**Токсин ботулинический ФС**

**типа А - гемагглютинин комплекс**

**лиофилизат для приготовления**

**раствора для внутримышечного введения Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препарат, представляющий собой токсин ботулинический типа А в комплексе с гемагглютинином, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. Активным веществом препарата является ботулинический нейротоксин типа Ав комплексе с гемагглютинином, обратимо блокирующий передачу нервного импульса. Ботулинический токсин (БТ) - продукт жизнедеятельности *Clostridium botulinum,* представляет собой белковый комплекс, состоящий из нейротоксина и связанных с ним гемагглютининов и нетоксичных белков. Биологическая активность препарата в одном флаконе составляет 50 ЕД или 100 ЕД.

Препарат предназначен для лечения блефароспазма и коррекции гиперкинетических складок (мимических морщин) лица и шеи у взрослых.

В состав препарата входят вспомогательные вещества. Препарат выпускают в комплекте с растворителем - 0,9 % раствором натрия хлорида.

ПРОИЗВОДСТВО

Комплекс ботулинический токсин типа А-гемагглютинин производят путем культивирования *C. botulinum* в специальной жидкой питательной среде в анаэробных условиях. Производство БТ должно осуществляться в соответствии с надлежащими правилами и контролем качества в соответствии с ОФС «Биологические лекарственные препараты». Все микробиологические методики должны быть валидированы в соответствии с ОФС «Валидация микробиологических методов».

Производство БТ включает в себя следующие основные этапы:

* культивирование производственного штамма *C.botulinum;*
* выделение токсина из культуральной среды;
* очистка и восстановление полученной субстанции;
* определение биологической активности субстанции;
* добавление вспомогательных веществ;
* окончательная обработка (лиофилизация).

Для производства БТ используют высокотоксигенный штамм *C.botulinum*, продуцирующий только токсин типа А. Производственный штамм должен обладать стабильными морфологическими, культуральными, антигенными, биохимическими и генетическими свойствами. На стадии приготовления посевной культуры проводят контроль на отсутствие посторонних микроорганизмов.

Производственный штамм *C.botulinum* культивируют в условиях, обеспечивающих высокую продукцию экзотоксина. Методы культивирования должны обеспечивать сохранение свойств штамма и предотвращать его контаминацию. Работу с производственными штаммами проводят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», действующими на территориии РФ.

БТ продуцируется бактериями *C.botulinum* в виде белкового комплекса, состоящего из нейротоксина массой около 150 кДа и нетоксичных белков и гемагглютининов. Нейротоксин представлен тяжелой и легкой белковыми цепями, связанными между собой с помощью дисульфидных связей.

По окончании культивирования бактерии и споры производственного штамма отделяют от культуральной среды, из которой извлекают БТ и очищают методом гель-хроматографии.

Важной технологической стадией производства БТ является определение биологической активности субстанции. Ввиду отсутствия международных стандартов определения биологической активности для препаратов БТ, каждый производитель может использовать другие валидированные методы анализа.

Ботулинический экзотоксин является одним из самых сильных биологических ядов, его летальная доза (LD50) составляет 0,001 мкг/кг, а терапевтический эффект проявляется в очень низких концентрациях. Чтобы обеспечить необходимый объем и стабильность лекарственного препарата (ЛП) в субстанцию, после определения единиц биологической активности, вводят вспомогательные вещества.

Использование белков животного происхождения в качестве стабилизирующих веществ повышает риск контаминации ЛП вирусами, возбудителями трансмиссивной губчатой энцефалопатии и другими патогенными агентами. Желатин, использующийся при производстве препарата БТ должен, отвечать требованиям ОФС «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств» и ОФС «Вирусная безопасность».

Завершающим этапом в производстве препарата является лиофильное высушивание и фасовка готового ЛП.

БТ легко подвергается денатурации при механических нагрузках, при образовании пузырьков на поверхности раздела фаз жидкость/воздух. При восстановлении препарата, а также при приготовлении его разведений и смешивании следует соблюдать осторожность: избегать вспенивания препарата и турбулентности.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Лиофилизированный порошок или уплотненная пористая масса белого или белого с желтоватым оттенком цвета.

**Подлинность.** Токсическая активность ботулинического токсина типа А должно нейтрализоваться антитоксином *C. botulinum* типа А. Подлинность определяют биологическим методом или другим подходящим валидированным методом, например иммуноферментным анализом. Методика испытания должна быть указана в нормативной документации.

