиц (дисперсность). Препарат АДС-М-анатоксина должен свободно проходить в шприц через иглу № 0840, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Время седиментационной устойчивости. После встряхивания и получения гомогенной взвеси не должно наблюдаться полного расслаивания в течение не менее 1 мин, если нет других указаний в нормативной документации производителя. Определение проводят в соответствии с ОФС

«Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность». Для посева используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30–35 и 20–25 °С.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Белым мышам массой 16 – 18 г препарат вводят внутривентрально по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должны наблюдаться гибель животных и потеря массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250 – 350 г 10 прививочных доз для человека (по 5 доз в бок и бедро). Через 30 дней все животные должны остаться живыми, без симптомов столбняка и потери массы тела. В случае гибели 1 животного или потери массы тела хотя бы 1 из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдают гибель более 1 животного, препарат считают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью, обеспечивая выживаемость 100 % иммунизированных животных при заражении летальной дозой дифтерийного токсина и не менее 70 % иммунизированных животных при заражении летальной дозой столбнячного токсина.

Материалы и животные:

– дифтерийный токсин с предварительно установленной величиной D_{1m} (минимальная доза токсина, вызывающая гибель животных в течение 4 сут);

– столбнячный токсин с предварительно установленной величиной Dlm;

– морские свинки массой 250 – 350 г;

– мыши белые беспородные массой 14–16 г.

Испытание иммуногенности дифтерийного компонента.

Неразведенный препарат вводят 4 морским свинкам массой 250–350 г однократно под кожу бока в дозе 0,6 мл, что соответствует $(6,0 \pm 0,3)$ Lf дифтерийного анатоксина. Через 30 сут определяют резистентность иммунизированных свинок к дифтерийному токсину, который вводят животным в дозе не менее 100 Dlm подкожно в бок в объеме 1 мл. За животными наблюдают 4 сут, в течение которых все морские свинки должны остаться живыми. Испытание сопровождают контролем 1 Dlm дифтерийного токсина на 3 морских свинках из той же партии. Контрольные животные (не менее 2) должны погибнуть в течение 4 сут.

Испытание иммуногенности столбнячного компонента. Препарат разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до 4 ЕС/мл и вводят группе из 10 белых мышей массой 16 – 18 г подкожно в область внутренней поверхности верхней трети бедра в дозе $(2,0 \pm 0,1)$ ЕС в объеме 0,5 мл. Через 21 сут определяют резистентность иммунизированных мышей к столбнячному токсину, который вводят животным в дозе не менее 50 Dlm под кожу внутренней поверхности верхней трети бедра в объеме 0,5 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут. Препарат считают выдержавшим испытание, если не менее 7 мышей останутся живыми без явлений столбняка. Опыт сопровождают контролем 1 Dlm столбнячного токсина на 4 мышах из той же партии. Контрольные животные (не менее 2) должны погибнуть в течение 4 сут.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf,

неадсорбированного столбнячного анатоксина – 0,1 ЕС, если нет других указаний в нормативной документации производителя.

Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов в надсадочной жидкости АДС-М-анатоксина. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надсадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции», неадсорбированного столбнячного анатоксина – в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания», если нет других указаний в нормативной документации.

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Производственные штаммы микроорганизмов. Раздел должен содержать следующую информацию: наименование штаммов; место их депонирования; допустимое количество пассажей (при необходимости) и методику их проведения с указанием условий культивирования; при необходимости – дополнительные к паспортным данным требования к характеристикам штаммов.

Консерванты. Тиомерсал. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15%. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах». Не рекомендуется использование консервантов при производстве лекарственных препаратов, выпускаемых в однодозовой расфасовке.

Сорбенты. Алюминия гидроксид. Не более 1,1 мг/мл алюминия(III), если в нормативной документации нет иных указаний. Определение

проводят комплексонометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение ионов алюминия в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах».

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

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Имунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С.