**Интерлейкин-2 раствор ФС**

**для инфузий, раствор**

**для подкожного введения Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препарат интерлейкин-2 раствор для инфузий, раствор для подкожного введения, полученный биотехнологическим способом. Действующим началом препарата является человеческий рекомбинантный интерлейкин-2 (рИЛ-2), представляющий собой полипептид, состоящий из 133 аминокислот с молекулярной массой 15,4 кДа, синтезированный генетически модифицированным штаммом *Saccharomyces cerevisiae.*

Препарат обладает иммуностимулирующим действием, усиливает противобактериальный, противовирусный, противогрибковый и противоопухолевый иммунитет. ИЛ-2 стимулирует синтез цитокинов, пролиферацию и активность Т-лимфоцитов, макрофагов, антителообразующую функцию В-лимфоцитов.

Содержание рИЛ-2 в 1 мл выпускаемого препарата составляет 0,25, 0,5 или 1 мг. Препарат предназначен для комплексной терапии септических состояний различной этиологии, лечения туберкулеза легких и диссеминированных форм почечноклеточного рака.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

В основе производства препарата рИЛ-2 лежит культивирование производственного штамма-продуцента, в генетический аппарат которого встроен ген, кодирующий синтез человеческого ИЛ-2. Штамм-продуцент (рекомбинантный штамм пекарских дрожжей - *S. сerevisiae*) должен быть депонированный в официальной коллекции, охарактеризован в полном объеме, иметь стабильные генетические и биологические свойства и регулярно контролироваться. Все этапы производства препарата ИЛ-2 должны осуществляться с соблюдением надлежащих требований организации производства и контроля качества лекарственных средств, а также в соответствии с ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты» и ОФС «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК».

Процесс производства препарата рИЛ-2 представляет собой высокотехнологичный многоэтапный процесс. Культивирование штамма-продуцента проводят с использованием специальных жидких питательных сред в условиях, обеспечивающих стабильную и высокую продукцию рекомбинантного белка. По окончании культивирования целевой белок выделяют и очищают. В полученную субстанцию рИЛ-2 вводят вспомогательные вещества. Готовый лекарственный препарат контролируют по показателям качества.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость. Определение проводят визуально.

Возможно, выпадение кристаллов натрия лаурилсульфата при хранении при температуре от 2 до 8 ºС. Кристаллы должны растворяться при комнатной температуре в течение 30 мин.

**Подлинность.** Препарат считают подлинным, если в нем обнаруживают ИЛ-2, маннит, натрия лаурилсульфат, дитиотреитол.

ИЛ-2. Определение проводят биологическим методом по его специфической способности стимулировать пролиферацию ИЛ-2-зависимых опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов мыши линии СТLL-2. Стимулированные клетки идентифицируют по накапливающимся в них кристаллам формазана темно-синего цвета. Определение проводят методом иммуноферментного анализа в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа», методика должна быть указана в нормативной документации в разделе «Специфическая активность».

Маннит. Определение проводят с помощью качественной реакции по появлению коричневого окрашивания в соответствии с ОФС «Определение маннита (маннитола) в биологических лекарственных препаратах» или другой валидированной методикой, указанной в нормативной документации.

Натрия лаурилсульфат. Определение проводят с помощью качественной реакции по окрашиванию слоя толуола в желтый цвет. К 0,3 мл испытуемого образца добавляют 0,7 мл воды, 0,2 мл 2 мМ раствора натрия гидросульфата, 0,2 мл 1 % раствора акридинового оранжевого и проводят экстракцию толуолом. Растворы готовят, как указано в разделе «Количественное определение натрия лаурилсульфата».

Дитиотреитол. Определение проводят с помощью качественной реакции, в ходе которой под действием дитиотреитола происходит разрыв дисульфидной связи в 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоте), с образованием соединения ярко-желтой окраски. Добавление 2,9 мл 200 мкМ раствора 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) к 0,1 мл испытуемого образца дитиотреитола должно вызывать появление желтого окрашивания. Растворы готовят, как указано в разделе «Количественное определение дитиотреитола».

