

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Пробиотики

ОФС.1.7.1.0008.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики.

Пробиотики – иммунобиологические лекарственные препараты, которые содержат живые или инактивированные апатогенные микроорганизмы (эубиотики), обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, а также продукты их жизнедеятельности или факторы роста для микробов нормофлоры (пребиотики) и их рациональные комбинации друг с другом (синбиотики). Эта группа препаратов оказывает положительные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма человека благодаря стабилизации и оптимизации функций его нормальной микрофлоры.

Эубиотики следует рассматривать как частную разновидность пробиотиков; наиболее часто данное определение распространяется на пробиотики, полученные из одного (или нескольких) штаммов живых бактерий, являющихся облигатными симбионтами организма человека (согласно современной терминологии термин «эубиотики» считается устаревшим). В дальнейшем в данной статье будет использоваться термин «пробиотики» для описания ИЛП на основе живых микроорганизмов и веществ микробного происхождения.

Пробиотики для медицинского применения предназначены для лечения

и профилактики острых и хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, полости рта, урогенитального тракта и др. органов инфекционной и неинфекционной природы (особенно при одновременном применении антибиотиков), сопровождающихся нарушениями нормальной микрофлоры у детей и взрослых, и для коррекции дисбиозов различной этиологии.

Пробиотики для медицинского применения по составу подразделяются на:

- *монокомпонентные* – пробиотики, полученные на основе одного штамма живых микроорганизмов;
- *поликомпонентные* – пробиотики, в состав которых входят несколько штаммов микроорганизмов, принадлежащих к одному или нескольким видам или родам, дополняющие или потенцирующие друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам;
- *сорбированные* – пробиотики, полученные на основе одного или нескольких штаммов микроорганизмов, сорбированных на частицах активированного угля, кремния диоксида коллоидного и других сорбентах;
- *комбинированные* – пробиотики, в состав которых помимо одного или нескольких видов микроорганизмов входят активные компоненты иной природы (например, лизоцим, инулин, действующие вещества лекарственных растений, витамины, микроэлементы, гормоны и др.), оказывающие терапевтическое воздействие на организм человека.

Пробиотики по таксономическим группам микроорганизмов, входящих в их состав, подразделяются на:

- *бифидосодержащие пробиотики* – содержат один или несколько видов живых бактерий рода *Bifidobacterium*;
- *лактосодержащие пробиотики* – содержат живые бактерии рода *Lactobacillus*, одного или нескольких видов;
- *колисодержащие пробиотики* – получены на основе одного или нескольких штаммов живых бактерий *Escherichia coli*;

- *споровые пробиотики* – получены на основе одного или нескольких видов живых непатогенных представителей рода *Bacillus*;
- *пробиотики других таксономических групп* – содержат живые апатогенные бактерии, принадлежащие к родам *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, и дрожжевые грибы – *Saccharomyces cerevisiae* и *S.boulaardii*.

Характеристика исходных компонентов и промежуточных продуктов, получаемых на разных этапах производства

Производственные штаммы

При производстве пробиотиков для медицинского применения используются производственные штаммы с подтвержденным клиническим эффектом, депонированные в национальной или международной коллекции, которые идентифицированы до вида (штамма) по фенотипическим и генотипическим признакам: по физиолого-биохимическим свойствам; спектру антагонистической активности к тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; по профилю внехромосомной ДНК (по содержанию или отсутствию) внехромосомных факторов наследственности – R-плазмид, транспозонов, бактериофагов; природе резистентности к антибиотикам (если данный признак имеет место). Пробиотические штаммы микроорганизмов должны быть апатогенны и безопасны, не продуцировать ферменты патогенности (каталазу, гиалуронидазу, фибринолизин, плазмокоагулазу, гемолизин, летициназу С, нейраминидазу и др.); в их геноме должны отсутствовать «островки патогенности». Кроме того, эти штаммы не должны быть чувствительными к воздействию желудочного сока, желчи и щелочей.

Для генетически модифицированных штаммов должно быть установлено отсутствие неконтролируемого переноса клонируемой ДНК, широкого распространения гибридной векторной плазмиды и вероятного нарушения микробной экосистемы, т.е. их биобезопасность. Молекулы ДНК,

используемые в качестве вектора, должны стабильно реплицироваться в клетке-реципиенте и не иметь маркеров антибиотикорезистентности. Рекомбинантные штаммы при многократном культивировании и длительном пассировании на лабораторных животных должны сохранять все первоначальные биологические свойства.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство пробиотиков должно осуществляться в отдельных помещениях, где не проводят работы с патогенными микроорганизмами и антибиотиками и соблюдены требования к защитным зонам, согласно действующим санитарным правилам. Не допускается производство пробиотиков на территории, на которой расположены производственные здания по производству антибиотиков. Обязательным условием технологического процесса производства пробиотиков является соблюдение принципа поточности, исключающего возможность перекреста промежуточных продуктов и полуфабрикатов, получаемых на разных стадиях производства, и их контаминацию посторонними агентами, в первую очередь посторонней микрофлорой.