*Биологический метод.* Наличие ботулинического токсина подтверждают развитием специфических клинических признаков интоксикации у трех мышей, которым вводят внутрибрюшинно 0,5 мл раствора препарата, разведенного 0,9 % раствором натрия хлорида до активности 4 ЕД/мл. Гибель животных должна наступить в течение 4 сут после инъекции препарата.

Препарат считают выдержавшим испытание, если за время наблюдения не наступила гибель хотя бы одного животного и/или отсутствовали специфические клинические признаки ботулизма (полное расслабление всех мышц, симптом «осиная талия» - ослабление мышц брюшной стенки и др.) у животных, которым ввели препарат, нейтрализованный сывороткой противоботулинической типа А, а их масса в конце испытания не изменилась.

Если в течение 4 сут наблюдалась гибель или потеря массы у одного из видов животных, исследование может быть повторено на животных этого же вида.

Препарат считают не прошедшим испытание, если результаты первого и второго тестов оказались неудовлетворительными.

**Время растворения.** Содержимое флакона должно полностью раствориться в 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида в течение 4 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

**Прозрачность восстановленного раствора.** Должен выдерживать сравнение с эталонным раствором III. Содержимое каждого из 5 флаконов с препаратом растворяют в 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и объединяют в одну емкость. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Степень окраски восстановленного раствора**. Не должен превышать эталон Y5. Содержимое каждого из 5 флаконов с препаратом растворяют в 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и объединяют в одну емкость. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

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

**рН.** От 5,6 до 6,6. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» по методике определения потери в массе при высушивании в биологических лекарственных препаратах или в соответствии с ОФС «Определение воды» методом Фишера.

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

**Пирогенность.** Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Содержимое одного флакона растворяют в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Восстановленный раствор прогревают, на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждают до комнатной температуры и вводят кроликам внутримышечно из расчета 0,2 мл/кг массы тела.

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным после нейтрализации антитоксином (сывороткой противоботулинической типа А) (раздел «Подлинность»). Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

**Специфическая активность.** От 35 до 65 ЕД или от 70 до 130 ЕД в одном флаконе. За одну ЕД препарата, которая соответствует одной LD50, принимают такое количество токсина, которое вызывает гибель 50 % белых аутбредных мышей массой 18-20 г при внутрибрюшинном введении в течение 4 сут.

Для испытания препарата с активностью 100 ЕД в каждый из 4 флаконов с препаратом вносят 5,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, осторожно перемешивают, избегая вспенивания, содержимое флаконов объединяют. В 5 флаконов, предварительно маркированных от «1» до «5», вносят 0,9 % раствора натрия хлорида в соответствии с табл. 1.

Таблица 1 - Приготовление разведений препарата «Токсин ботулинический типа А в комплексе с гемагглютинином, 100 ЕД»

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№ флакона** | **Объем 0,9 % раствора натрия хлорида, мл** | **Объем раствора препарата, мл** |
| 1 | 4,92 | 1 |
| 2 | 3,35 | 0,5 |
| 3 | 4,50 | 0,5 |
| 4 | 6,01 | 0,5 |
| 5 | 7,95 | 0,5 |

Каждый из полученных растворов вводят внутрибрюшинно 6 мышам в объеме 0,5 мл. Вся процедура должна занимать не более 2 час.

Для испытания препарата с активностью 50 ЕД в каждый из 4 флаконов с препаратом вносят 10,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, осторожно перемешивают, избегая вспенивания, содержимое флаконов объединяют. В 5 флаконов, предварительно маркированных от «1» до «5», вносят 0,9 % раствора натрия хлорида в соответствии с табл. 2.

Таблица 2 - Приготовление разведений препарата «Токсин ботулинический типа А в комплексе с гемагглютинином, 50 ЕД»

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№ флакона** | **Объем 0,9 % раствора натрия хлорида, мл** | **Объем раствора препарата, мл** |
| 1 | 1,25 | 2,5 |
| 2 | 1,85 | 2 |
| 3 | 2,25 | 1,5 |
| 4 | 3,38 | 1,5 |
| 5 | 3,22 | 1 |

Каждый из полученных растворов вводят внутрибрюшинно 6 мышам в объеме 0,5 мл. Вся процедура должна занимать не более 2 час.

