**Вакцина для профилактики ФС**

**гриппа инактивированная +**

**азоксимера бромид, раствор**

**для внутримышечного**

**введения, раствор**

**для подкожного введения Взамен ФС 42-3890-99**

**(Гриппол)**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на вакцину для профилактики гриппа инактивированную + азоксимера бромид, раствор для внутримышечного введения, раствор для подкожного введения. Препарат представляет собой поверхностные антигены (гемагглютинин и нейраминидазу) вирусов гриппа типа А и В, конъюгированные с водорастворимым иммуноадъювантом - азоксимера бромид. Поверхностные антигены вирусов гриппа типов А и В получают путем дезинтеграции вирусных частиц, культивируемых в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов.

Действующим веществом препарата являются поверхностные антигены вирусов гриппа типов А и В, и азоксимера бромид. Антигены вирусов гриппа индуцируют формирование специфического иммунитета против соответствующих типов вирусов гриппа. Азоксимера бромид повышает иммуногенность, иммунологическую память и стабилизирует антигены.

Вакцина в одной дозе содержит: антиген (гемагглютинин) вирусов гриппа подтипа А (H1N1) и подтипа А (H3N2) по 5 мкг, типа В - 11 мкг, азоксимера бромид - 500 мкг. Вакцина содержит антигены штаммов вирусов гриппа, соответствующие текущему эпидемическому сезону. Препарат предназначен для специфической профилактики гриппа.

Препарат может содержать консервант.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата «Вакцина для профилактики гриппа инактивированная + азоксимера бромид, раствор для внутримышечного введения, раствор для подкожного введения» основано на культивирования вирусов гриппа в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов. Куриные эмбрионы должны быть получены из сертифицированных хозяйств. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами.

Технологический процесс производства вакцины для профилактики гриппа должен осуществляться с соблюдением надлежащих требований к организации производства и контролю качества лекарственных препаратов, гарантирующих безопасность для человека.

Основными этапами производства препарата «Вакцина для профилактики гриппа инактивированная + азоксимера бромид, раствор для внутримышечного введения, раствор для подкожного введения» являются:

* культивирование посевного вирусного материала на куриных эмбрионах;
* выделение и очистка вирионов;
* инактивация вирионов;
* дезинтеграция вирионов и выделение поверхностных антигенов;
* объединение моновалентных вирусных субстанций в тривалентный полуфабрикат и введение иммуноадъюванта;
* розлив готового препарата.

Культивирование вирусов гриппа каждого типа проводят отдельно на 10 - 12-дневных куриных эмбрионах. Для этого посевной материал вводят в аллантоисную полость и инкубируют в условиях, обеспечивающих репродукцию вирусов гриппа. После инкубации в асептических условиях отбирают вируссодержащую аллантоисную жидкость и с помощью взвеси формалинизированных эритроцитов проводят элюацию вирусных частиц. Адсорбировавшиеся на поверхности эритроцитов вирионы отделяют и концентрируют в градиенте плотности сахарозы. Полученный вирусный материал инактивируют ультрафиолетовым излучением или раствором формалина и дезинтегрируют с использованием детергента - тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДТАБ). Расщепленный вирусный материал очищают от балластных веществ, детергента и подвергают стерилизующей фильтрации. Полученные моновалентные субстанции контролируют по показателю «Подлинность». Субстанции должны содержать поверхностные антигены вирусов гриппа соответствующих штаммов. Прошедшие испытание моновалентные субстанции, объединяют и полученный тривалентный полуфабрикат контролируют по показателям «Белок» и «Специфическая активность». Затем вводят иммуноадъювант - азоксимера бромид.

ИСПЫТАНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

При производстве препарата «Вакцина для профилактики гриппа инактивированная + азоксимера бромид, раствор для внутримышечного введения, раствор для подкожного введения» на стадии входного контроля каждую моновалентную субстанцию контролируют по показателю «Подлинность». После объединения субстанций, в тривалентном полуфабрикате вакцины, до введения азоксимера бромид, определяют показатели «Белок» и «Специфическая активность».

**Подлинность.** Моновалентные субстанции должны быть специфичными. Гомологичная сыворотка должна связывать антиген, входящий в состав субстанции и предотвращать агглютинацию эритроцитов. Определение проводят в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Методика постановки РТГА должна быть указана в нормативной документации.

