**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Вакцина для профилактики ФС**

**гриппа инактивированная +**

**азоксимера бромид, раствор**

**для внутримышечного**

**введения, раствор**

**для подкожного введения Вводится впервые**

**(Гриппол плюс)**

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

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

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

Препарат содержит вспомогательные вещества. Препарат не содержит консерванта.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата «Вакцина для профилактики гриппа инактивированная + азоксимера бромид раствор для внутримышечного введения, раствор для подкожного введения» (Гриппол плюс) основано на культивировании вирусов гриппа в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов свободных от специфической патогенной микрофлоры. Куриные эмбрионы должны быть получены из сертифицированных хозяйств. Качество исходного сырья и материалов, используемых в производстве, должно быть подтверждено соответствующими документами, действующими на территории РФ.

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.

Производство препарата «Вакцина для профилактики гриппа инактивированная + азоксимера бромид раствор для внутримышечного введения, раствор для подкожного введения» (Гриппол плюс) состоит из следующих основных этапов:

* 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 из куриных эмбрионов в асептических условиях отбирают вируссодержащую аллантоисную жидкость и проводят элюацию вирусных частиц с помощью взвеси формалинизированных эритроцитов. Адсорбировавшиеся на поверхности эритроцитов вирионы отделяют, инактивируют ультрафиолетовым излучением или раствором формалина и дезинтегрируют с помощью детергентов - цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) или тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДТАБ). Расщепленный вирусный материал очищают от балластных веществ, детергента и подвергают стерилизующей фильтрации. Полученные моновалентные субстанции контролируют по показателю «Подлинность». Полученные субстанции должны содержать поверхностные антигены вирусов гриппа соответствующих штаммов. Моновалентные вирусные субстанции, прошедшие испытание, объединяют и полученный тривалентный полуфабрикат контролируют по показателям «Белок» и «Специфическая активность», после чего вводят иммуноадъювант.

ИСПЫТАНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

При производстве препарата «Вакцина для профилактики гриппа инактивированная + азоксимера бромид раствор для внутримышечного введения, раствор для подкожного введения» (Гриппол плюс) 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 75 мкг в одной дозе (0,5 мл). Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» по методу Лоури (без предварительного осаждения белка). В качестве раствора сравнения используют фосфатно-солевой раствор, используемый для производства вакцины. Содержание белка в одной дозе вакцины (*X*) в мкг вычисляют по формуле:

$X=\frac{0,9∙С}{2}$,

где:

*С* - полученное значение концентрации общего белка (мкг/мл) в тривалентном полуфабрикате;

0,9 - коэффициент для учета разведения тривалентного полуфабриката при добавлении концентрата азоксимера бромид в соотношении 9:1;

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

Примечание

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

**Специфическая активность.** От 5,0 до 7,2 мкг гемагглютинина вирусов гриппа подтипа А (H1N1), А (H3N2) и типа В в одной дозе препарата (0,5 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 с желтоватым оттенком слегка опалесцирующая жидкость. Определение проводят визуально.

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

Цветность. Должен выдерживать сравнение с эталоном оттенка Y5. 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 или мембранной фильтрации.

**Бактериальные эндотоксины.** 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 наличие гемагглютинина с куриными эритроцитами (1 % раствор суспензии). 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.

**Азоксимера бромид.** От 0,4 до 0,6 мг в одной дозе. Определение проводят спектрофотометрическим методом в составе полимер-металлического комплекса с ионами меди.

В три мерные колбы вместимостью 100 мл вносят по 1 мл вакцины, доводят объем раствора 0,005 М раствором меди (II) сульфата до метки и перемешивают. Растворы, периодически помешивая, выдерживают в течение 15 мин.

Одновременно с испытуемыми образцами готовят раствор сравнения.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора в трех параллельных пробах при длине волны 266 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против раствора сравнения.

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:

$А$ - показатель 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 пересчета удельного показателя поглощения

Примечания

Приготовление раствора испытуемого образца. Для приготовления испытуемых образцов 5,0 мл вакцины помещают в химический стакан вместимостью 25 мл, определяют рН потенциометрическим методом (раствор должен иметь рН от 7,0 до 7,6) и понижают рН до значения в интервале от 5,8 до 6,2 1 М раствором хлористоводородной кислоты.

Приготовление раствора сравнения. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1,0 мл фосфатно-солевого буферного раствора (рН от 5,8 до 6,2), доводят объем раствора 0,005 М раствором меди (II) сульфата до метки и перемешивают. Раствор, периодически помешивая, выдерживают в течение 15 мин.

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, затем доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Срок хранения раствора 7 сут.

Приготовление фосфатно-солевого буферного раствора рН от 5,8 до 6,2. В химический стакан вместимостью150 мл вносят 90 мл воды и растворяют в ней 0,02 г калия дигидрофосфата, 0,134 г динатрия гидрофосфата дигидрата, 0,02 г калия хлорида, 0,8 г натрия хлорида. Значение рН полученного раствора измеряют потенциометрически и снижают 1 М раствором хлористоводородной кислоты до 5,8 до 6,2. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок хранения раствора 3 мес при температуре от 2 до 8 ºС.

Иммуногенность. Должен быть иммуногенным. Контролируют три первые серии вакцины, содержащие новый вакцинный штамм, по данным исследования в РТГА 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).

Показатели иммуногенности для серонегативных добровольцев (с исходным титром не более 1:20):

* Увеличение среднегеометрического титра (кратность нарастания) > 2,5 раза;
* Процент лиц с защитным титром антителом ≥ 40 должно быть > 70 %.

Каждую серию вакцины испытывают на группе из 30 человек в возрасте от 18 до 55 лет. Ввиду малочисленности группы лиц вакцинированных каждой серией вакцины при замене штамма в учет результатов могут быть включены серопозитивные лица (с титром антител ≥ 40).

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 или слабо реактогенным.

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 измеряя температуру, регистрируя 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 0,4 мкг в одной дозе вакцины (0,5 мл). Определение проводят методом иммуноферментного анализа с тест–системой для количественного определения овальбумина в жидкости. Принцип ИФА изложен в ОФС «Метод ммуноферментного анализа», методика определения, чувствительность используемой тест-системы и условия проведения анализа должны быть указаны в нормативной документации.

**Цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) или тетрадецилтриметиламмония бромид (ТДТАБ).** Не более 5 мкг в одной дозе вакцины. Определение проводят колориметрическим методом. Методика определения основана на способности катионного детергента образовывать в хлороформе окрашенный растворимый комплекс с бромфеноловым синим. Методика определения должна быть указана в нормативной документации.

**Формальдегид.** Не более 20 мкг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Количественное определение формальдегида в биологических лекарственных препаратах» (метод В).

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, должны иметь известную историю пассажей и источник 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.

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, в защищенном от света месте. Допускается транспортирование в течение 24 часов при температуре не выше 25 °С. Замораживание не допускается.