**Антиген вируса гепатита В ФС**

**поверхностный рекомбинантный (HBsAg),**

**субстанция-раствор Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на антиген вируса гепатита В поверхностный рекомбинантный (HBsAg), субстанция-раствор, представляющий собой белок, синтезированный рекомбинантными штаммами дрожжей Saccharomyces cerevisiae ДАН-041/р20, Hansenenula polymorpha КБТ-99/рНВ-51 и/или Hansenenula polymorpha КБТ-98/рНИ-50 и содержащий антигенные детерминанты поверхностного антигена вируса гепатита В (серотипа ау и/или аd), применяемый для производства сорбированных препаратов и диагностических наборов. 1 мл препарата содержит действующее вещество – антиген вируса гепатита В поверхностный рекомбинантный (HBsAg) (серотип ау и/или аd) не менее 400 мкг и вспомогательные вещества.

1. Аминокислотная последовательность HBsAg из штамма S. cerevisiae ДАН-041/р20 (серотип ау)

1 Met Glu Asn lie Thr Ser Gly Pha Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gin Ala Gly Phe Phe

21 Leu Leu Thr Arg lie Leu Thr He Pro Gin Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn

41 Phe Lou Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gin Asn Ser Gin Ser Pro Thr Ser Asn His

61 Ser Pro Thr Ser Cya Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe

81 He He Phe Leu Phe Lie Leu Leu Leu Cys Leu He Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr

101 Gin Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu He Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro

121 Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gin Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr

141 Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Lie Pro Lie Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys

161 Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu SerLeu Leu Val Pro Phe Val

181 Gin Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val He Trp Met Met Trp Tyr

201 Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser lie Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro lie Phe Phe

221 Cys Leu Trp Val Tyr lie \*\*\* (226)

1. Аминокислотная последовательность HBsAg из штамма H. polymorpha КБТ-99/рНВ-51(серотип ау)

1 Mat Gin Asn Ila Thr Sar Gly Phe Lau Gly Pro Leu Leu Val Leu Gin Ala Gly Phe Phe

21 Leu Leu Thr Arg lie Leu Thr lie Pro Gin Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn

41 Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gin Asn Ser Gin Sar Pro Thr Ser Asn His

61 Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Mat Cys Leu Arg Arg Pho

81 Ila lie Phe Leu Phe He Leu Lau Lau Cys Leu Ila Phe Leu Leu Val Lau Lau Asp Tyr

101 Gin Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu lie Pro Gly Ser Ser Thr Thr Sar Thr Gly Pro

121 Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gin Gly Thr Ser Mot Tyr Pro Sar Cys Cys Cys Thr

141 Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys lie Pro lie Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys

161 Phe Lau Trp Glu Trp Ala Sar Ala Arg Pha Ser Trp Leu Ser Leu Lau Val Pro Phe Val

181 Gin Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val lie Trp Met Mat Trp Tyr

201 Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ila Leu Ser Pro Phe Lou Pro Leu Lau Pro lie Phe Phe

221 Cys Leu Trp Val Tyr He \*\*\* (226)

1. Аминокислотная последовательность HBsAg из штамма H.polymorpha КБТ-98/рНИ-50 (серотип ad)

1 Mot Glu Asn lie Thr Ser Gly Phe Lou Gly Pro Lou Lou Val Lou Gin Ala Gly Pho Eho

21 Lou Leu Thr Arg lie Lou Thr Ila Pro Gin Ser Leu Asp Sor Trp Trp Thr Ser Leu Asn

41 Phe Leu Gly Gly Sor Pro Val Cys Leu Gly Gin Asn Ser Gin Sar Pro Thr Ser Asn His

61 Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro He Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe

81 lie lie Phe Leu Phe He Leu Leu Leu Cys Leu He Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr

101 Gin Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ila Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro

121 Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gin Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr

141 Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys lie Pro He Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys

161 Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val

181 Gin Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala He Trp Met Met Trp Tyr

201 Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ila Val Sar Pro Phe He Pro Leu Leu Pro lie Phe Phe

221 Cys Leu Trp Val Tyr He \*\*\* (226)

1. Нуклеотидная последовательность HBsAg из штамма S. cerevisiae ДАН-041/р20 (серотип ау)