**Белок.** Не более 120 мкг/мл в одной дозе (0,5 мл). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» по методу Лоури (без предварительного осаждения белка).

Для тривалентной субстанции, не содержащей консервант, в качестве раствора сравнения используют воду.

Для тривалентной субстанции, содержащей консервант, в качестве раствора сравнения используют раствор тиомерсала (85 мкг/мл).

Примечание

Приготовление раствора тиомерсала.

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят небольшое количество воды очищенной и растворяют в ней 0,85 г (точная навеска) тиомерсала, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Отбирают 1 мл полученного раствора и вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой очищенной до метки и перемешивают.

Приготовление раствора тиомерсала проводят в вытяжном шкафу, в соответствии с «Санитарными правилами при работе со ртутью и ее соединениями», действующими на территории РФ.

Раствор хранят в течение 6 мес при комнатной температуре в специально отведенном и защищенном от света месте.

**Специфическая активность.** Должен содержать гемагглютинины вирусов гриппа:

* подтипов А (H1N1) и А (H3N2) от 8,0 до 12,0 мкг/мл;
* типа В - от 1,8 до 26 мкг/мл.

Определение проводят с помощью реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД).

Гемагглютинин, диффундируя из лунок агарозного геля в радиальном направлении и связываясь со специфическими антителами сыворотки, находящейся в агарозе, образует преципитат. Диаметр зоны преципитации находится в прямой зависимости от количества антигена, внесенного в лунку. Методика проведения ОРИД должна быть указана в нормативной документации.

ИСПЫТАНИЯ ГОТОВОГО ПРЕПАРАТА

**Описание.** Бесцветная или слегка желтоватая прозрачная жидкость. Определение проводят визуально.

**Прозрачность.** Должен выдерживать сравнение с эталоном I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Цветность. Должен выдерживать сравнение с эталоном оттенка Y6. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

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

рН. От 7,0 до 7,6. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

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

Стерильность. Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева.

**Пирогенность или Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза составляет 0,1 мл на 1 кг массы кролика.

Не более 100 ЕЭ/доза. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины». Чувствительность используемого ЛАЛ-реактива должна составлять 0,03 ЕЭ/мл.

Аномальная токсичность. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-дозу вводят белым мышам внутрибрюшинно по 0,5 мл, морским свинкам - подкожно по 2,0 мл.

Специфическая безопасность. Не должен содержать живого вируса гриппа. Определение проводят на развивающихся куриных эмбрионах.

В аллантоисную полость 10-ти куриных эмбрионов (9 - 11-дневных) вводят по 0,2 мл препарата. Эмбрионы инкубируют в термостате при температуре 35 – 37 °С в течение 48 ч (для вируса гриппа типа А) и 72 ч (для вируса гриппа типа В). После инкубации извлекают аллантоисную жидкость и определяют в ней наличие гемагглютинина с куриными эритроцитами (1 % суспензия). Не менее 7 из 10 куриных эмбрионов должны остаться живыми. Из каждого эмбриона извлекают по 0,5 мл аллантоисной жидкости и объединяют. Полученную неразведенную смесь аллантоисной жидкости вводят по 0,2 мл 10 куриным эмбрионам и инкубируют при тех же условиях. После инкубации определяют наличие гемагглютининов в аллантоисной жидкости после второго пассажа.

В 10 лунок агглютинационного планшета вносят по 0,5 мл аллантоисной жидкости от каждого эмбриона, в 11-ю лунку вносят 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида для контроля спонтанной агглютинации. Во все лунки добавляют по 0,5 мл 1 % суспензии куриных эритроцитов. Содержимое лунок перемешивают встряхиванием и оставляют на 45 мин при температуре 20 - 25 °С до оседания эритроцитов в контроле.

Результаты реакции после 2-го пассажа должны быть отрицательными - в центре дна лунки должна образоваться «пуговка». В том случае, если определяется наличие гемагглютининов в аллантоисной жидкости после 2-го пассажа, допускается проведение 3-го пассажа. Результаты реакции после 3-го пассажа должны быть отрицательными.

**Антигенная активность.** Должен вызывать образование антител в титре не ниже 1:40 к каждому из трех штаммов вируса гриппа А и В.