Наблюдение за животными ведут в течение 4 сут после инъекции, регистрируя количество погибших животных.

*LD50* вычисляют по формуле Кербера:

где:

- максимальная доза токсина, мл (=0,0845 мл - для препарата с активностью 100 ЕД; = 0,338 мл - для препарата с активностью 50 ЕД);

- десятичный логарифм кратности разведений (кратность разведения составляет 1,3, = 0,1139);

- отношение числа животных, погибших от введения данной дозы к общему количеству животных, которым была введена данная доза.

Активность (А) в ЕД препарата во флаконе рассчитывают по формуле:

,

где:

- объем 0,9 % раствора натрия хлорида, внесенного во флакон с препаратом, мл: 5 мл - для препарата с активностью 100 ЕД; 10 мл - для препарата с активностью 50 ЕД.

**Желатин.** От 3,5 до 8,5 мг в одном флаконе. Определяют колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение белка» методом 5. В два флакона с препаратом добавляют по 0,25 мл воды и объединяют содержимое флаконов в одну емкость, затем отбирают 0,2 мл исходного раствора препарата, добавляют 0,8 мл воды и 4 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Проводят измерение оптической плотности раствора при дине волны 600 нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют контрольную пробу, содержащую 1 мл воды и 4 мл биуретового реактива. Количество желатина определяют по калибровочному графику. Количество желатина () мг во флаконе определяют по формуле:

*,*

где:

А - количество желатина, найденное по калибровочному графику, мг/мл;

5 - кратность разведения исходного раствора;

4 - количество флаконов, содержащих 1 мл исходного раствора.

Построение калибровочного графика

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 10 мл 10 % раствора желатина, доводят объем раствора до метки водой и перемешивают. В 5 пробирок отбирают по 1, 2, 3, 4, 5 мл полученного раствора, добавляют по 0,06 мл 20 % раствора мальтозы и доводят объем в каждой пробирке до 5 мл водой и перемешивают (содержание белка в 1 мл соответствует 2, 3, 6, 8 и 10 мг). В 5 отдельных чистых пробирок вносят по 1 мл каждого образца, прибавляют 4 мл биуретового реактива, перемешивают и выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 600 нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют пробу, содержащую 1 мл воды и 4 мл биуретового реактива. Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс количество желатина в мг/мл, по оси ординат - величину оптической плотности. Калибровочный график строят при каждом определении.

Примечания

Приготовление 10 % раствора желатина. К 10,0 г (точная навеска) желатина добавляют 70 мл воды, оставляют на (18±1) ч для набухания, затем автоклавируют 2 ч при температуре (132±2) ºС. При этом желатин частично гидролизуется и сохраняет жидкую форму при (20±2) ºС. К охлажденному раствору желатина добавляют воду до 100 мл и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление 20 % раствора мальтозы. 10,0 г (точная навеска) мальтозы вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

**Мальтоза.** От 10 до 15 мг в одном флаконе. Определение проводят рефрактометрическим методом в соответствии с ОФС «Рефрактометрия». Во флакон с препаратом добавляют 0,25 мл воды. Отбирают 0,1 мл полученного раствора и наносят на датчик рефрактометра. Концентрацию мальтозы определяют по калибровочному графику.

Содержание мальтозы () мг во флаконе вычисляют по формуле:

*,*

где:

А - количество мальтозы, найденное по калибровочному графику, мг/мл;

0,25 - количество исходного раствора в 1 флаконе, мл.

Калибровочный график. В 10 пробирок вносят 20 % раствор мальтозы в количестве: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,25; 2,5 (содержанием мальтозы соответствует от 10 до 100 мг), добавляют 1,2 мл 10 % раствора желатина и перемешивают. Объем жидкости в каждой пробирке доводят водой до 5 мл и вновь перемешивают. Измеряют показатель преломления для каждого испытуемого образца и строят калибровочный график зависимости величины показателя рефракции от концентрации мальтозы (мг/мл). Калибровочный график воспроизводят при каждом анализе.

Примечания

Приготовление 20 % раствора мальтозы и 10 % раствора желатина указаны в разделе «Желатин».

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

**Транспортирование и хранение.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». В отдельной закрытой маркированной пачке, при температуре от 2 до 8 оС.