

## ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

**Вакцина менингококковая**

**ФС.3.3.1.0015.15**

**серогруппы А полисахаридная**

**сухая**

**Взамен ФС 42-3720-99**

---

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину менингококковую серогруппы А полисахаридную сухую, представляющую собой лиофилизат очищенного капсульного полисахарида *Neisseria meningitidis* серогруппы А.

Полисахарид *Neisseria meningitidis* серогруппы А состоит из частично О-ацетилированных повторяющихся фрагментов N-ацетилманнозамина, связанных 1 $\alpha$ -6 фосфодиэфирными связями.

### ПРОИЗВОДСТВО

Технология получения вакцины менингококковой полисахаридной серогруппы А предусматривает культивирование штамма-продуцента в жидкой питательной среде Франца с последующим выделением из полученной биомассы полисахарида менингококка серогруппы А и его очисткой.

Процесс культивирования производственного штамма *N. meningitidis* должен осуществляться на плотных питательных средах, не содержащих элементов крови и других субстратов животного происхождения. Весь производственный процесс, основанный на использовании системы посевного материала и обеспечивающий стабильное получение вакцины для профилактики менингококковой инфекции серогруппы А с требуемой иммуногенностью и безопасностью для человека, должен быть валидирован.

**Посевной материал.** Штамм-продуцент *N. meningitidis* должен быть охарактеризован по источнику его выделения и способности продуцировать полисахарид серогруппы А. Производственный штамм *N. meningitidis* серогруппы А должен обладать следующими свойствами:

- на питательном агаре с добавлением 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота должен образовывать круглые, гладкие, прозрачные, бесцветные блестящие колонии с ровными краями, слегка выпуклые, мягкие по консистенции, которые легко снимаются с поверхности среды. Диаметр колоний должен быть от 0,5 до 2 мм. В косопроходящем свете колонии должны иметь ярко-оранжевую окраску с радужным свечением;

- в мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамотрицательные диплококки, расположенные парами в виде «кофейных зерен», а также тетрадами или скоплениями;

- культура тест-штамма должна быть оксидазоположительна;

- культура тест-штамма должна разлагать глюкозу и мальтозу с образованием уксусной кислоты и не должна разлагать лактозу, сахарозу и фруктозу;

- суспензия культуры тест-штамма должна вступать в реакцию агглютинации только со специфической сывороткой серогруппы А и не агглютинироваться сыворотками против других серогрупп менингококков, а также не давать спонтанную реакцию агглютинации в 0,9 % растворе натрия хлорида.

Бактериологическая чистота штамма-продуцента должна быть подтверждена посевом на чувствительные питательные среды, исследованием морфологии колоний, микроскопией мазков, окрашенных по Граму, а также постановкой реакции агглютинации со специфической и неспецифическими сыворотками.

На этапе культивирования производственного штамма с целью получения конечного объема биомассы используют жидкую полусинтетическую среду, не содержащую субстанций, которые могут

осаждаться цетилтриметиламмония бромидом, а также не содержащую элементов крови или высокомолекулярных полисахаридов.

Бактериологическая чистота полученной биомассы должна оцениваться и подтверждаться методами, применяемыми для оценки чистоты штамма-продуцента. Бактериальный сбор центрифугируют и осаждают полисахарид из надосадочной жидкости добавлением цетилтриметиламмония бромида до его конечной концентрации 0,01 %, после чего следует экстракция полисахарида из цетавлон-полисахаридного комплекса раствором кальция хлорида. Полученный полисахарид хранят при температуре минус 20 °С.

Субстанцией полисахаридной менингококковой вакцины серогруппы А является полисахарид, очищенный от нуклеиновых кислот, белка и липополисахарида путем ступенчатого фракционирования этанолом и экстракцией фенолом. Очищенную субстанцию сушат в эксикаторе до постоянной массы над прокаленным кальция хлоридом и хранят при температуре минус 20 °С.

На стадии производства субстанцию испытывают по следующим показателям:

**Подлинность.** Субстанция должна тормозить реакцию пассивной гемагглютинации (положительная РТПГА) в гомологичной «А» системе в концентрации, не превышающей 0,4 мкг полисахарида в 1 мл, при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе с содержанием полисахарида 50 мкг/мл (см. подраздел «Подлинность» раздела «Испытания»).

**Белок.** Не более 1 %. Определение проводят по методу Лоури без предварительного осаждения белка в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5 мг/мл.