6 беспородным белым мышам массой 10 - 12 г внутрибрюшинно вводят по 0,5 мл препарата, двукратно с интервалом в 7 сут. Через 12- 14 сут после повторной иммунизации мышей обескровливают, полученные сыворотки исследуют в РТГА с антигенами гомологичными антигенам, входящим в состав вакцины. Методика постановки РТГА должна быть указана в нормативной документации.

**Азоксимера бромид.** От 0,8 до 1,2 мг/мл. Определение проводят спектрофотометрическим методом в составе полимер-металлического комплекса с ионами меди.

В три мерные колбы вместимостью 50 мл помещают по 1,0 мл вакцины, доводят объем растворов 0,005 М раствором меди сульфата до метки, перемешивают и выдерживают 15 мин при периодическом перемешивании.

Измеряют оптическую плотность испытуемых растворов в трех параллельных пробах при длине волны 265 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против раствора сравнения, который готовят одновременно с испытуемыми образцами.

Содержание азоксимера бромида (*X*) в мг в одной дозе вычисляют по формуле:

$X=\frac{А∙V\_{1 }∙1000}{2∙ А\_{см}^{1\%}∙100∙l∙V\_{2 }}=A∙4,54$,

где:

$А$ - значение оптической плотности испытуемого раствора;

$А\_{см}^{1\%}$ -показатель поглощения комплексного соединения азоксимера бромида с медью, равный 110 мл/(г·см);

*l* - толщина слоя кюветы, равная 1 см;

*V1* - объем разведения испытуемого раствора, равный 100 мл;

*V2* - объем аликвоты испытуемого раствора, равный 1 мл;

1000 - коэффициент для пересчета в мг;

1/2 - коэффициент перерасчета содержания азоксимера бромида в одной дозе вакцины (0,5 мл);

100 - коэффициент персчета удельного показателя поглощения

Примечания

Приготовление раствора сравнения для испытания вакцины с консервантом. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1,0 мл фосфатно-солевого буферного раствора с содержанием тиомерсала 85 мкг/мл, доводят объем раствора 0,005 М раствором меди (II) сульфата до метки и перемешивают. Раствор, периодически помешивая, выдерживают в течение 15 мин. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора сравнения для испытания вакцины без консерванта. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1,0 мл фосфатно-солевого буферного раствора без тиомерсала, доводят объем раствора 0,005 М раствором меди (II) сульфата до метки и перемешивают. Раствор, периодически помешивая, выдерживают в течение 15 мин. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление 0,005 М раствора меди (II) сульфата. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,250 г меди (II) сульфата и растворяют в небольшом количестве 0,9 % раствора натрия хлорида, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 7 сут.

Приготовление фосфатно-солевого буферного раствора рН от 7,1 до 7,3. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 500 - 600 мл воды очищенной, вносят 9 г натрия хлорида, 3,9 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-ти водного, 0,4 г калия фосфорнокислого однозамещенного, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление 1 % раствора тиомерсала. В мерную колбу вместимостью100 мл вносят 50 мл фосфатно-солевого буферного раствора рН 7,1 - 7,3 добавляют 1,0 г тиомерсала и растворяют. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. Раствор хранят в течение 1 мес.

Приготовление раствора тиомерсала 85 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе рН от 7,1 до 7,3. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 8,5 мл 1 % раствора тиомерсала, доводят объем раствора до метки фосфатно-солевым буферным раствором и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора тиомерсала проводят в вытяжном шкафу, в соответствии с «Санитарными правилами при работе со ртутью и ее соединениями», действующими на территории РФ.

Иммуногенность. Должен быть иммуногенным.

При однократном подкожном или внутримышечном введении препарата в дозе 0,5 мл титр антител к гемагглютинину, в сыворотке крови, должен увеличиваться в 4 раза и более, не менее, чем у 70 % вакцинированных, имевших исходные титры гомологичных антител не выше 1:20.

Контролируют три первые серии вакцины, содержащие новый вакцинный штамм, по данным исследования в РГГА парных сывороток добровольцев, полученных до и после иммунизации.

Для оценки иммуногенности должны быть взяты парные сыворотки (до и после вакцинации через 21-28 дней). Обе сыворотки титруют одновременно в РТГА. Титр в РТГА менее 1:10 оценивается как 1:5. Перед постановкой РТГА из сывороток добровольцев удаляют неспецифические ингибиторы гемагглютинации рецептор-разрушающим энзимом (RDE-реагентом).