**Цветность.** Окраска не должна превышать эталон отттенка № 7Y. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**Прозрачность.** Должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

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

**рН.** От 7,3 до 8,3. 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».

**Белок.** Содержание в 1 мл препарата с дозировкой:

* 0,25 мг/мл должно составлять от 0,2 до 0,3 мг;
* 0,5 мг/мл - от 0,4 до 0,6 мг;
* 1 мг/мл - от 0,8 до 1,2 мг.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение белка колориметрическим методом (метод Лоури) в биологических лекарственных препаратах» (метод II).

Примечания

Приготовление испытуемого образца из препарата с дозировкой 0,25 мг/мл. К 0,4 мл препарата добавляют 0,6 мл воды и перемешивают.

Приготовление испытуемого образца из препарата с дозировкой 0,5 мг/мл. К 0,2 мл препарата добавляют 0,8 мл воды и перемешивают.

Приготовление испытуемого образца из препарата с дозировкой 0,5 мг/мл. К 0,1 мл препарата добавляют 0,9 мл воды и перемешивают.

**Молекулярная масса.** В состав препарата должен входить основной белок с молекулярной массой от 15,1 до 15,5 кДа и дополнительный белок с молекулярной массой от 12,8 до 13,2 кДа, являющийся копией основного белка. Определение проводят методом электрофореза в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле» в редуцирующих условиях, методика должна быть указана в нормативной документации. На электрофореграмме должны обнаруживаться две полосы, соответствующие белкам с указанной молекулярной массой.

**Чистота.** Не менее 93 % белков «интерлейкиновой природы» в виде мономеров и димеров. Из них:

* не менее 75 % мономеров с молекулярной массой от 15,1 до 15,5 кДа.
* не мене 15-20 % мономеров с молекулярной массой от 12,8 до 13,2 кДа.
* не более 2 % димеров с молекулярной массой от 15,1 до 15,5 кДа и от 12,8 до 13,2 кДа в сумме.

Допускается примесь дрожжевых белков, но не более 5 %.

Белки-димеры обнаруживаются в полосе, соответствующей белкам с молекулярной массой от 26 до30 кДа, дрожжевые белки - в полосе от 16000 до 20 кДа.

Характеристику белков и их количество определяют при проведении испытания «Молекулярная масса» в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

Для определения примеси дрожжевых белков количество суммарного белка, вносимого в основание лунки, увеличивают до 10-12 мкг. Параллельно в две крайние лунки вносят смесь белков-маркеров. Количественное содержание примесей определяют с использованием денситометрии на спектрофотометре для сканирования гелей. Процентное содержание белка вычисляется прибором автоматически с помощью программного обеспечения к прибору.

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева. Препарат в условиях испытания не обладает антимикробным действием.

**Пирогенность.** Должен быть апирогенным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Препарат вводят животным в тест-дозе 0,05 мг/мл (5000 МЕ) в расчете на кг массы тела кролика.

Примечания

Приготовление испытуемого раствора с концентрацией 0,05 мг/мл (5000 МЕ) из препарата с дозировкой 0,25 мг/мл. К 4 мл препарата добавляют 46 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают. К 10 мл полученного раствора с концентрацией 0,02 мг/мл (20000 МЕ) добавляют 30 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора с концентрацией 0,05 мг/мл (5000 МЕ) из препарата с дозировкой 0,5 мг/мл. К 2 мл препарата добавляют 48 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида перемешивают. К 10 мл полученного раствора с концентрацией 0,02 мг/мл (20000 МЕ) добавляют 30 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора с концентрацией 0,05 мг/мл (5000 МЕ) из препарата с дозировкой 1 мг/мл. К 1 мл препарата добавляют 49 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида перемешивают. К 10 мл полученного раствора с концентрацией 0,02 мг/мл (20000 МЕ) добавляют 30 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида и перемешивают.

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 350 ЕЭ/мг. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины» (качественный анализ (метод А)).

Примечания

Приготовление испытуемого раствора из препарата ИЛ-2 с дозировкой 0,25 мг/мл. К 0,4 мл препарата добавляют 0,6 мл воды для ЛАЛ-теста и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора из препарата ИЛ-2 с дозировкой 0,5 мг/мл. К 0,2 мл препарата добавляют 0,8 мл воды для ЛАЛ-теста и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора из препарата ИЛ-2 с дозировкой 1 мг/мл. К 0,1 мл препарата добавляют 0,9 мл воды для ЛАЛ-теста и перемешивают.

