**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

 **ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Интерферон бета -1а, ФС**

**лиофилизат для приготовления**

**раствора для внутримышечного**

**введения**

**Interferon beta -1a, lyophilisate**

**enim solutio est praeparatio**

**ad intramuscular iniectio Вводится впервые**

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Интерферон бета – 1а, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. Препарат представляет собой рекомбинантный Интерферон бета – 1а, полученный с применением технологии рекомбинантной ДНК на клетках яичника китайского хомячка с встроенным геномом интерферона бета человека. Препарат Интерферон бета – 1а является гликолизированным полипептидом, содержащий 166 аминокислот с молекулярной массой 22500.

 Препарат содержит от заявленного количества во флаконе не менее 80 % и не более 120 % Интерферона бета – 1а.

Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Интерфероны»,

ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и нижеприведенным требованиям.

 **Описание.** Должен соответствовать требованиям ОФС «Лиофилизаты». Лиофилизированная масса белого или почти белого цвета.

 **Подлинность** (в восстановленном препарате)

 *Метод обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»)*

 Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика интерферона бета-1а на хроматограмме стандартного раствора интерферона бета-1а.

Определение проводят в соответствии с разделом «Количественное определение».

*Метод титрования на культуре клеток (ОФС « Иммуноферментный метод анализа)*

Препарат должен обладать противовирусной активностью.

Определение проводят в соответствии с разделом «Противовирусная активность».

 **Время растворения.** Не более 60 сек. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Время растворения». Во флакон с лиофилизатом добавляют 1 мл растворителя (вода для инъекций) и медленно поворачивают в одном направлении, замеряя время растворения, затем флакон закрывают пробкой и осторожно переворачивают 2-3 раза и регистрируют время полного растворения препарата.

 **Вода.** Не более 3 %. Определение проводят методом кулонометрического титрования в соответствии с ОФС «Определение воды».

 **Прозрачность** (в восстановленном препарате)**.** Раствор должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

 **Цветность** (в восстановленном препарате)**.** Окраска раствора не должна превышать эталон сравнения Y4. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

 **Механические включения** (в восстановленном препарате). Видимые механические включения должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

Испытания проводят в растворе, приготовленном путем растворения содержимого флакона в 1 мл растворителя (вода).

**рН** (в восстановленном препарате)**.** От 7,0 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

 **Стерильность** (в восстановленном препарате)**.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом мембранной фильтрации.

 **Бактериальные эндотоксины** (в восстановленном препарате)**.** Не более 4,2 ЕЭ/МЕ. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Аномальная токсичность** (в восстановленном препарате)**.** Должен быть не токсичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза 15 мкг в 0,5 мл растворителя на мышь, вводят внутрибрюшинно 5 животным, скорость введения 0,1 мл/сек. Наблюдение за животными в течение 48 ч.

**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 Российской Федерации 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 Российской Федерации 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 Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

**Противовирусная активность.** От 4,8 до 7,8 млн МЕ/мл (от 80, 0 % до 125,0 % от заявленной активности).

Определение проводят на культуре клеток рака легких человека (А 549) или других клеток, чувствительных к интерферону, при заражении их вирусом энцефаломиокардита (ЕМС). Испытание основано на способности интерферона бета - 1а защищать клетки А 549 от воздействия вируса ЕМС, проводится методом иммуноферментного анализа (ОФС «Иммуноферментный анализ»).

 *Приготовление сред и растворов*

Все среды после приготовления фильтруют через фильтр с размером пор

0,22 мкм.

 *Фосфатный буферный раствор pH 6,8.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 28,8 г натрия гидро­фосфата, 11,45 г калия дигидрфосфата, растворяют в воде для инъекций, доводят этим же растворителем до метки и перемешивают. При необходимости доводят pH до 6,8 потенциометрически.

 *Ростовая питательная среда.* 449 мл питательной среды RPMI 1640 по­мещают в бутыль для подготовки реактивов, добавляют 50 мл эмбрио­нальной телячьей сыворотки. К полученной среде добавляют 1 мл 40 мг/мл раствора гентамицина сульфата (конечная концентрация гентамицина сульфата в среде 80 мкг/мл).

 *Испытуемый раствор.* Во флакон с препаратом в асептических условиях стерильным шприцом вводят 1 мл воды для инъекций. Делают аликвоты и хранят при температуре - 70 °С. Далее проводят разведения, указанные в таблице 1. Разведения на планшете делают дважды и получают испытуемый раствор 1 и испытуемый рас­твор 2.

