

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Иммуноглобулин

ФС.3.3.1.0039.15

человека противооспенный

Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека противооспенный, раствор для внутримышечного введения, применяемый в качестве лекарственного средства для лечения и экстренной профилактики натуральной оспы. Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G (IgG), обладающие специфической активностью к ортопоксвирусам.

Иммуноглобулин человека противооспенный относится к специфическим иммуноглобулинам направленного действия.

В составе препарата могут содержаться вспомогательные компоненты: стабилизатор – глицин (аминоуксусная кислота). Его количество должно быть отражено в нормативной документации.

ПРОИЗВОДСТВО

Иммуноглобулин человека противооспенный выделяют из плазмы крови здоровых доноров, предварительно иммунизированных оспенной вакциной в соответствии с инструкцией по применению. Плазма крови здоровых доноров должна соответствовать требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования» и содержать антитела к ортопоксвирусам в титре не менее 1:200.

Иммуноглобулин человека противооспенный производится модифицированным методом фракционирования по Кону (метод водно-спиртового осаждения на холоде). Метод основан на физико-химических

отличиях белков и их различной растворимости в присутствии этанола при низких температурах, различной ионной силе, диэлектрической постоянной и рН среды.

Производство иммуноглобулина человека противооспенного должно осуществляться с соблюдением установленных правил организации производства и контроля качества лекарственного препарата, гарантирующих сохранение структуры и функции белков иммуноглобулинов, обеспечивающих специфическую и вирусную безопасность препарата, исключающих его контаминацию чужеродными агентами, а также должно включать стадии производства, обеспечивающие инактивацию и элиминацию инфекционных агентов. Методы очистки и инактивации вирусов указывают в нормативной документации. При инактивации вирусов химическими и фотохимическими методами в нормативной документации производителя необходимо указывать допустимую норму и метод их определения в готовом препарате. Выбор доноров, процессов производства и контроля на производстве иммуноглобулина противооспенного должны соответствовать требованиям ОФС «Иммуноглобулины человека».

Противовирусная эффективность препарата иммуноглобулина человека противооспенного должна быть обеспечена соответствующей степенью концентрации антител в процессе производства (не менее чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9 – 11 %).

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Прозрачный или слабо опалесцирующий раствор, бесцветный или со светло - желтой окраской, если в нормативной документации не указаны другие требования. В процессе хранения допускается появления незначительного осадка, исчезающего при легком встряхивании. Определение проводят визуально.

Подлинность. При испытании определяют следующие параметры подлинности препарата:

1. **Видоспецифичность.** Должен обладать видовой специфичностью, свойственной только белкам сыворотки крови человека. Для определения видоспецифичности белков, входящих в состав препарата иммуноглобулина человека противооспенного, применяют метод иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки для иммуноэлектрофореза против белков из сыворотки крови человека, крупного рогатого скота, лошади и свиньи в соответствии с указаниями в нормативной документации в соответствии с ОФС «Имуноэлектрофорез в агаровом геле». В результате анализа должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека. Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Имунодиффузия в геле».

2. **Специфичность антител.** Должен содержать антитела к ортопоксвирусам. Определение проводят в реакции нейтрализации, в соответствии с разделом «Специфическая активность».

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

Цветность. Бесцветный или светло-желтый раствор (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Допустимо спектрофотометрическое определение оптической плотности раствора. Метод определения указывают в нормативной документации.

Прозрачность. Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор (если нет других указаний в нормативной документации). Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачности и степень мутности жидкостей».

Допустимо спектрофотометрическое определение оптической плотности испытуемого раствора иммуноглобулина. Метод определения указывают в нормативной документации.

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

pH. От 6,6 до 7,4. Испытуемый образец разводят до 1 % концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Белок. От 9 до 11 %. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Определение белка».

Электрофоретическая однородность. Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы».

Молекулярные параметры. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ», если нет других указаний в нормативной документации.

Фракционный состав. Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более 4 дополнительных линий. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Имуноэлектрофорез в агаровом геле» с использованием сыворотки для иммуноэлектрофореза против белков сыворотки крови человека.

Термостабильность. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре $(56 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 4 ч. Определение проводят визуально.

Стерильность. Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Пирогенность. Должен быть апиrogenным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Объем вводимого препарата не должен превышать 1,5 мл на 1 кг массы кролика.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Препарат вводят внутривбрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г по 0,5 мл и 2 морским свинкам массой 250 – 300 г – по 5 мл (по 2,5 мл в каждый бок) подкожно. Наблюдение за животными проводят в течение 7 сут.

Специфическая активность. Содержание антител к ортопоксвирусам должно быть не менее 1:4000. Определение проводят в реакции нейтрализации путем введения смеси разведений иммуноглобулина с рабочим разведением вирусного материала на хорионаллантоисные оболочки (ХАО) 12-дневных куриных эмбрионов.