При производстве пробиотиков проводят валидацию технологического процесса, технологического оборудования, сырья и методов контроля. Соответствие всех реагентов, материалов и сырья, используемых при производстве, нормативным требованиям должно быть подтверждено в установленном порядке; все материалы должны быть разрешены для использования при производстве ИЛП. Вспомогательные вещества, входящие в состав пробиотиков, должны использоваться в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Антибиотики не должны использоваться ни на одной из стадий получения лекарственного средства.

При производстве пробиотиков особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа

основных показателей качества для оценки их воспроизводимости, анализа качества готовой продукции при выпуске и в течение всего срока хранения.

Требования к производству пробиотиков для медицинского применения

А. Получение производственного штамма

Производственные питательные среды не должны содержать антибиотиков и компонентов, вызывающих аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Соответствие всех реактивов, реагентов и сырья, используемых при производстве питательных сред, нормативным требованиям должно быть подтверждено в установленном порядке, все материалы должны иметь сертификаты соответствия. Питательные среды должны обладать высокими ростовыми свойствами и быть стерильными.

Штаммы, используемые при производстве пробиотиков, должны ежегодно проверяться по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями, описанными ниже.

Подлинность. Штамм должен быть идентифицирован до вида с помощью микробиологических методов (например, микроскопического, бактериологического и др.), которые могут быть дополнены методами молекулярной биологии (например, амплификация нуклеиновых кислот или секвенирование). Штамм должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, биохимическими и культуральными свойствами. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Безопасность. Безопасность штамма определяется биологическими методами *in vivo* (например, исследованием безвредности, токсичности, токсигенности, вирулентности и т.п.) в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», которые могут быть дополнены методами молекулярной биологии.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Испытание выполняют с использованием набора селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост всех вероятных контаминантов.

Штамм не должен содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Антагонистическая активность. Антагонистическую активность штамма в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют бактериологически, например, методом отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов или методом совместного культивирования (определение проводят в соответствии с ОФС «Специфическая активность пробиотиков для медицинского применения»). Штамм должен проявлять антагонистическую активность по отношению к тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не должен угнетать рост представителей нормофлоры. Тест-штаммы должны быть депонированы в национальной или международной коллекции с указанием источника и даты выделения, и характеристики их биологических свойств.

Кислотообразующая активность. Определение активности кислотообразования препарата проводят титриметрическим методом в соответствии с ОФС «Специфическая активность пробиотиков для медицинского применения». Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т).

Хранение, упаковка. Производственный штамм хранят при температуре и прочих условиях, обеспечивающих его стабильность. Производственный штамм, расфасованный в первичную упаковку (ампулы, флаконы), в лиофилизированном виде хранят при температуре, обеспечивающей его стабильность.

Б. Получение посевного материала

Главный посевной материал микроорганизмов получают из производственного штамма, выращенного на адекватной среде в соответствующих условиях методом поверхностного или глубинного культивирования с последующей лиофилизацией.

Главный посевной материал должен соответствовать описанным ниже требованиям.

Подлинность. Подлинность посевного материала определяется микробиологическими методами. Культура должна обладать однородными морфологическими и культуральными свойствами. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Подлинность», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Испытание выполняют с использованием селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост всех потенциальных контаминантов. Культура не должна содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Хранение, упаковка. Маточную культуру расфасовывают в первичную упаковку и хранят в условиях, установленных для хранения производственного штамма.

В. Получение производственной биомассы

Производственную биомассу получают путем культивирования посевного материала двумя способами: стационарным (в бутылках) или глубинным (в реакторах) с последующим добавлением стабилизатора – среды высушивания.

Производственная биомасса должна соответствовать нижеперечисленным требованиям.

Подлинность. Подлинность посевного материала определяется микробиологическими методами. Культура должна обладать однородными морфологическими и культуральными свойствами.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Испытание выполняют с использованием селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост контаминантов. Культура не должна содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

рН. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Г. Этап розлива, лиофилизации и укупорки

Производственную биомассу разливают в первичную упаковку или поддоны и лиофилизируют при соответствующих условиях. Первичную упаковку (ампулы, флаконы) укупоривают в атмосфере инертного газа и проверяют на герметичность и потерю в массе при высушивании в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Д. Этап получения лекарственного препарата в различных лекарственных формах

Пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизаты во флаконе, суспензии, таблетки, капсулы, порошки, суппозитории. Показатели качества лекарственного средства оценивают по соответствующей лекарственной форме (лиофилизаты во флаконе, суспензии, таблетки, капсулы, порошки, суппозитории).

