|  |  |
| --- | --- |
| Иммуноглобулин человека  против COVID-19  для внутривенного введения | ФС  Вводится впервые |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препарат иммуноглобулина человека против COVID-19 для внутривенного введения. Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G, обладающие активностью антител к SARS-CoV-2.

Препарат не содержит консервантов и антибиотиков.

ПРОИЗВОДСТВО

Для производства иммуноглобулина человека против COVID-19 для внутривенного введения используется:

- карантинизированная плазма крови доноров, содержащая антитела IgG, нейтрализующие вирус SARS-CoV-2, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования»;

- некарантинизированная плазма крови доноров, содержащая антитела IgG, нейтрализующие вирус SARS-CoV-2, и соответствующая по показателям качества ФС «Плазма человека для фракционирования», при условии наличия в технологическом процессе производства не менее 4 валидированных стадий удаления и инактивации вирусов.

- патогенредуцированная плазма крови доноров, содержащая антитела IgG к вирусу SARS-CoV-2, соответствующая по показателям качества ФС «Плазма человека для фракционирования».

Технологический процесс производства препарата иммуноглобулина человека против COVID-19 включает процедуры инактивации и/или удаления вирусов: фракционирование этанолом на холоду, обработку сольвент/детергентной смесью, выдерживание при рН 4,0-4,5 и температуре 37 °C в течение 48 часов, хроматографическую очистку, противовирусную фильтрацию (через фильтр с размером пор 20 нм).

Каждая серия иммуноглобулина изготавливается из пула плазмы доноров, содержащих антитела против SARS-CoV-2, индивидуально проверенных на отсутствиеповерхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусу гепатита С, антител к вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена р24 ВИЧ-1, антител к возбудителю сифилиса (Treponema pallidum). Плазма доноров, объединенная в минипулы и производственный пул, дополнительно проверяется на отсутствие РНК вируса гепатита С, РНК вируса иммунодефицита человека и ДНК вируса гепатита В методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В производстве используется плазма только с отрицательными результатами тестирования».

Производство иммуноглобулина человека против COVID-19 для внутривенного введения должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека», ФС «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения» и ОФС «Вирусная безопасность лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека».

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Прозрачный или слегка опалесцирующий, бесцветный или светло-желтый раствор. Определение проводят визуально.

**Подлинность**.

***Видовая специфичность***.

Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека».

***Наличие антител к SARS-CoV-2.***

Должны выявляться антитела к SARS-CoV-2. Определение проводят методом ИФА. Определение иммуноглобулинов класса G (IgG-антител) против антигена SARS-CoV-2 основано на использовании непрямого варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием зарегистрированных наборов реагентов для определения иммуноглобулинов класса G к антигену SARS-CoV-2.

**Прозрачность.** Прозрачный или слегка опалесцирующий раствор с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм).

**Цветность.** Бесцветный или светло-желтый раствор, с оптической плотностью не более 0,05 (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм).

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

**рН.** От 4,5 до 5,5. Испытуемый образец разводят до 1% концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Испытание 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.** От 8,0 до 12,0 % (от 80 до 120 мг/мл). Определение проводят колориметрическим методом c биуретовым реактивом в соответствии с ОФС «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» (метод А).

**Электрофоретическая однородность.** Основная фракция иммуноглобулинов IgG должна составлять не менее 95 % от общего белка. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы». (денситометрический метод).

**Молекулярные параметры**. Содержание мономеров и димеров иммуноглобулина G должно быть не менее 90 %, полимеров и агрегатов – не более 3 %. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

**Фракционный состав**. На электрофореграмме испытуемого препарата должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Испытуемый образец разводят до 1 % концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки против белков сыворотки крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

**Содержание иммуноглобулина А.** Не более 1,0 мг/мл. Определение проводят методом радиальной иммунодифузии в геле (РИД) по Манчини в соответствии с ОФС «Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов G, M и A в препаратах иммуноглобулина человека».

**Термостабильность**. Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

**Стабилизаторы:**

**Глицин**. От 21,0 до 29,0 мг/мл. Определение проводят методом формольного титрования с потенциометрическим определение конечной точки.

**Метод формольного титрования (метод Серенсена)**

К точной навеске или точному объему (указывают в фармакопейной статье) испытуемого образца прибавляют воду до объема 20 мл. При необходимости раствор нейтрализуют потенциометрически до рН 7,0, путем прибавления натрия гидроксида раствора 0,1 М или хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М. По окончании нейтрализации прибавляют от 2 до 10 мл (указывают в фармакопейной статье) формальдегида раствора 35 %, нейтрализованного в день анализа натрия гидроксида раствором 10 % до рН 7,0, перемешивают и титруют натрия гидроксида раствором 0,1

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М соответствует 1,4 мг аминного азота.

*Испытуемый раствор.* Препарат разводят в 4 раза (3 мл препарата помещают в пробирку, прибавляют 9 мл воды и перемешивают). Затем 8 мл полученного раствора переносят в химический стакан вместимостью 50 мл, добавляют 7 мл воды, 5 мл трихлоруксусной кислоты раствора 20 % (все операции проводят стеклянной пипеткой). Полученный раствор тщательно перемешивают стеклянной палочкой и фильтруют через бумажный фильтр (синяя лента).