Методика испытания

Подготовка куриных эмбрионов. Проводят овоскопию куриных эмбрионов в затемненном помещении. Каждый эмбрион просматривают в направленном пучке света. Свет должен падать сверху на тупой конец яйца. Яйцо с погибшим эмбрионом или с кровоизлиянием под оболочкой бракуют. В центре воздушного мешка на тупом конце яйца и на боковой поверхности яйца, на участке между сосудами и их ответвлениями карандашом делают отметку. В местах отметок с соблюдением правил асептики пропиливают бормашиной с абразивным диском отверстия (щели) длиной 3 – 4 мм и шириной 1,5 мм, не повреждая оболочки. Яйцо укладывают так, чтобы отверстие на боковой стороне было обращено вверх. Подскорлупную оболочку в центре воздушного мешка прорывают плоской полукруглой хирургической иглой. Затем на отверстие, расположенное на боковой поверхности, вносят 0,1 мл 0,004 М стерильного фосфатно-цитратного буферного (ФЦБ) раствора Мак-Илвейна, подогретого до температуры (50 ±

5) °С, и той же иглой осторожно продавливают подскорлупную оболочку. После этого практически вся капля раствора проходит под подскорлупную оболочку и частично отслаивает ХАО.

Из отверстия в центре воздушного мешка резиновой грушей осторожно отсасывают воздух до полного опускания ХАО и создания искусственного воздушного мешка под боковой щелью. Для контроля наличия и величины искусственного воздушного мешка вновь проводят овоскопию и бракуют эмбрионы, имеющие кровоизлияния, воздушные мешки под ХАО или без искусственных воздушных мешков. Яйца с опущенной ХАО помещают на лотки отверстием вверх и выдерживают 2 ч в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Затем проводят овоскопию повторно и бракуют эмбрионы с воздушными мешками под ХАО, без искусственных воздушных мешков и имеющие кровоизлияния.

Определение рабочего разведения вируса. Для постановки реакции нейтрализации используют подготовленные куриные эмбрионы, стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины в качестве вируса и испытуемый иммуноглобулин.

Определяют рабочее разведение вируса титрованием на ХАО 12-дневных куриных эмбрионов. Для этого готовят ряд последовательных десятикратных разведений вируса на ФЦБ. По 6 куриных эмбрионов заражают каждым разведением вируса, нанося на ХАО по 0,1 мл. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37 ± 1) °С, затем проводят учет результатов. Эмбрионы вскрывают, подсчитывают количество развившихся на ХАО оспин и рассчитывают среднее арифметическое для каждого разведения. Для нейтрализации используют то разведение вируса, которое дает на ХАО от 40 до 80 оспин, если нет других указаний в нормативной документации.

Постановка реакции нейтрализации. Готовят разведения иммуноглобулина человека противосспенного на ФЦБ: 1:1000; 1:2000; 1:3000; 1:4000 (если нет других указаний в нормативной документации) и

контрольного отрицательного образца донорской сыворотки от 1:250 до 1:500 в объеме 0,5 – 1 мл. Смешивают равные объемы каждого разведения иммуноглобулина или контрольного отрицательного образца донорской сыворотки и рабочего разведения вирусосодержащей жидкости. После смешивания разведения удваиваются и становятся равными соответственно для проб иммуноглобулина: 1:2000; 1:4000; 1:6000; 1:8000; для контрольного отрицательного образца донорской сыворотки – 1:500; 1:1000. Смеси выдерживают при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 ч. После инкубации наносят по 0,1 мл каждого разведения смеси на ХАО куриных эмбрионов, используя для каждого разведения по 5 – 6 эмбрионов. Инкубируют в термостате 48 ч при температуре (37 ± 1) °С. Эмбрионы вскрывают, рассчитывают среднее арифметическое количество оспин для каждого разведения иммуноглобулина и контрольного образца.

Чувствительность куриных эмбрионов к вирусу осповакцины определяют в каждом испытании по показателю «Специфическая активность» стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины на ХАО куриных эмбрионов согласно инструкции по его применению.

Учет результатов. В исследовании должны быть подтверждены установленный показатель специфической активности стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины. Титром испытуемого препарата иммуноглобулина человека противооспенного считают его конечное разведение, дающее нейтрализацию не менее 50 % оспин от числа оспин, образуемых вирусом осповакцины в сочетании с контрольным отрицательным образцом донорской сыворотки.

Примечания.

1. Приготовление ФЦБ раствора Мак-Илвейна 0,004 М, рН (7,2 – 7,4). Готовят растворы 1 и 2.

Раствор 1: Лимонная кислота – 2,1 г; вода очищенная – 100 мл.

Раствор 2: В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 28,4 натрия гидрофосфата безводного или 35,6 г натрия гидрофосфата дигидрата или 71,6 г натрия гидрофосфата додекагидрата, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Смешивают 2 мл раствора 1 и 18 мл раствора 2 в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Полученный раствор должен иметь рН 7,2 – 7,4. Если рН полученного раствора более 7,4, его доводят до нормы раствором 1. В случае, если рН полученного раствора меньше 7,2, приготовление раствора повторяют. Буферный раствор стерилизуют при температуре (120 ± 1) °С и давлении $(0,1 \pm 0,01)$ МПа в течение 8 – 30 мин (в зависимости от объема) или фильтруют через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок хранения от 10 до 30 сут в зависимости от способа укупорки флаконов (способ укупорки флаконов должен быть указан в нормативной документации).

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации, в соответствии с инструкциями по применению. Чувствительность тест-системы для определения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) должна быть не ниже 0,1МЕ/мл.

Антитела к вирусу гепатита С. Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят в соответствии с инструкциями по применению иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность.

Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Препарат не должен содержать антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят в соответствии с инструкциями по применению иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека»».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

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