**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

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

**Интерферон гамма ФС**

**человеческий рекомбинантный,**

**субстанция - жидкость**

***Interferonum gamma humana***

***recombinant, substantia – liquid* Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Интерферон гамма человеческий рекомбинантный, субстанция – жидкость. Лекарственный препарат представляет собой гликопротеин, состоящий из 144 аминокислотных остатков и лишен первых трех аминокислотных остатков Cys — Tyr — Cys (Цистеин — Тирозин — Цистеин), которые заменены на Met (Метионин). Молекулярная масса интерферона гамма -16900 — 25000. Активными веществом субстанции является интерферон гамма, полученный из штамма *Escherichia coli* SG 200-50, трансформированного плазмидой pGIF315.

Субстанция должна соответствовать требованиям ОФС «Интерфероны», ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток» и ниже приведенным требованиям.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство субстанции - интерферона гамма человеческий рекомбинантный является результатом микробиологического синтеза в рекомбинантном штамме *E. coli*, в дальнейшем интерферон гамма очищается с помощью колоночной хроматографии. Все этапы производственного процесса субстанции - интерферона гамма человеческого рекомбинантного должны соответствовать надлежащим требованиям, гарантирующим качество и безопасность его применения для человека и соответствующие требованиям ОФС «Интерфероны».

**Описание.** Прозрачная, слегка опалесцирующая, бесцветная жидкость.

**Подлинность**. Субстанция должна обладать активностью против вируса везикулярного стоматита, которая должна нейтрализоваться моноклональными антителами против интерферона гамма человека, при титровании на культуре клеток Л-68. Определение проводят в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток».

*Определение подлинности субстанции в реакции нейтрализации*

Реакцию нейтрализации проводят в 96 луночных планшетах для культивирования клеток. Перед постановкой реакции оценивают состояние монослоя культуры под микроскопом. Для идентификации используют только планшеты со сплошным монослоем, из которых удаляют ростовую питательную среду. В стерильных пробирках делают разведения испытуемого раствора до 100 МЕ/мл в ростовой питательной среде и смешивают с моноклональными антителами против интерферона гамма человека в разведении антител 1: 1000 в ростовой питательной среде. Смесь испытуемого образца и антител встряхивают и выдерживают 60 мин при температуре (37 ± 1,0)º С.

После инкубации определение активности испытуемого раствора проводят по разделу «Специфическая активность».

Далее в опыте используют не менее 3 лунок с культурой. Опыт сопровождается контролями: контроль культуры – лунки, не содержащие смеси испытуемого раствора и антител, контроль испытуемого раствора и контроль вируса. Если в культуре клеток при внесении в нее испытуемого раствора с антителами отмечается цитопатическое действие вируса, значит антитела в данном разведении нейтрализуют противовирусное действие испытуемого раствора и, следовательно, данная субстанция гомологична интерферону гамма человека.

Примечание

*Приготовление ростовой питательной среды.* Используют основную питательную среду Игла МЕМ с двойным набором аминокислот. В стерильный градуированный флакон вместимостью 500 мл наливают 50 мл сыворотки крови плодов коровы, инактивированной при температуре (56 ± 1,0)º С в течение (60 ± 5) мин, затем добавляют по 50000 ЕД канамицина и ген тамицина и прибавляют основную питательную среду до метки, закрывают стерильной резиновой пробкой и хранят про температуре 4 – 6 º С в течение недели.

**Прозрачность.** Раствор должен быть прозрачным или выдерживать требования с эталоном сравнения I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Раствор должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН**. От 7,5 до 8,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

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

**Содержание белков штамма-продуцента.** Содержание белков штамма-продуцента *E. coli* должно быть не более 3 мкг/мл (2 % примесей белков *E. coli*). Определение проводят методом иммуноферментного анализа в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа». Ингредиенты контроля включают: экстракт белков *E. Coli,* антитела против белков *Е*. *coli*, конъюгат этих антител с пероксидазой из хрена или определение проводят в соответствии с ОФС «Определение остаточных белков клетки-хозяина».

**Содержание клеточной и векторной ДНК.** Содержание примесей клеточной и векторной ДНК в субстанции **д**олжно быть менее 100 пкг на 1000000 МЕ. Определение проводят в соответствии с методами, указанными в ОФС «Определение остаточной ДНК».

**Белок.** От 150 до 175 мкг/мл. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Определение белка» по методу Лоури без предварительного осаждения с использованием в качестве стандартного образца бычий сывороточный альбумин.

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,5 ЕЭ на 1000000 МЕ раствора субстанции. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Аномальная токсичность.** Должна быть не токсичной**.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза 100000 МЕ в 1,0 мл воды для инъекций, вводят внутрибрюшинно на мышь, срок наблюдения 3 сут.

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева.

**Специфическая активность.** Должна иметь активность против вируса везикулярного стоматита (ВВС) в культуре клеток Л-68 не менее 3000000 МЕ/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток» Раздел 1. Специфическая активность.

ВВС пассируют на куриных эмбрионах не менее 3 пассажей (заражающая доза 100 – 1000 ТЦД 50/0,1 мл) при инфекционной активности 100000 – 1000000 ТЦД 50/0,1 мл).

*Получение культуры Л -68*

Ампулу со штаммом диплоидных клеток легкого эмбриона человека (Л-68) переносят из жидкого азота в водяную баню с температурой (40 ± 0,1) º С. Клетки после оттаивания асептически переносят в стеклянный матрац, вместимостью 500 мл и в него с интервалом 1,5- 2 мин добавляют ростовую среду (среда «Игла» двойная – 90 %, сыворотка крови плодов коровы жидкая – 10 %) в количестве 0,25; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,0; 2,0; 2,0; 10,0 мл. После подсчета количества клеток концентрацию клеток в суспензии доводят до посевной путем добавления ростовой среды с добавлением антибиотиков (канамицина 100 ЕД/мл, гентамицина 80 -160 ЕД/мл). Клетки формируют монослой на 4 сутки с типичной для диплоидных фибробластов морфологией.