**Нуклеиновые кислоты.** Не более 1 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в иммунобиологических лекарственных препаратах». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 5,0 мг/мл.

**О-ацетильные группы.** Не менее 2 мкмоль/мг. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение О-ацетильных групп». Субстанцию предварительно растворяют в воде очищенной до концентрации 1 мг/мл.

**Фосфор.** Не менее 8 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора в иммунобиологических лекарственных препаратах».

**Молекулярные параметры.** Не менее 65 % полисахарида, элюируемого до достижения значения коэффициента распределения  $K_d$ , равного 0,50 (подраздел «Молекулярные параметры» раздела «Испытания»).

**Пирогенность.** Субстанция должна быть апиrogenной. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-дозу 0,025 мкг/мл вводят по 1 мл на 1 кг массы животного.

## ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Аморфная масса в форме таблетки или рыхлого порошка от белого до беловато-серого цвета. Восстановленный препарат - бесцветный или желтоватого цвета раствор. Определение проводят визуально.

**Подлинность.** Вакцина должна вызывать торможение реакции пассивной гемагглютинации (положительная РТПГА) в гомологичной «А» системе, не превышающей 0,4 мкг полисахарида в 1 мл, при отсутствии тормозящего эффекта в гетерологичной «С» системе с содержанием полисахарида 50 мкг в 1 мл.

Ингредиенты для проведения реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА):

- исследуемый раствор вакцины, содержащий 50 мкг полисахарида серогруппы А в 1 мл;

- менингококковые сыворотки серогрупп А и С, и диагностикумы менингококковые эритроцитарные серогрупп А и С;

- 0,9 % раствор натрия хлорида.

*Определение рабочего разведения менингококковых диагностических сывороток.* Для приготовления рабочего разведения менингококковых диагностических сывороток определяют их специфический титр в РТПГА с диагностикумами эритроцитарными менингококковыми серогрупп А и С. Для постановки РТПГА используют круглодонный планшет для иммунологических реакций однократного применения. В 2 ряда лунок, начиная со второй, вносят по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. В первые лунки вносят по 100 мкл менингококковых сывороток серогрупп А и С, разведенных 1:10 с помощью 0,9 % раствора натрия хлорида. Далее готовят двукратные последовательные разведения каждой сыворотки, перенося из лунки в лунку по 50 мкл сыворотки. Из последней лунки 50 мкл разведения сыворотки удаляют. Затем в каждую лунку прибавляют по 25 мкл эритроцитарного диагностикума, гомологичного сыворотке. В 4 лунки (контроль отсутствия спонтанной агглютинации диагностикума) вносят по 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. В 2 лунки добавляют по 25 мкл диагностикума серогруппы А, а в 2 другие – по 25 мкл диагностикума серогруппы С. После перемешивания ингредиентов путем покачивания планшет помещают в термостат при температуре от 36 до 38 °С на 2 – 2,5 ч, после чего проводят учет результатов. Последнее разведение сывороток, в котором наблюдается агглютинация почти всех эритроцитов с малозаметным кольцом из осевших неагглютинированных эритроцитов, является титром сыворотки и содержит 1 гемагглютинирующую единицу (ГАЕ). Предыдущее разведение содержит 2 ГАЕ и используется в качестве рабочего разведения сыворотки.

В контрольных лунках агглютинация должна полностью отсутствовать, а эритроциты выпадать на дно лунки в виде полусфер.

*Проведение РТПГА.* В первые лунки 2 рядов планшета для иммунологических реакций вносят по 50 мкл испытуемого раствора вакцины менингококковой серогруппы А в исходной концентрации 50 мкг в 1 мл. В остальные лунки вносят по 25 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем исходные растворы вакцины титруют путем двукратных разведений в объеме 25 мкл до 12-й лунки включительно; из последней лунки 25 мкл удаляют. В каждую лунку первого ряда добавляют по 25 мкл рабочего разведения гомологичной сыворотки. В каждую лунку второго ряда добавляют по 25 мкл гетерологичной сыворотки. После 15 – 20 мин экспозиции при температуре от 18 до 22 °С в каждую лунку добавляют по 25 мкл эритроцитарного диагностикума, гомологичного добавленной сыворотке. Таким образом, в 1 ряду реагирующая смесь будет состоять из гомологичных вакцине сыворотки и эритроцитов, во втором ряду – из вакцины и гетерологичных ей сыворотки и эритроцитов. Реакцию учитывают после 1,5 – 2 ч инкубирования в термостате при температуре от 36 до 38 °С. После окончания инкубации отмечают минимальную концентрацию вакцины, которая подавляет агглютинацию эритроцитов. Специфичность вакцины подтверждается, если задержка гемагглютинации наблюдается только в гомологичной системе.