 *Стандартный раствор (раствор стандартного образца).* Во флакон с препаратом в асептических условиях стерильным шприцом вводят 1 мл воды для инъекций. Делают аликвоты и хранят при температуре - 70 °С. Далее про­водят разведения, указанные в таблице 1. Например, активность Меж­дународного стандарта 40000 МЕ/мл, его разбавляют в 400 раз до получения раствора с концентрацией 100 МЕ/мл. Активность рабо­чего стандарта 6000000 МЕ/мл, его разбавляют в 60000 раз до получения раствора с концентрацией 100 МЕ/мл. Далее проводят раз­ведения начиная с 4 этапа таблицы 1.

 *Культура клеток А-549.* Клетки выращивают на вышеописанной ростовой питательной среде (приложение 2). Клетки инкубируют при температуре 37 °С, содержании углекислого газа 5 % и относительной влажности 95 %. Растущие клетки пересевают каждые 2-3 дня. Плотность засевания клеток должна быть 2-4 х 106 клеток на 35-40 мл среды в колбе.

 Каждый флакон с вирусом содержит 3 x 10 БОЕ (бляшкообразующих еди­ниц). В каждую лунку помещают разведение вируса в концентрации 1 БОЕ/клетка.

*Методика подготовки клеток из культуры ткани:*

 Из колбы с культурой ткани отбирают супернатант, промывают клетки фосфатным буферным раствором pH 6,8, добавляют 6 - 8 мл 0,25 % раствора трипсина - трилона Б в фосфатном буферном растворе pH 6,8.

 Клетки инкубируют при температуре 37 °С, содержании углекислого газа 5 % и относительной влажности 95 % в течение 5 - 10 мин по­ка все клетки не отделятся от поверхности колбы с культурой ткани.

 Отбирают клетки из колбы с культурой ткани и помещают в кониче­ские центрифужные пробирки.

 Производят подсчет количества клеток с помощью регулярного гемоцитометра в среде 0,4 % раствора трипанового синего, который служит для определения жизнеспособности клеток и делают клеточную сус­пензию с концентрацией 4 х 105 клеток/мл. В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл помещают 15 мл клеточной суспензии. Аккуратно перемешивают клеточную суспензию и переносят в стерильную емкость.

 *Подготовка к проведению анализа:*

1. Размораживают испытуемый и стандартный растворы
2. Подготовка разведений:

 - Ростовую питательную среду используют свежеприготовленной

 - Все насадки micro-tips необходимо намочить до от­бора аликвот образов.

 Готовят разведения испытуемых и стандартных растворов в ростовой питательной среде в соответствии с табл. 1.

Таблица 1. Приготовление разведений испытуемого и стандартных растворов в ростовой питательной среде

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер этапа/шага разведения | От этапа № | Концентрация в МЕ/мл | Степень разбавления | Объем (мл) | Объем ростовой питательной среды (мл) | Конечная концентрация МЕ/мл | Конечная концентрация на планшете МЕ/мл |
| 1 | Исходный лиофилизат | 6 000 000 | 6х | 0,020 | 0,10 | 1000 000 |  - |
| 2 | 1 | 1 000 000 | 100х | 0,010 | 0,99 | 10 000 |  - |
| 3 | 2 | 10 000 | 100х | 0,010 | 0,99 | 100 |  - |
| 4 | 3 | 100 | 2х | 0,10 | 0,10 | 50 |  50 |
| 5 | 4 | 50 | 2х | 0,10 | 0,10 | 25 |  25 |
| 6 | 5 | 25 | 2х | 0,10 | 0,10 | 12,5 |  12,5 |
| 7 | 6 | 12,5 | 2х | 0,10 | 0,10 | 6,25 |  6,25 |
| 8 8 | 7 | 6,25 | 2х | 0,10 | 0,10 | 3,12 |  3,12 |
|  9 | 8 | 3,12 | 2х | 0,10 | 0,10 | 1,56 |  1,56 |
| 1991 10 | 9 | 1,56 | 2х | 0,10 | 0,10 | 0,78 |  0,78 |

 Все разведения готовят на стерильном планшете с 96 лунками за ис­ключением этапов 1-3, которые проводят в микроцентрифужных про­бирках вместимостью 1,5 мл.

 Стартовая концентрация тестируемых и стандартного растворов, которые отбирают для приготовления серии разведений на планшете, составляет 100 МЕ/мл.

Осторожно перемешивают растворы на планшете 5-6 раз, удаля­ют 0,1 мл в каждом следующем разведении и повторяют действие для 7 разведений.

*Методика подготовки планшета для количественного определения:*

 Дважды промокают микропипетки, отбирают аликвоты по 100 мкл ис­пытуемых и стандартного растворов из микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 мл и помещают в лунки планшеты с В2 по В10 в со­ответствии с таблицей 2, в рядах С-Н готовят разведения, соответствующие этапам № 5-10 таблицы 1.