Для определения активности субстанции возможно использование культуры клеток, которая прошла не менее 21 и не более 30 пассажей.

Монослой клеток, полученный в матраце вместимостью 1000 мл, снимают со стекла 0,125 % раствором трипсина, суспендируют в 40 мл ростовой среды и подсчитывают количества клеток в камере Горяева. Взвесь разводят ростовой средой таким образом, чтобы в 1,0 мл содержалось 200 тыс. клеток. В лунки микропланшетов вносят по 0,1 мл клеток. Через 2-3 сут инкубации при температуре (37 ± 1,0) ºС клетки образуют монослойную культуру.

*Методика определения специфической активности*

Первоначально готовят десятикратные разведения исследуемых образцов монослойной культуры: 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000, а затем последовательные двухкратные разведения: 1:20000; 1:40000; 1:80000; 1:160000; 1:320000; 1:640000; 1:1280000; 1:2560000 и стандартный образец активности в МЕ в ростовой среде. Из планшета с монослоем клеток удаляют ростовую среду и вносят в лунки по 100 мкл последовательных разведений исследуемых образцов. На каждое разведение исследуемых образцов используют не менее 4 лунок с культурой клеток и 4 лунки с культурой клеток оставляют в качестве контрольных. 16 лунок оставляют для контроля дозы индикаторного вируса, в которые вносят по 0,1 мл поддерживающей среды. Инокулированные и контрольные культуры клеток инкубируют в течение 1 сут при температуре (37 ± 1,0)º С в атмосфере с (5,0 ±0,5) % СО2. Далее в каждую лунку вносят определенную заранее дозу ВВС, соответствующую 100 ТЦД50/0,1 мл. Одновременно осуществляют контроль взятой дозы вируса на предназначенных для этой операции 16 лунках с культурой. Используют по 4 лунки на каждое разведение вируса, начиная с разведения соответствующего 100 ТЦД 50 до разведения, соответствующего 0,1 ТЦД 50, с коэффициентом разведения 10. После внесения индикаторного вируса и титрования его дозы, культуру клеток инкубируют на протяжении 48 ч при температуре (37 ± 1,0)º С в атмосфере с (5,0 ±0,5) % СО2 под контролем дозы вируса.

Учет определения активности интерферона проводят, когда доза внесенного вируса соответствует 100 ТЦД50. Если доза вируса соответствующая 100 ТЦД50, вычислена на основании учета результатов через 24 ч после заражения, то учет титрования интерферона также можно проводить через 24 ч под микроскопом. Учет результатов опыта возможен, если отсутствуют признаки дегенерации в контрольной культуре. За титр интерферона принимают величину, обратную разведению субстанции, при котором клеточная культура в 50 % лунок оказалась полностью защищенной от цитопатического действия вируса. Пересчет активности (Х) в МЕ/мл проводится по формуле:

Х = титр образца (Ед/мл) ,

где: Асо : активность стандартного образца, МЕ;

Тсо : титр стандартного образца в ЕД в 1 мл.

*Приготовление 0,125 % раствор трипсина.* Смешивают 1 объем готового раствора 0,25 % раствора трипсина с 1 объемом стерильного натрия хлорида раствора 0,9 % и перемешивают.

**Удельная активность.** Не менее 17000000 МЕ активности субстанции на 1мг белка (расчетная величина).

Вычисление удельной активности (Х) в МЕ проводят по результатам, специфической активности и содержанию белка по формуле:

Х = ,

где: А – специфическая активность, МЕ;

В – содержание белка, мг.

**Молекулярно-массовое распределение.** Не менее 95 % димеров с молекулярной массой от 32000 до 36000. Определение проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» методом гель-фильтрации.

*Фосфатный буферный раствор рН 7,2 – 7,4.* В градуированный химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 32,5 г динатрия гидрофосфата и 1,3 г натрия гидрофосфата, прибавляют 600 мл деионизированной воды и перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора до метки и вновь перемешивают. Раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, дегазируют и хранят в течение 1 мес при температуре 4-6 ºС.

*Испытуемый образец.* Испытуемый образец субстанции предварительно разводят фосфатным буферным раствором рН 7,2 – 7,4 до концентрации белка 0,1 мг/мл.

Делают разведения готовых наборов белков - маркеров с известными молекулярными массами от 13000 до 70000 до концентрации белка 0,1 мг/мл.

*Условия хроматографирования*

Колонка: 250 х 4,6 мм, заполненная гидрофильным силикагелем, 5 – 10 мкм;

Мобильная фаза: 0,2 М фосфатный буферный раствор рН 7,6 -7,8;

Режим элюции: изократический;

Температура колонки: 30 ±1 ºС;

Скорость потока: 1 мл/мин;

Детектор: спектрофотометрический, 214 нм;

Объем вводимой пробы: 100 мкл.

Проводят инжекцию не менее 3 раз по 100 мкл первоначально белков – маркеров и далее испытуемого образца, регистрируя профиль и время выхода пиков. По молекулярной массе белков – маркеров и времени их элюции строят калибровочный график.

Затем проводят инжекцию не менее 3 раз по 100 мкл испытуемого образца и по калибровочному графику вычисляют процентного содержания основного и дополнительных пиков.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре не выше минус 18 ºС в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».