

Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммунобиологический лекарственный препарат анатоксин дифтерийный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена (АД-М-анатоксин), который представляет собой дифтерийный анатоксин, полученный из дифтерийного экзотоксина путем обезвреживания формальдегидом при нагревании, очищенный и адсорбированный на алюминия гидроксиде или другом разрешенном к применению минеральном сорбенте. АД-М-анатоксин предназначен для специфической профилактики дифтерии.

Производство

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

Дифтерийный анатоксин представляет собой токсин *Corynebacterium diphtheriae*, обезвреженный и очищенный способом, гарантирующим полную стабильную детоксикацию при сохранении антигенной активности. Для получения дифтерийного токсина 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, pH и содержание токсина. Для производства дифтерийного анатоксина используют культуральную среду с активностью токсина не менее 80 Lf в 1 мл. Детоксикация дифтерийного токсина и очистка дифтерийного анатоксина (кислотно-солевое осаждение, мембранная фильтрация) должны 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 фиксируют 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 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, вторую - при температуре от 2 до 8°C. По 0,1 мл каждого образца препарата вводят внутрикожно 2 морским свинкам массой 250-350 г или 1 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 pH, 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 АД-М-анатоксина можно использовать только стерильный и безопасный дифтерийный анатоксин с активностью 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.

Прививочная доза (0,5 мл) содержит 5 Lf дифтерийного анатоксина. В состав лекарственного средства может входить антимикробный 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 токсина ([раздел "Специфическая активность"](#)). В нормативной документации могут быть указаны альтернативные методы, подтверждающие наличие в лекарственном средстве дифтерийного анатоксина, обладающего 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. Испытание проводят потенциометрическим методом с неразведенным АД-М-анатоксином в соответствии с ОФС "Ионометрия".

Размер частиц (дисперсность). Препарат АД-М-анатоксина должен свободно проходить в шприц через иглу N 0840, если нет других указаний в нормативной документации производителя. 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 или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС "Стерильность". Для контроля используют тиогликолевую среду. Посевы инкубируют при температуре 30-35°C и 20-25°C.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Контроль 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). За животными наблюдают 7 сут. В течение указанного времени не должно быть гибели животных и потери массы тела.

Специфическая безопасность. Должен быть безопасным при подкожном введении 5 морским свинкам массой 250-350 г 10 прививочных доз для человека (по 2,5 мл в оба бока). Через 30 дней все животные должны остаться живыми без потери массы тела. При гибели 1 из животных опытной группы производят его вскрытие и оценку состояния надпочечников (алая окраска надпочечников является признаком дифтерийной интоксикации). Если животное погибло от дифтерийной интоксикации, препарат непригоден к применению. Если гибель животного или потеря массы тела произошла по причине, не связанной со специфической интоксикацией, испытание повторяют. Если при повторном испытании наблюдается гибель животных, лекарственный препарат признают не соответствующим требованиям.

Специфическая (иммуногенная) активность. Должен обладать иммуногенной активностью. Показатель выживаемости иммунизированных животных должен быть не менее 100% при заражении летальной дозой дифтерийного токсина.

Материалы и животные:

- испытуемый образец лекарственного средства;
- дифтерийный токсин с предварительно установленной величиной D_{1m} (минимальная доза токсина, вызывающая гибель животных в течение 4 сут.);
- морские свинки массой 250-350 г.

Проведение испытания. Неразведенный АД-М-анатоксин вводят 4 морским свинкам массой 250-350 г однократно под кожу бока в дозе 0,6 мл. Через 30 сут. определяют резистентность иммунизированных свинок к дифтерийному токсину, который вводят животным в дозе не менее 100 D_{1m} 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 D_{1m} дифтерийного токсина на 3 морских свинках из той же партии. Контрольные животные (не менее 2 из 3) должны погибнуть в течение 4 сут.

Полнота сорбции. В 1 мл надосадочной жидкости содержание неадсорбированного дифтерийного анатоксина не должно превышать 1 Lf, если нет других указаний в нормативной документации.

Полноту сорбции определяют путем индикации неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости препарата АД-М-анатоксин. Определение содержания неадсорбированного дифтерийного анатоксина в надосадочной жидкости проводят в соответствии с ОФС "Определение содержания анатоксинов/токсинов в реакции флокуляции", 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, если нет других указаний в нормативной документации. Определение проводят в соответствии с ОФС "Количественное определение тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах". Концентрация консерванта не должна быть ниже минимально эффективной и не должна превышать указанную на упаковке более чем на 15%. 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".

Могут использоваться и другие адсорбенты, эффективность и безопасность которых при соответствующем пути введения установлена.

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°C.