Таблица 2. Подготовка планшета для количественного определения

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ряды | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | бланк | бланк | бланк | бланк | бланк | бланк | бланк | бланк | бланк | бланк | бланк | бланк |
| B | бланк | S1 | S1 | S1 | S2 | S2 | S2 | cт | cт | cт |  (+) к | (-) к |
| C |  бланк | S1 | S1 | S1 | S2 | S2 | S2 | cт | cт | cт | (+) к | (-) к |
| D | бланк | S1 | S1 | S1 | S2 | S2 | S2 | cт | cт | cт |  (+) к | (-) к |
| E | бланк | S1 | S1 | S1 | S2 | S2 | S2 | cт | cт | cт | (+) к | (-) к |
| F | бланк | S1 | S1 | S1 | S2 | S2 | S2 | cт | cт | cт |  (+) к | (-) к |
| G | бланк | S1 | S1 | S1 | S2 | S2 | S2 | cт | cт | cт | (+) к | (-) к |
| HHH Н | бланк | S1 | S1 | S1 | S2 | S2 | S2 | cт | cт | cт |  (+) к | (-) к |

где: бланк - (ростовая питательная среда);

 S1 - испытуемый раствор 1;

 S2 - испытуемый раствор 2;

 ст - стандартный раствор;

(+) к - положительный контроль (клетки не деградируют т.к. не добав­ляется вирусная суспензия);

(-) к - отрицательный контроль (клетки деградируют т.к. не добавляет­ся интерферон бета - 1 а)

 Планшет инкубируют при температуре 37 °С, содержании углекисло­го газа 5 % и относительной влажности 95 % в течение 1 ч.

 В каждую лунку планшета помещают по 100 мкл клеточной суспензии. Планшет инкубируют при температуре 37 °С, содержании углекислого газа 5 % и относительной влажности 95 % в течение 24 ч.

 После инкубирования в каждую лунку помещают по 100 мкл вируса ЕМС, **за исключением лунок с положительным контролем,** в которые помещают 100 мкл ростовой питательной среды.

 Планшет инкубируют при температуре 37 °С, содержании углекисло­го газа 5 % и относительной влажности 95 % в течение 18-24 ч до по­явления цитопатического (дегенеративного) эффекта в отрицательном контроле.

 В каждую лунку помещают по 50 мкл 0,1 % раствора кристалл – виолетового красителя и записывают время окрашивания.

 Планшет инкубируют при температуре 15 -25 ºС в течение 30 мин.

 Затем планшеты трижды промывают натрия гипохлорита раствором 10 %, сушат при температуре 15-25 ºС, перевернув на тканевую поверхность.

Проводят определение оптической плотности при 540 нм в приборе с программным обеспечением обработки результатов количественного определения методом параллельных линий.

**Приложение 1**

***Культивирование вируса ЕМС***

\* Работу с вирусом ЕМС необходимо выполнять в соответствии с требования­ми, предъявляемыми к работе с микроорганизмами 3-4 группы патогенности.

 В хирургических перчатках и защитной маске открывают контейнер с жидким азотом. С большими предосторожностями помещают флакон с клетками L929 в стакан со льдом и водой и оставляют до мо­мента оттаивания. Через минуту осторожно встряхивают флакон, который находится в стакане пока содержимое флакона полностью не оттает.

 Через 3 мин в вытяжном шкафу дезинфицируют флакон с клетками L929 раство­ром спирта этилового раствором 70 %, открывают флакон, переносят содержимое флакона пипеткой объемом 5 мл в колбу, со­держащую 10 мл культуральной среды RPMI, добавляют 1 мл инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и быстро перемеши­вают полученную смесь, далее центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин при температуре 4 °С.

 Далее удаляют супернатант и растворяют клеточный седимент в 10 мл све­жеприготовленной культуральной среды RPMI, добавляют 1 мл инактивированной ЭТС и переносят содержимое в Т - колбу площадью 25 см2 и инкубируют клетки при температуре 37 °С, содержании углекислого газа 5 % в течение 48 ч.

 Через 2 дня под микроскопом проверяют образование клеток, если один полный клеточный слой еще не образовался, инкубируют колбу еще в течение 24 ч при тех же условиях указанных выше.

 После того, как образуется полный клеточный слой, переносят содержимое колбы в новую Т - колбу площадью 75 см2, добавляют 3 мл трипсина - трилона Б раствора 0,25 % в фосфатном буферном растворе pH 6,8 и удаляют его немедленно.