TGGAAAACA TTACTTCTGG TTTCCTAGGT CCATTGTTGG TTTTGCAAGC

TGGTTTTTTC CTGCTGACTA GAATTTTGAC TATTCCACAA AGTCTAGACT 100

CTTGGTGGAC TTCTTTGAAT TTTTTGGGTG GAACTACCGT GTGTCTTGGC

CAAAATTCGC AGTCCCCAAC CTCCAATCAC TCACCAACCT CCTGTCCTCC 200

AACTTGTCCT GGTTATAGAT GGATGTGTTT GAGAAGATTT ATTATTTTCT

TGTTCATTTT GTTGTTGTGT T\*?GATCTTCT TGTTGGTTCT TCTGGACTAT 300

CAAGGTATGT TGCCCGTTTG TCCTCTAATT CCAGGATCTT CAACTACTTC

TACTGGTCCA TGTAGAACTT GTATGACTAC TGCTCAAGGA ACCTCTATGT 400

ATCCCTCCTG TTGCTGTACC AAACCTTCGG ACGGAAATTG CACCTGTATT

CCCATCCCAT CATCCTGGGC TTTCGGAAAA TTCCTATGGG AGTGGGCCTC 500

AGCCCGTTTC TCCTGGTTGT CTTTGTTGGT TCCATTTGTT CAATGGTTCG

TTGGTTTGTC TCCAACTGTT TGGCTTTCAG TTATATGGAT GATGTGGTAT 600

TGGGGTCCAT CTTTGTACTC TATTTTGTCT CCATTTTTGC CATTGTTGCC

AATTTTCTTC TGTTTGTGGG TTTACATTTA A (681)

1. Нуклеотидная последовательность HBsAg из штамма H. polymorpha КБТ-99/рНВ-51(серотип ау)

TGGAGAACA TCACATCAGG ATTCCTAGGA CCCCTGCTCG TGTTACAGGC

GGGGTTTTTC TTGTTGACAA GAATCCTCAC AATACCGCAG AGTCTAGACT 100

CGTGGTGGAC TTCTCTCAAT TTTCTAGGGG GAACTACCGT GTGTCTTGGC

CAAAATTCGC AGTCCCCAAC CTCCAATCAC TCACCAACCT CCTGTCCTCC 200

AACTTGTCCT GGTTATCGCT GGATGTGTCT GCGGCGTTTT ATCATCTTCC

TCTTCATCCT GCTGCTATGC CTCATCTTCT TGTTGGTTCT TCTGGACTAT 300

CAAGGTATGT TGCCCGTTTG TCCTCTAATT CCAGGATCTT CAACCACCAG

CACGGGACCA TGCAGAACCT GCACGACTCC TGCTCAAGGA ACCTCTATGT 400

ATCCCTCCTG TTGCTGTACC AAACCTTCGG ACGGAAATTG CACCTGTATT

CCCATCCCAT CATCCTGGGC TTTCGGAAAA TTCCTATGGG AGTGGGCCTC 500

AGCCCGTTTC TCCTGGCTCA GTTTACTAGT GCCATTTGTT CAGTGGTTCG

TAGGGCTTTC CCCCACTGTT TGGCTTTCAG TTATATGGAT GATGTGGTAT 600

TGGGGGCCAA GTCTGTACAG CATCTTGAGT CCCTTTTTAC CGCTGTTACC

AATTTTCTTT TGTCTTTGGG TATACATTTA A (681)

1. Нуклеотидная последовательность HBsAg из штамма H.polymorpha КБТ-98/рНИ-50 (серотип ad)

ATGGAGAACA TCACATCAGG ATTCCTAGGA CCCCTGCTCG TGTTACAGGC

GGGGTTTTTC TTGTTGACAA GAATCCTCAC AATACCGCAG AGTCTAGACT 100

CGTGGTGGAC TTCTCTCAAT TTTCTAGGGG GATCACCCGT GTGTCTTGGC

CAAAATTCGC AGTCCCCAAC CTCCAATCAC TCACCAACCT CCTGTCCTCC 200

AATTTGTCCT GGTTATCGCT GGATGTGTCT GCGGCGTTTT ATCATATTCC

TCTTCATCCT GCTGCTATGC CTCATCTTCT TATTGGTTCT TCTGGATTAT 300

CAAGGTATGT TGCCCGTTTG TCCTCTAATT CCAGGATCAA CAACAACCAG

TACGGGACCA TGCAAAACCT GCACGACTCC TGCTCAAGGC AACTCTATGT 400

TTCCCTCATG TTGCTGTACA AAACCTACGG ATGGAAATTG CACCTGTATT

CCCATCCCAT CGTCCTGGGC TTTCGCAAAA TACCTATGGG AGTGGGCCTC 500

AGTCCGTTTC TCTTGGCTCA GTTTACTAGT GCCATTTGTT CAGTGGTTCG

TAGGGCTTTC CCCCACTGTT TGGCTTTCAG CTATATGGAT GATGTGGTAT 600

TGGGGGCCAA GTCTGTACAG CATCGTGAGT CCCTTTATAC CGCTGTTACC

AATTTTCTTT TGTCTCTGGG TATACATTTA A (681)

ПРОИЗВОДСТВО

Поверхностный антиген вируса гепатита В HBsAg, получают из рекомбинантных клеток дрожжей Hansenula polymorpha с помощью биотехнологических процессов.