Каждую серию вакцины испытывают на сыворотках крови группе из 30 человек в возрасте от 18 до 55 лет.

Примечание

При обработке сывороток добровольцев RDE-реагентом, следуют указаниям, изложенным в инструкции к реактиву.

Сыворотки, обработанные RDE-реагентом, пригодны к использованию для постановки РТГА в течение двух недель, при условии хранения при температуре от 2 до 8 ºС.

Реактогенность. Должен быть ареактогенным.

Контролируют три первые серии вакцины, содержащей новый вакцинный штамм. Каждую серию вакцины испытывают на той же группе людей, на которой определяют иммуногенность. Прививочную дозу вакцины вводят добровольцам методом, предусмотренным инструкцией.

Наблюдение за привитыми добровольцами проводят в течение 5 сут. Ежедневно измеряют температуру и регистрируют общие и местные реакции. Полученные данные вносят в протокол контроля реактогенности. В протоколе отмечают также все необычные реакции, в том числе аллергического характера, выявленные в течение периода наблюдения.

У части привитых добровольцев могут наблюдаться местная и общая реакции различной степени выраженности. Общая реакция проявляется недомоганием, головной болью, повышением температуры, местная - гиперемией, отечностью, развитием инфильтрата в месте введения. Степень выраженности местной и общей реакций должна быть указана в нормативной документации.

Длительность температурной реакции не должна превышать 3 сут. Местные реакции должны угасать в течение 1 - 3 сут (редко до 5 сут).

Серию вакцин считают реактогенной, если средние или сильные местные реакции или наличие температуры выше 37,5 ºС длительностью более 3 сут будут зарегистрированы более, чем у одного из 30 привитых добровольцев.

**Овальбумин.** Не более 0,1 мкг/мл. Определение проводят методом иммуноферментного анализа с тест-системой для количественного определения овальбумина в жидкости ил реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА) с диагностикумом эритроцитарным овальбуминовым иммуноглобулиновым. Принцип ИФА изложен в ОФС «Метод ммуноферментного анализа», методика определения, чувствительность используемой тест-системы и условия проведения ИФА или РНГА должны быть указаны в нормативной документации.

**Тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДТАБ).** Не более 10 мкг/мл. Определение проводят колориметрическим методом. Методика определения на способности катионного детергента образовывать в хлороформе окрашенный растворимый комплекс с бромфеноловым синим. Методика определения должна быть указана в нормативной документации.

**Тиомерсал.** От 85 до 115 мкг/мл. Испытание проводят с препаратом, содержащим консервант. Содержание тиомерсала определяют в соответствии с ОФС «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах» колориметрическим методом.

Производственные штаммы. Штаммы вирусов гриппа типа А и В для производства вакцин должны быть рекомендованы ВОЗ, ЕС и национальной Комиссией по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам. Должны соответствовать по антигенной структуре антигенной разновидности вирусов гриппа подтипов A(H1N1), A(H3N2) и типа В на текущий эпидемический сезон, с известной историей пассажей и источника выделения.

Штаммы (главный посевной материал) должны отвечать следующим требованиям:

- быть адаптированными к куриным эмбрионам и не требовать дополнительной аттенуации;

- быть стерильными: не содержать посторонних вирусов, микоплазм и микобактерий туберкулеза;

- быть специфичными в РТГА и РИНА (реакция ингибирования нейраминидазной активности) со штаммоспецифическими противогриппозными сыворотками;

- быть нетоксичными для белых мышей;

- иметь в лиофилизированном виде инфекционную активность на куриных эмбрионах для гриппа типа А не ниже 106 ЭИД50/0,2 мл, для типа В - не ниже105 ЭИД50/0,2 мл;

- должны вызывать накопление гемагглютининов в аллантоисной жидкости зараженных куриных эмбрионов в титре не ниже 1:80 для всех типов вируса гриппа.

В случае использования в производстве в течение более одного эпидемического сезона производственные штаммы должны контролироваться не реже 1 раза в год.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные формы».

**Транспортирование и хранение.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и «Хранение лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование в течение 6 часов при температуре от 9 до 25 °С. Замораживание не допускается.