 Далее добавляют 500 мкл трипсина - трилона Б раствора 0,25 % в фосфат­ном буферном растворе pH 6,8 в колбу и инкубируют клетки при температуре 37 °С, содержании углекислого газа 5 % в течение 5 мин.

 Отбирают клетки из колбы и переносят в стерильную пробирку вместимостью 50 мл, добавляют 10 мл культуральной среды RPMI и 1 мл ЭТС.

 Отбирают 100 мкл образца из раствора и проводят подсчет клеток под микроскопом, их количество на этой стадии должно быть 80 х 105 клеток/мл.

 ВТ- колбу площадью 75 см помещают 1 мл клеточной суспензии (80 х 105 клеток/мл), добавляют 9 мл культуральной среды RPMI и 1 мл ЭТС и инкубиру­ют 48-72 ч при температуре 37 °С, содержании углекислого газа 5 %. После образования полного клеточного слоя, в колбу добавляют 50 мкл вируса ЕМС и инкубируют клетки при температуре 37 °С в течение 20-24 ч.

 Содержимое колбы помещают в центифужную пробирку и центрифу­гируют в течение 10 мин при 3000 об/мин при температуре 4 °С. По 100 мкл супернатанта помещают в стерильные крио - флаконы и замораживают при температуре - 80 °С.

**Приложение 2**

**Культивирование** **клеток А549**.

 В хирургических перчатках и защитной маске и защитных очках от­крывают контейнер с жидким азотом достают флакон с клетками А549 и помещают в стакан со льдом и водой до момента оттаивания.

 Через 5 мин осторожно встряхивают флакон, который находится в стакане, пока содержимое флакона полностью не оттает.

 В вытяжном шкафу дезинфицируют флакон раствором спирта этилового 70 %, и открывают флакон. Переносят содержимое флакона в Т - колбу площадью 25 см2, содер­жащую 9 мл культуральной среды RPMI.

 В колбу добавляют 1 мл инактивированной ЭТС и осторожно пере­мешивают полученную смесь.

 Инкубируют клетки при температуре 37°С, содержании углекислого газа 5 % в течение 24 ч. Добавляют 3 мл трипсина - трилона Б раствора 0,25 % в фосфатном буферном растворе pH 6,8, переносят содержимое колбы в новую Т- колбу площадью 75 см2, добавляют 500 мкл трипсина - трилона Б раствора 0,25 % в фос­фатном буферном растворе pH 6,8 и промывают клеточный монослой. Отбирают клетки из колбы и переносят содержимое в центрифуж­ную пробирку вместимостью 50 мл и центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин при темпера­туре 4 °С. Затем супернатант удаляют и добавляют 9 мл культуральной среды RPMI и 1 мл ЭТС. Клеточную суспензию помещают в Т - колбу площадью 75 см2. Через 24 ч добавляют 3 мл трипсина - трилона Б раствора 0,25 % в фосфатном буферном растворе pH 6,8 и переносят содержимое колбы в новую Т- колбу площадью 75 см2. В колбу добавляют 500 мкл трипсина - трилона Б раствора 0,25 % в фос­фатном буферном растворе pH 6,8 и промывают клеточный монослой.

 Отбирают клетки из колбы и переносят содержимое в центрифуж­ную пробирку вместимостью 50 мл. Центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин при темпера­туре 4 °С. Удаляют супернатант, добавляют 9 мл культуральной среды RPMI и 1 мл ЭТС.

 Под инвертированным фазово-контрастным микроскопом проверяют образование клеток. Отбирают 100 мкл образца из раствора и проводят подсчет клеток. Эти клетки готовы для проведения теста антивирусной активности или для дальнейших пассажей с целью получения банка клеток для будущих анализов. Отбирают клетки в аликвоте 4 х 105 клеток/мл, помещают в стерильные крио - флаконы и замораживают при температуре минус 80 °С, на этикетке флакона указывают номер серии и дату приготовления клеточного банка.

 **Количественное определение**

Определение проводят методом обращено-фазовой ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

 *Подвижная фаза А (ПФА).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 500 мкл трифторуксусной кислоты, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают, фильтруют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм и дегазируют в течение 10 мин. Раствор хранят при температуре 15-25º С в течение 3 дней.

 *Подвижная фаза В (ПФВ).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 500 мкл трифторуксусной кислоты, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки, перемешивают, фильтруют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм и дегазируют в течение 10 мин. Раствор хранят при температуре 15-25º С в течение 1 недели.

 *Метанол раствор 20 %.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды, добавляют 200 мл метанола, перемешивают на магнитной мешалке, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают, фильтруют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,22 мкм и дегазируют в течение 10 мин. Раствор хранят при температуре 15-25º С не более 1 мес.