*Проведение анализа.*

Отбирают 10 мл фильтрата стеклянной пипеткой и помещают в химический стакан вместимостью 50 мл, прибавляют 7 мл воды, перемешивают на магнитной мешалке. Измеряют рН полученного раствора, и, при необходимости, доводят рН раствора до 7,0 добавлением при постоянном перемешивании натрия гидроксида раствора 1 М (около 2,5 мл) и корректируют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты.

Не вынимая электродов из испытуемого раствора и не выключая магнитную мешалку, добавляют 10 мл формалина (рН 7,0) и титруют из бюретки при постоянном перемешивании 0,1 М раствором натрия гидроксида до установления рН 7,6. Вблизи точки эквивалентности титрованный раствор прибавляют по 0,05 мл и после каждого прибавления измеряют рН.

Содержание глицина (Х) в мг/мл в препарате вычисляют по формуле:

Х=, где

0,1 – молярность раствора натрия гидроксида;

V – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование, мл;

Кп – поправочный коэффициент к молярности 0,1 М раствора натрия гидроксида;

75 – молярная масса глицина, г/моль;

20 – общий объем смеси (8 мл раствора иммуноглобулина, 7 мл воды и 5 мл кислоты трихлоруксусной 20 %), мл;

10 – объем фильтрата, мл;

8 – объем раствора иммуноглобулина, взятого на осаждение, мл;

4 – разведение препарата.

За результат принимают среднее значение двух определений.

**Примечание.**

1. Приготовление трихлоруксусной кислоты раствора 20 %.

20,0 г трихлоруксусной кислоты помещают в колбу вместимостью 100 мл. Добавляют 80 мл (80 г) воды и перемешивают до полного растворения навески. Срок годности - 3 мес., хранение при температуре от 2 до 8 °С.

1. Приготовление формалина (рН 7,0).

50 мл формалина помещают в стакан химический, измеряют рН. Если рН отличается от 7,0, доводят значение рН 0,1 М (0,01 М) раствором натрия гидроксида или 0,1 М (0,01 М) раствором хлористоводородной кислоты, рН определяют потенциометрически. Срок годности - 3 мес., хранение при температуре от 2 до 8 °С.

**Вирусинактивирующие агенты:**

**Три-н-бутилфосфат\* (ТБФ).** Не более 1 мкг/мл. Определение проводят методом газовой хроматографии в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» на стадии производственного контроля.

**Полисорбат-80\*.** Не более 5 мкг/мл. Определение проводятметодом газовой хроматографии в соответствии с ОФС «Газовая хроматография» на стадии производственного контроля.

**Осмоляльность.** Не менее 240 мОсм/кг. Определение проводят криоскопическим методом в соответствии с ОФС «Осмолярность».

**Стерильность.** Препарат должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Пирогенность.** Препарат **д**олжен быть апирогенным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Препарат вводят в дозе 500 мг/кг массы тела кролика в объеме не более 10 мл на 1 кг массы тела животного.

**Аномальная токсичность.** Препарат **д**олжен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Двум морским свинкам массой 250-300 г вводят внутрибрюшинно по 5,0 мл препарата, пяти здоровым белям мышам массой 18-20 г по 0,5 мл препарата внутривенно. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

**Специфическая активность.**

*Содержание антител IgG к вирусу SARS-CoV-2).*

Содержание антител **IgG** к вирусу SARS-CoV-2 должно быть не менее 160 АКЕ/мл. Антиковидная единица (АКЕ) – единица активности препарата иммуноглобулина человека против COVID-19. За 1 единицу АКЕ иммуноглобулина принимается величина, обратная его разведению, обладающему способностью ингибировать появление на монослое культуры клеток Vero цитопатогенного действия (ЦПД) SARS-CoV-2 в 2 из 3 лунок в реакции нейтрализации против 2,0 (±0,3) lg ТЦД50 (БОЕ) SARS-CoV-2.

Определение проводят методом непрямого варианта твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями по применению зарегистрированных в Российской Федерации тест-систем для выявления IgG к SARS-CoV-2, для которых экспериментально установлена корреляция между результатами определения содержания антител в плазме с вируснейтрализующей активностью, определенной в тесте с использованием пермиссивной культуры клеток по отношению к соответствующему стандартному образцу.

**Cпецифическая безопасность**

**Антикомплементарная активность.** 1 мг белка иммуноглобулина не должен связывать более 1 ед. (СН50) комплемента. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение антикомплементарной активности в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного введения».

**Анти-А и анти-В гемагглютинины.** Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека» (метод В).

**Анти-D антитела.** Содержание анти-D антител в препарате должно быть не более, чем в положительном стандартном образце. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Испытание на анти- D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека», (метод В).

**Вирусная безопасность.**

**Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).** Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл в соответствии с инструкциями по применению.

**Антитела к вирусу гепатита С.** Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

**Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1.** Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России и имеющих 100 % чувствительность и специфичность в соответствии с инструкциями по применению.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

**Хранение.** Хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств». Замораживание не допускается.