Контролем являются отсутствие спонтанной агглютинации и проверка правильности выбранного рабочего разведения сыворотки.

**Время растворения.** Содержимое ампулы должно полностью раствориться в 2,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида в течение 1 мин при встряхивании.

**Прозрачность восстановленного раствора.** Восстановленная вакцина должна выдерживать сравнение с эталоном I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей». Содержимое 4 ампул растворяют в 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

**Цветность восстановленного раствора.** Восстановленная вакцина должна выдерживать сравнение с эталоном Y<sub>4</sub>. Определение проводят в

соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей». Содержимое 4 ампул растворяют в 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

**Механические включения.** Восстановленная вакцина должна соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 2,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

**Точность розлива.** Не более 10 %. Определение проводят весовым методом. 20 ампул без этикеток обрабатывают смесью спирта с эфиром и помещают в эксикатор на 3 ч. Затем верхнюю часть каждой ампулы надпиливают и удаляют. Вскрытые ампулы с веществом взвешивают на аналитических весах, после чего содержимое удаляют, ампулы промывают водой, ополаскивают водой очищенной. После этого ампулы выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы. По разности масс ампулы с содержимым и без него рассчитывают коэффициент вариации ( $V$ ) в процентах по формулам:

$$V = \frac{S \cdot 100}{\bar{x}},$$
$$S = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{x})^2}{n - 1}},$$

где  $S$  – стандартное отклонение;

$\bar{x}$  – среднее арифметическое значение массы вещества в ампуле;

$X$  – масса вещества в каждой ампуле;

$n$  – число ампул.

**Фосфор.** Содержание фосфора в вакцине должно быть не менее 7,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора в иммунобиологических лекарственных препаратах».

**Молекулярные параметры.** Не менее 65 % полисахарида, элюируемого до достижения значения коэффициента распределения  $K_d = 0,50$ . Определение молекулярных параметров проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с методикой, изложенной в нормативной документации, где должны быть указаны: размер хроматографической колонки, характеристика носителя и способ его приготовления, методика приготовления элюирующего раствора, количество и способ введения испытуемого и стандартных образцов, скорость элюирования подвижной фазы, условия калибрования колонки, объем элюируемых фракций, процедура сбора фракций.

**Содержание полисахарида.** Вакцина должна содержать не менее 70 % и не более 130 % полисахарида, входящего в состав препарата. Содержание полисахарида рассчитывают путем пересчета содержания фосфора на полисахарид или иммунохимическим методом, описанным в нормативной документации.

**Стерильность.** Вакцина должна быть стерильна. Определение проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Аномальная токсичность.** Вакцина должна быть нетоксичной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для 5 белых мышей – по 100 мкг полисахарида внутрибрюшинно, тест-доза для 2 морских свинок – по 500 мкг полисахарида внутрибрюшинно. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

**Пирогенность.** Вакцина должна быть апиrogenной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза 0,025 мкг/мл полисахарида вводится по 1 мл на 1 кг массы животного.

**Содержание лактозы.** Должно быть в пределах  $(10 \pm 1)$  мг в пересчете на ампулу. Определение проводят в соответствии с ОФС «Рефрактометрия». В 3 ампулы с вакциной добавляют по 1 мл воды очищенной. Содержимое ампул объединяют. На призму рефрактометра наносят 1 каплю раствора испытуемого образца и определяют показатель преломления. По

калибровочному графику находят концентрацию лактозы. Содержание лактозы в 1 ампуле вычисляют как среднее арифметическое 3 измерений.

*Построение калибровочного графика.* В 10 стеклянных пробирок вносят пипеткой по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 и 1 мл основного раствора лактозы, доводят объем водой очищенной до 1 мл и перемешивают (содержание лактозы соответственно: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5 и 25 мг/мл). Измеряют показатель преломления каждого раствора и строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество лактозы в мг/мл, а по оси ординат – показатель преломления. Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

**Примечание.**

Приготовление 2,5 % основного раствора лактозы. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде очищенной 2,5 г лактозы моногидрата при нагревании на водяной бане при температуре не выше 60 °С. Объем раствора доводят водой до метки и перемешивают. Перед использованием охлаждают до комнатной температуры. Основной раствор используют свежеприготовленным.

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

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».