 *Фосфатный буферный раствор рН 7,0.* В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 6 г натрия дигидро­фосфата дигидрата, 2,85 г натрия гидрофосфата моногидрата и 3,2 г натрия хлорида, растворяют в 400 мл воды очищенной, используя маг­нитную мешалку, устанавливают pH до 7,0 натрия гидроксида раствором 1М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Фильтруют рас­твор через фильтр с размером пор 0,22 мкм и дегазируют в течение 10 мин. Раствор хранят при температуре 15-25 ºС не более 1 недели.

 *Раствор альбумина человека 15 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 75 мг альбумина чело­века, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают.

 *Испытуемый раствор.* Содержимое 1 флакона растворяют в 1 мл воды для инъек­ций и тщательно перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 - 8 °С в течение 3 дней.

 *Стандартный раствор 30 мкг/мл.* 30 мкг стандартного образца интерферона бета-1а растворяют в 1 мл воды для инъекций и тщательно перемешивают. Раствор хранят при температуре 2 - 8 °С в течение 3 дней.

 *Хроматографические условия*

Колонка: 4,6 х 150 мм силикагель октадецильный, 7 мкм

Скорость потока: 0,5 мл/мин

Температура колонки: 25 °С ± 2 °С

Температура образца: 5 °С ± 3 °С

Детектор: УФ, 280 нм

Объем пробы: 100 мкл

Объем петли: 100 мкл

Время хроматографирования: 45 мин

Программа режима элюирования представлена в таблицах 1, 2, 3, 4.

Таблица 1. Режим элюирования при проведении анализа

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Время (мин) |  Подвижная фаза А, %  |  Подвижная  фа­за В, % | Градиент |  Скорость  по­тока |
| 0-2 | 100 | 0 | Линейный | 0,5 мл /мин |
| 2-40 | 0 | 100 | Изократический | 0,5 мл /мин |
| 40-45 | 100 | 0 | Изократический | 0,5 мл /мин |

Таблица 2. Режим элюирования при уравновешивании колонки

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Время(мин) |  Подвижная  фаза А, % |  Подвижная фа­за В, % | Градиент |  Скорость  по­тока |
| 0-30 | 100 | 0 | Изократический |  0,5 мл /мин |
| 30-90 | 0 | 100 | Изократический |  0,5 мл /мин |

Таблица 3 Режим элюирования для настройки новой колонки

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Время(мин) |  Подвижная  фаза А, % |  Подвижная фа­за В, % | Градиент |  Скорость по­тока |
| 0-240 | 100 | 0 | Изократический |  0,5 мл /мин |
| 240-241 | 0 | 100 | Линейный |  0,5 мл /мин |
| 241-300 | 0 | 100 | Изократический |  0,5 мл /мин |
| 300-301 | 0 | 100 | Линейный |  0,5 мл /мин |
| 301-600 | 0 | 100 | Изократический |  0,5 мл /мин |

Таблица 4 Режим элюирования для очистки колонки

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Время (мин) |  Вода  очи­щенная, % % |  Раствор метанола 20 %202020%% % | Градиент |  Скорость  по­тока |
| 0-30 | 100 | 0 | Изократический | 0,5 мл /мин |
| 30-90 | 0 | 100 | Изократический | 0,5 мл /мин |

 В хроматограф последовательно вводят: воду для инъекций, буферный рас­твор pH 7, стандартный раствор - 3 раза, испытуемый раствор - 3 раза, раствор альбумина человека 15 мг/мл и записывают хроматограммы.

Время удерживания интерферона человека - 1 а - около 28 мин

Время удерживания альбумина человека - около 22 мин

Время удерживания компонентов буферного раствора - около 3,5 мин

 *Пригодность хроматографической системы*

- фактор асимметрии пика интерферона бета - 1а (АS) - не более 2;

- относительное стандартное отклонение площади пика испытуемого раствора, должно быть не более чем 2 % (3 определения);

- относительное стандартное отклонение площади пика стандартного раствора интерферона бета - 1а, должно быть не более чем 2 % (3 определения);

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику интерферона бета - 1а, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок.

Содержание интерферона бета - 1а в мкг/мл вычисляют по формуле:

 $ X=\frac{S∙ao}{So},$

где: S – площадь пика интерферона - бета 1а на хроматограмме испытуемого раствора;

 So – площадь пика интерферона - бета 1а на хроматограмме стандартного раствора;

 ao – содержание интерферона - бета 1а в стандартном растворе, мкг/мл.

 **Хранение.** При температуре от 2 до 8 ºС в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств»**.**