

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Тетраанатоксин

ФС.3.3.1.0009.15

адсорбированный

Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на тетраанатоксин адсорбированный, который представляет собой смесь ботулинических анатоксинов типов А, В и Е и столбнячного анатоксина, полученных из соответствующих экзотоксинов путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, которые адсорбированы на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте.

Тетраанатоксин предназначен для специфической профилактики ботулизма и столбняка.

ПРОИЗВОДСТВО

Ботулинические анатоксины типов А, В и Е и столбнячный анатоксин получают путем детоксикации соответствующих токсинов.

Для получения ботулинических и столбнячного токсинов используют высокотоксигенные штаммы *Clostridium botulinum*, продуцирующие ботулотоксины типов А, В и Е, и *Clostridium tetani*, полученные и депонированные в Государственной коллекции. Микробные клетки культивируют на жидких питательных средах, обеспечивающих высокую степень токсинообразования.

Прививочная доза тетраанатоксина (1 мл) содержит 5 ЕС ботулинического анатоксина типа А, по 3 ЕС ботулинических анатоксинов типов В и Е и 2,5 ЕС столбнячного анатоксина. В состав лекарственного средства может входить антимикробный консервант.

Методы детоксикации ботулинических и столбнячных экзотоксинов должны обеспечивать сохранение антигенной активности полученных

анатоксинов и гарантировать их безопасность – отсутствие остаточной токсичности и реверсии токсических свойств.

Ботулинические и столбнячный анатоксины должны быть максимально очищены от балластных примесей.

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.

ИСПЫТАНИЕ БОТУЛИНОЧЕСКИХ АНАТОКСИНОВ типов А, В и Е И СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНА НА СТАДИЯХ ПРОИЗВОДСТВА

Антигенная активность. Антигенную активность ботулинических и столбнячного анатоксинов выражают в единицах связывания (ЕС). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции анитоксинсвязывания». Для получения тетраанатоксина используют очищенные ботулинические анатоксины с активностью не ниже 200 ЕС/мл для анатоксина типа А, 80 ЕС/мл для анатоксина типа В и 20 ЕС/мл для анатоксина типа Е, для столбнячного анатоксина не ниже 200 ЕС/мл .

Удельная активность. Ботулинические анатоксины типа А, В и Е должны обладать удельной активностью соответственно не ниже 1000, 500 и 150 ЕС на мг белкового азота. Столбнячный анатоксин должен обладать удельной активностью не ниже 1000 ЕС на мг белкового азота.

Специфическая безопасность столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков столбняка (ригидность лапки, искривление позвоночника, или сочетание указанных признаков) и потери массы тела.

5 морским свинкам с массой тела 250–350 г вводят подкожно 1500 ЕС столбнячного анатоксина (суммарно в бок и внутреннюю поверхность верхней трети бедра). Если более одного животного гибнет по причине, не

связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, столбнячный анатоксин считают не прошедшим испытание.

Специфическая безопасность ботулинических анатоксинов. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков специфической интоксикации и некрозов в месте инъекции.

5 морским свинкам с массой тела 300–350 г вводят подкожно не менее 600 ЕС ботулинического анатоксина типа А, 120 ЕС ботулинического анатоксина типа В или 60 ЕС ботулинического анатоксина типа Е в объеме 5 мл (по 2,5 мл в область правого и левого бока). К 21 суткам наблюдения не должно наблюдаться потери массы тела. Если более одного животного гибнут по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном испытании гибнет более одного животного, анатоксин считают не прошедшим испытание.

Реверсия токсичности ботулинических анатоксинов. Анатоксины, выдержанные при температуре (37 ± 1) °С и при температуре от 2 до 8 °С не должны вызывать симптомов специфической интоксикации.

Готовят растворы ботулинических токсинов, содержащие в 1 мл 5 ЕС ботулинического токсина типа А, 3 ЕС ботулинических токсинов типов В или Е и консервант (при его наличии) в 0,9 % растворе натрия хлорида в концентрации, принятой для готового продукта. Полученные смеси делят на две части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. Каждый образец вводят внутрибрюшинно 5 белым мышам с массой тела (17 ± 1) г в объеме 1 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут.