Процесс изготовления субстанции очищенного поверхностного антиген вируса гепатита В HBsAg, включает следующие этапы:

- генетическая трансформация. Из молекулы ДНК вируса гепатита В выделяют ген, ответственный за синтез поверхностного антигена вируса гепатита В;

- ген, ответственный за синтез поверхностного антигена вируса гепатита В встраивают в плазмиду и вводят ее в клетки дрожжей, в результате дрожжи начинают синтезировать частицы HBsAg;

- получение рекомбинантного стабильного клона штаммов-продуцентов;

- получение биомассы клеток штаммов-продуцентов путем культивирования. Для всех штаммов используют двухстадийное культивирования. Первая стадия служит для накопления биомассы, вторая – для индукции синтеза поверхностного антигена вируса гепатита В;

- выделение и очистка рекомбинантного антигена из клеток штаммов- продуцентов (процесс ферментации);

- разрушение клеток дрожжей с высвобождением поверхностного HBsAg антигена (экструзионный способ);

- очистка поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В (методом гидрофобной хроматографии и др.).

- окончательная очистка поверхностного антигена HBsAg вируса гепатита В (метод гель-хроматографии).

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Прозрачная или слабо опалесцирующая, бесцветная или со слабо-желтым оттенком жидкость. Определение проводят визуально.

**Подлинность**. Препарат должен содержать HBsAg. Определение проводят методом трехфазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием зарегистрированных в РФ коммерческих тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью 0,01 – 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкцией по применению (раздел «Специфическая активность»).

Подлинность подтверждается, если оптическая плотность рабочих разведений антигена выше оптической плотности отрицательного контроля.

**Прозрачность.** Значение оптической плотности не должно превышать - 0,085. Испытания проводят спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм в кюветах толщиной слоя 3мм в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

**Цветность.** Значение оптической плотности не должно превышать - 0,300. Испытания проводят спектрофотометрическим методом при длине волны 400 нм в кюветах толщиной слоя 3 мм в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

**Механические включения.** Должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

**рН.** От 6,4 до 7,4. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Общий белок.** Не менее 400 мкг/мл. Определение проводят по методу Лоури (метод 1) в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологическим лекарственных препаратах».

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

**Бактериальные эндотоксины**. Не более 30ЕЭ/20 мкг белка. Определение проводят методом гель-тромб в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Специфическая активность.** КоличествоHBsAg должно составлять не менее 85 % от препарата сравнения. Определение проводят методом трехфазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием зарегистрированных в РФ коммерческих тест-систем для выявления HBsAg с чувствительностью 0,01 – 0,1 МЕ/мл в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа» и инструкцией по применению тест-системы.

Примечание.

В качестве препарата сравнения используют референс-препарат с известным содержанием белка.

**Чистота.** Суммарное количество основного мономера (молекулярная масса 24 ± 2 кДа) и его димера должно составлять не менее 95 %. Определение проводят методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом в редуцирующих условиях в соответствии с ОФС « Электрофорез в полиакриламидном геле».

**Примеси.**

**Остаточная ДНК штамма-продуцента.** Количество должно составлять не более 10 пг/20 мкг белка. Определение проводят методом флуориметрии в соответствии с ОФС «Флуориметрия» с использованием ДНК-количественного набора для флуоресцентного анализа в соответствии с инструкцией по применению. Методику определения указывают в нормативной документации.

**Остаточные белки штамма – продуцента.** Не более 5 %. Определение проводят по разнице содержания белка (100 %) и содержания HBsAg, определенного методом электрофореза в полиакриламидном геле (по разделу «Чистота»).

**Липиды.** Не более 25 мкг/20 мкг белка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» с использованием набора для определения общих липидов фотометрическим методом с фосфованилином в соответствии с инструкцией по применению. Методику определения указывают в нормативной документации.

**Полисахариды.** Не более 10мкг/20 мкг белка. Определение проводят спектрофотометрическим методом в фенол-серной реакции (метод Дюбуа) в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях». Методику определения указывают в нормативной документации.

**Производственные штаммы.** Штаммы-продуценты по морфологическим, культуральным, физическим и биохимическим свойствам должны быть стабильными в течение 1 года при температуре хранения минус (70 ± 1) ºС, в 15-50 % растворе глицерина в качестве криопротектора.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В маркировке должны быть предусмотрены предупредительные надписи: «Стерильно», «Замораживание не допускается».

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8 ºС в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Замораживание не допускается.