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза для каждого вида животных должна быть указана в нормативной документации.

**Специфическая активность.** Должна составлять в препарате с дозировкой:

* 0,25 мг/мл - от185000 до 375000 МЕ;
* 0,5 мг/мл - от 375000 до 750000;
* 1 мг/мл - от 750000 до 1500000 МЕ.

Количественное определение биологической активности препарата основано на способности ИЛ-2 стимулировать пролиферацию ИЛ-2-зависимых опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов мыши линии СТLL-2. Стимулированные цитотоксические Т-лимфоциты накапливают кристаллы формазана темно-синего цвета, которые затем растворяют диметилсульфоксидом и определяют оптическую плотность растворов. Интенсивность оптической плотности окрашенных растворов прямопропорциональна уровню биологической активности препарата. Испытание проводят, в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа» и методикой, указанной в нормативной документации. Обработку результатов проводят при помощи программного обеспечения, предназначенного для статистической обработки результатов иммуноферментного анализа и расчета активности препарата в сравнении со стандартным образцом.

Примечания

Приготовление испытуемого раствора из препарата ИЛ-2 с дозировкой 0,25 мг/мл. Препарат разбавляют в 100 раз 0,1 % раствором натрия лаурилсульфата, затем полученный раствор разводят в 2,5 раза средой для выращивания лимфоидных клеток и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора из препарата ИЛ-2 с дозировкой 0,5 мг/мл. Препарат разбавляют в 100 раз 0,1 % раствором натрия лаурилсульфата, затем полученный раствор разводят в 5 раза средой для выращивания лимфоидных клеток и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора из препарата ИЛ-2 с дозировкой 1 мг/мл. Препарат разбавляют в 100 раз 0,1 % раствором натрия лаурилсульфата, затем полученный раствор разводят в 10 раза средой для выращивания лимфоидных клеток и перемешивают.

**Удельная активность.** Должна составлять от 750000 МЕ до 1500000 МЕ на 1 мг ИЛ-2, содержащегося в препарате. Удельную активность (S) в МЕ/мг рассчитывают по формуле:

,

где:

*А* - активность ИЛ-2 в препарате, определенная в испытании «Специфическая активность»,МЕ/мл;

*P* - содержание белка в препарате, определенное в испытании «Белок», мг/мл

**Количественное определение маннита.** Содержание в 1 мл препарате с дозировкой:

* + 0,25 мг/мл должно составлять от 11 до 14 мг;
  + 0,5 мг/мл - от 22 до 28 мг;
  + 1 мг/мл - от 43 до 55 мг.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение маннита (маннитола) в биологических лекарственных препаратах» (метод йодометрического титрования). Содержание маннита определяют в:

* + 80 мкл препарата с дозировкой 0,25 мг/мл;
  + 40 мкл препарата с дозировкой 0,5 мг/мл;
  + 20 мкл препарата с дозировкой 1 мг/мл.

**Количественное определение натрия лаурилсульфата.** Содержание в 1 мл препарате с дозировкой:

* + 0,25 мг/мл должно составлять от 1,8 до 2,5 мг;
  + 0,5 мг/мл - от 3,5 до 5 мг;
  + 1 мг/мл - от 7 до 10 мг.

Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Испытание проводят с параллельными пробами. В три пробирки вносят по 300 мкл раствора испытуемого образца (предположительно содержащего 25 мкг/мл натрия лаурилсульфата), добавляют по 700 мкл воды и по 200 мкл 2 мМ раствора натрия гидросульфата, и 1 % раствора акридинового оранжевого и перемешивают. Проводят экстракцию и определяют оптическую плотность. По калибровочному графику находят количество натрия лаурилсульфата (мкг) и вычисляют его содержание (*X*) мг/мл в препарате по формуле:

,

где:

*A* - количество натрия лаурилсульфата, найденное по калибровочному графику, мкг;

*K* - коэффициент разведения испытуемого препарата;

*V* - объем препарата, взятого для испытания, мл

Калибровочный график. В 7 мерных пробирок помещают от 0 до 600 мкл раствора натрия лаурилсульфата (25 мкг/мл), объем раствора в каждой пробирке доводят водой до 1000 мкл (содержание натрия лаурилсульфата от 0 до 15 мкл соответственно). В каждую пробирку вносят по 200 мкл 2 мМ раствора натрия гидросульфата, 1 % раствора акридинового оранжевого и встряхивают. Затем в каждую пробирку вносят по 3 мл толуола и экстрагируют на шейкере в течение 30 сек. Разделяют водный и органический слои центрифугированием в течение 2 мин при 3000-4000 об/мин. Оптическую плотность определяют в слое толуола из каждой пробирки при длине волны 499 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм по сравнению с контрольной пробой (слой толуола из раствора без натрия лаурилсульфата). Калибровочный график воспроизводят при каждом определении.