Реверсия токсичности столбнячного анатоксина. В течение 21 сут наблюдения у животных не должно наблюдаться признаков столбняка. 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 две части и выдерживают в течение 42 сут: первую – при температуре (37 ± 1) °С, вторую – при температуре от 2 до 8 °С. Каждый образец вводят подкожно 5 морским свинкам с массой тела 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.

ИСПЫТАНИЯ

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

Подлинность. Должен содержать анатоксины – ботулинические типов А, В и Е и столбнячный, обладающие специфической активностью, обеспечивая защиту от действия соответствующих токсинов (раздел «Специфическая активность»). В нормативной документации производителя могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве ботулинических и столбнячного анатоксинов.

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

рН. От 6,0 до 7,0, если в нормативной документации нет других указаний. Испытания проводят потенциометрическим методом с неразведенным тетраанатоксином в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Размер частиц (дисперсность). Препарат 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. Определение проводят в соответствии с ОФС «Инъекционные лекарственные формы. Лекарственные средства для парентерального применения».

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытания проводят методами прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность». Для контроля 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 препарат вводят внутрибрюшинно по 1 мл, морским свинкам – подкожно по 5 мл (по 2,5 мл в оба бока).

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным. Испытания проводят при подкожном введении 5 морским свинкам массой (325 ± 25) г 5 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в оба бока). Через 21 сут все животные должны остаться живыми без признаков специфической интоксикации. В случае гибели или потери массы тела 1 из животных от неспецифических причин испытание повторяют. Если при повторном испытании гибнет более 1 животного, лекарственный препарат не соответствует требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью в отношении каждого из анатоксинов, входящих в его состав. Выживаемость иммунизированных мышей при летальном заражении должна составлять не менее 70 % для каждого компонента

препарата. Условия проведения испытания по оценке иммуногенной активности компонентов препарата представлены в табл.

Таблица – **Схема опыта по испытанию специфической (иммуногенной) активности тетраанатоксина**

Компонент тетраанатоксина	Иммунизирующая доза		Разрешающая доза токсина/ способ введения
	ЕС	мл	
Анатоксин ботулинический типа А	5	1,0	25 LD ₅₀ /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа В	1,2	0,4	50 LD ₅₀ /внутривенно
Анатоксин ботулинический типа Е	1,2	0,4	25 LD ₅₀ /внутривенно
Анатоксин столбнячный	2,0	0,8	100 LD ₅₀ /подкожно

Испытания специфической активности ботулинических анатоксинов типов А, В и Е, входящих в состав тетраанатоксина, проводят на мышах линии Balb/c, столбнячного анатоксина – на белых беспородных мышах или мышах линии Balb/c (самцах и самках) массой (17 ± 1) г. Иммунизацию для оценки специфической активности ботулинических анатоксинов проводят внутрибрюшинно, столбнячного анатоксина – подкожно, в область внутренней поверхности верхней трети бедра группам из не менее чем 10 животных. Разрешающие дозы токсинов вводят животным внутривенно спустя 21 сут после иммунизации. Опыты сопровождают контролем активности токсинов при введении по 0,5; 1 и 2 LD₅₀ каждого токсина не менее чем 4 животным из той же партии. Наблюдение за животными проводят в течение 4 сут. Результаты опыта учитывают, если при контроле активности токсинов введение дозы 2 LD₅₀ вызвало гибель 100 % животных, а дозы, равной 1 LD₅₀, – не менее 50 % мышей к концу срока наблюдения.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного ботулинического анатоксина типа А должно быть не более 0,25 ЕС, типов В и Е – 0,15 ЕС, неадсорбированного столбнячного анатоксина – не более 0,1 ЕС, если нет других указаний в нормативной документации. Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированных ботулинических и столбнячного анатоксинов в

надосадочной жидкости препарата. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции антитоксинсвязывания».

Формальдегид. Не более 100 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом 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. Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не превышать указанную на упаковке более чем на 15 %. В качестве консерванта наиболее часто используется тиомерсал. 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 1,2 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

«Иммунобиологические лекарственные препараты». На первичную упаковку наносят дополнительное указание: «Встряхивать!». На вторичную упаковку наносят дополнительные указания: «Перед употреблением встряхивать», «Замораживание не допускается».

Транспортирование и хранение. Должен транспортироваться и храниться при температуре от 2 до 8 °С.