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного средства лекарственной формы таблетки, суппозитории и порошки оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки», «Суппозитории», «Порошки».

Описание. Приводится описание внешнего вида соответствующей лекарственной формы лекарственного средства.

Подлинность. Подлинность подтверждают микробиологическими методами (микроскопическим и/или бактериологическим). Испытание

проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не приведены другие требования.

Время восстановления препарата (для лиофилизатов, порошков). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты», либо по методике, описанной в нормативной документации, с указанием времени получения восстановленного препарата. Указывают применяемый растворитель (среда восстановления), его объем и, при необходимости, условия проведения испытаний (температура, режим перемешивания и пр.).

Время восстановления раствора (суспензии) для лиофилизатов – не более 5 мин, для порошков – не более 20 мин, если в нормативной документации нет других указаний.

Время распадаемости (для таблеток и капсул). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Время распадаемости указывают в нормативной документации. Указывают применяемый растворитель (среда распадаемости), его объем и, при необходимости, условия проведения испытаний (температура, режим перемешивания и пр.).

При проведении теста «Распадаемость» следует учитывать, что время распадаемости для таблеток не должно превышать 15 мин, для капсул – 20 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Температура и время плавления или время полной деформации (для суппозиториев). Для суппозиториев, изготовленных на липофильной основе, определяют температуру плавления по методу 2 (ОФС «Температура плавления»), которая не должна превышать 37⁰С, если нет иных указаний в нормативной документации. Если определение температуры плавления затруднительно, то определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиториев на липофильной основе». Время полной деформации не должно превышать 20

мин, если нет других указаний в нормативной документации.

pH. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Указывается допустимый интервал значений pH (в случае определения pH после восстановления препарата следует указать растворитель и его объем).

Потеря в массе при высушивании. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом. Требования к величине потери в массе при высушивании указывают в нормативной документации.

Если нет других указаний в нормативной документации, показатель потери в массе при высушивании должен составлять для:

- лиофилизатов – не более 3,5 %;
- капсул – не более 3,5 %;
- таблеток – не более 4,5 %;
- порошков – не более 5,0 %

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток, суппозиториев, содержимого капсул и пакетов). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Извлекаемый объем (для суспензий). Извлекаемый объем должен соответствовать требованиям, указанным в нормативной документации, и должен быть не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем».

Специфическая безвредность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются требования и критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля, и их количество; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность

наблюдения, учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не приведены другие требования.

Пробиотики должны соответствовать следующим требованиям:

- категории 5.3.А (для лекарственной формы лиофилизаты, суспензии, порошки);
- категории 5.3.Б (для лекарственной формы таблетки, капсулы, суппозитории, мази).

В нормативных документах на пробиотики для детей введены более строгие нормы, а именно:

- для детей (от 3 месяцев до 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы и др.), ректально (суппозитории) – не более 10 аэробных бактерий в 1 единице препарата/в г; при отсутствии в 1 единице препарата энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и дрожжевых и плесневых грибов;

- для детей (от 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы и др.), ректально (суппозитории) – не более 50 аэробных бактерий в 1 г препарата; при отсутствии в 1 единице препарата: энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, дрожжевых и плесневых грибов.

Специфическая активность. Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в одной дозе лекарственного средства, активностью кислотообразования или антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков». Описание метода может включать использование стандартных образцов, тест-штаммов, учитываемые показатели, методы расчета результатов и при необходимости их статистическую обработку.

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе препарата пробиотиков проводят методом серийных разведений с последующим высевом (при необходимости) на агаризованные питательные среды. При проведении контроля поликомпонентных или комбинированных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех штаммов, входящих в препарат.

Определение специфической активности пробиотиков дополнительно включает определение активности кислотообразования или антагонистической активности.

Антагонистическую активность лекарственного средства в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют методом отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов.

Определение активности кислотообразования препарата проводят титриметрическим методом. Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т).

Производственные штаммы и штаммы для контроля. Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

В разделе должна содержаться информация:

1. Наименование производственных штаммов и штаммов для контроля, обоснование для включения в производство (депонирование в официальных коллекциях).

2. Производственные штаммы и штаммы для контроля должны быть проверены на отсутствие контаминации и соответствующим образом охарактеризованы по биологическим, в том числе, биохимическим свойствам.

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков рекомендуется проводить не реже 1 раза в год, если в нормативной документации нет других указаний.

Упаковка и Маркировка. Раздел оформляется в соответствии с ОФС «Имунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и Хранение. Пробиотики для медицинского применения транспортируются и хранятся при температуре от 2 до 8 °С, если нет других указаний в нормативной документации. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного средства.