Примечания

Приготовление 2 мМ раствора натрия гидросульфата. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 24,16 г натрия гидросульфата, растворяют в воде, доводят до метки и перемешивают.

Приготовление 1 % раствора акридинового оранжевого. В мерном цилиндре вместимостью 50 мл растворяют 0,50 г акридинового оранжевого 2мМ раствором натрия гидросульфата, доводят до метки и перемешивают.

Приготовление раствора натрия лаурилсульфата 25 мкг/мл. В мерной колбе вместимостью 500 мл 50 мг натрия лаурилсульфата растворяют в воде, доводят до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 25 мл полученного раствора, доводят водой до метки и перемешивают.

Приготовление раствора испытуемого образца из препарата ИЛ-2 с дозировкой 0,25 мг/мл. Препарат разбавляют в 100 раз. Для этого в мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 500 мкл исходного препарата, доводят водой до метки и перемешивают.

Приготовление раствора испытуемого образца из препарата ИЛ-2 с дозировкой 0,5 мг/мл. Препарат разбавляют в 200 раз. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 500 мкл исходного препарата, доводят водой до метки и перемешивают.

Приготовление раствора испытуемого образца из препарата ИЛ-2 с дозировкой 1 мг/мл. Препарат разбавляют в 400 раз. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 250 мкл исходного препарата, доводят водой до метки и перемешивают.

**Количественное определение дитиотреитола.** Не более 0,08 мг в 1 мл препарата. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Испытание проводят с параллельными пробами. В три пробирки вносят по 2,9 мл раствора № 3 и по 0,1 мл препарата без предварительного разведения, встряхивают и определяют оптическую плотность. По калибровочному графику находят количество ДТТ (мкг) и вычисляют содержание (*X*) мг/мл в препарате по формуле:

,

где:

*A* - количество ДТТ, найденное по калибровочному графику, мкг;

*V* - объем препарата, взятого для испытания, мкл

Калибровочный график. В 6 пробирок вносят раствор № 2, а затем раствор № 3 в количестве, указанном в табл. Содержимое пробирок перемешивают на шейкере, переносят в кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм и через 1 мин измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 412 нм по сравнению с контролем (раствором № 2). Калибровочный график воспроизводят при каждом определении.

Таблица - Приготовление образцов для построения калибровочного графика

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № пробы | Раствор № 2  мкл | Раствор № 3 | |
| мкл | мкг |
| 1 | 2980 | 20 | 2,0 |
| 2 | 2960 | 40 | 4,0 |
| 3 | 2920 | 80 | 8,0 |
| 4 | 2880 | 120 | 12,0 |
| 5 | 2840 | 160 | 16,0 |
| 6 | 2800 | 200 | 20,0 |

Примечания

Приготовление раствора № 1 (0,1 М трис-гидрохлорида буферный раствор, рН 7,6). В 450 мл воды растворяют 6,05 г трис(оксиметил)аминометан, титруют 5 М раствором хлористоводородной кислоты до рН 7,6. Раствор переносят в молярную колбу вместимостью 500 мл, доводят водой до метки и перемешивают.

Приготовление раствора № 2 (200 мкМ раствора 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты, рН 7,6). В мерной колбе вместимостью 250 мл растворяют 19,8 мг 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты в 0,1 М трис-гидрохлорида буферном растворе (рН 7,6), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Приготовление раствора № 3 (ДТТ 1,2 мг/мл, рН 7,6). В 5 мл 0,1 М трис-гидрохлорида буферного раствора растворяют 20,0 мг ДТТ. В мерный цилиндр переносят 1 мл полученного раствора, доводят 0,1 М трис-гидрохлорида буферным раствором до 40 мл и перемешивают.

**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 10 сут при температуре не более 25 °С.