

# ЧАСТНАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

## «ФИЛГРАСТИМА РАСТВОР КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ»

06/2017:2206

*Введена в действие с 01 июня 2017 года  
приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь  
от 21.06.2017 № 697*

*Новая статья*

06/2017:2206

### ФИЛГРАСТИМА РАСТВОР КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ

*Filgrastimi solutio concentrata*

#### **FILGRASTIM CONCENTRATED SOLUTION**

MTPLGPASSL PQSFLLKCLE QVRKIQGDGA ALQEKLCATY  
KLCHPEELVL LGHSLGIPWA PLSSCPSQAL QLAGCLSQLH  
SGLFLYQGLL QALEGISPEL GPTLDTLQLD VADFATTIWQ  
QMEELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAG GVLVASHLQS  
FLEVSYRVLR HLAQP

**C<sub>845</sub>H<sub>1339</sub>N<sub>223</sub>O<sub>243</sub>S<sub>9</sub>**  
[121181-53-1]

**М.м. 18 799**

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Раствор белка, имеющий первичную структуру гранулоцитарного колониестимулирующего фактора с одной дополнительной аминокислотой — N-концевым остатком метионина (r-met HU G-CSF). Белок, в отличие от его природного аналога, не гликолизирован. Человеческий G-CSF продуцируется и секретируется эндотелием, моноцитами и другими иммунными клетками. Белок стимулирует дифференцировку и пролиферацию лейкоцитарных стволовых клеток в зрелые гранулоциты.

*Содержание:* не менее 0,9 мг белка в миллилитре.

*Активность:* не менее  $0,9 \cdot 10^8$  МЕ в миллиграмме белка.

## ПРОИЗВОДСТВО

Концентрированный раствор филграстима получают с помощью метода, основанного на технологии рекомбинантной ДНК (рДНК) с использованием микроорганизмов в качестве клеток-хозяев.

*Перед реализацией на каждой партии готового нефасованного продукта проводятся следующие испытания, если иное не утверждено компетентным уполномоченным органом.*

**Белки клетки-хозяина.** Предельное содержание утверждается компетентным уполномоченным органом.

**ДНК из клетки-хозяина или вектора.** Предельное содержание утверждается компетентным уполномоченным органом.

## ОПИСАНИЕ (СВОЙСТВА)

Прозрачная, бесцветная или слегка желтоватая жидкость.

## ПОДЛИННОСТЬ (ИДЕНТИФИКАЦИЯ)

**А.** Имеет ожидаемую биологическую активность как указано в разделе «Количественное определение».

**В.** Просматривают электрофореграммы, полученные в испытании «Примеси с зарядами, отличающимися от заряда филграстима».

*Результаты:* основная полоса на электрофореграмме испытуемого раствора по положению соответствует основной полосе на электрофореграмме раствора сравнения (а).

**С.** Просматривают хроматограммы, полученные в испытании «Примеси с молекулярными массами, превышающими молекулярную массу филграстима».

*Результаты:* основной пик на хроматограмме испытуемого раствора по времени удерживания соответствует основному пику на хроматограмме раствора сравнения.

**Д.** Просматривают электрофореграммы, полученные в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях в испытании «Примеси с молекулярными массами, отличающимися от молекулярной массы филграстима».

*Результаты:* основная полоса на электрофореграмме испытуемого раствора (а) по положению соответствует основной полосе на электрофореграмме раствора сравнения (b).

**Е.** Просматривают хроматограммы, полученные в испытании «Сопутствующие белки».

*Результаты:* основной пик на хроматограмме испытуемого раствора по времени удерживания и форме соответствует основному пику на хроматограмме раствора сравнения.

**Ф.** Пептидное картирование (2.2.55).

**СЕЛЕКТИВНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ**

*Испытуемый раствор.* Объем испытуемого образца, соответствующий 25 мкг белка, помещают в полипропиленовую пробирку. Прибавляют 25 мкл раствора 0,1 мг/мл глутамилэндопептидазы для пептидного картирования Р. Доводят 0,02 М буферным раствором натрия фосфата рН 8,0 Р до объема 100 мкл, закрывают пробирку пробкой и инкубируют при температуре около 37 °С в течение 17 ч. До начала проведения испытания хранят при температуре от 2 °С до 8 °С.

*Раствор сравнения.* Готовят параллельно с испытуемым раствором, используя ФСО филграстима вместо испытуемого образца.

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ.** Жидкостная хроматография (2.2.29).

Условия хроматографирования:

– колонка длиной 0,10 м и внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р (размер частиц 5 мкм) с размером пор 20 нм;

– температура: 60 °С;

– подвижная фаза:

– подвижная фаза А: 0,5 мл трифторуксусной кислоты Р разводят в 950 мл воды Р, прибавляют 50 мл ацетонитрила для хроматографии Р и перемешивают;

– подвижная фаза В: 0,5 мл трифторуксусной кислоты Р разводят в 50 мл воды Р, прибавляют 950 мл ацетонитрила для хроматографии Р и перемешивают;

Время (мин)	Подвижная фаза А (%, об/об)	Подвижная фаза В (%, об/об)
0—8	97 → 94	3 → 6
8—25	94 → 66	6 → 34
25—40	66 → 10	34 → 90
40—45	10	90

– скорость подвижной фазы: 0,2 мл/мин;

– спектрофотометрический детектор, длина волны 215 нм;

– объем вводимой пробы: 10 мкл.

**Пригодность хроматографической системы:**

– хроматограмма раствора сравнения соответствует хроматограмме расщепленного филграстима, прилагаемой к ФСО филграстима.

**Результаты:** профиль хроматограммы испытуемого раствора, соответствует профилю хроматограммы раствора сравнения.

## ИСПЫТАНИЯ

**Примеси с молекулярными массами, превышающими молекулярную массу филграстима.** Эксклюзионная хроматография (2.2.30): определение проводят методом нормализации.

**Раствор А.** 4,1 г натрия ацетата Р растворяют в 400 мл воды Р, доводят кислотой уксусной Р до рН 4,0 и доводят водой Р до 500 мл.

**Испытуемый раствор.** Испытуемый образец разводят раствором А до получения раствора с концентрацией 0,4 мг/мл.

**Раствор сравнения.** ФСО филграстима разводят раствором А до получения раствора с концентрацией 0,4 мг/мл.

**Раствор для проверки разрешения.** Перемешивают аликвоту раствора сравнения с использованием вихревой мешалки в течение около 30 с.

Условия хроматографирования:

– колонка длиной 0,3 м и внутренним диаметром не менее 7,8 мм, заполненная силикагелем гидрофильным для хроматографии Р (размер частиц 5 мкм), пригодным для разделения глобулярных белков с молекулярными массами в диапазоне от 10 000 до 500 000;

– температура: 30 °С;

– подвижная фаза: 7,9 г аммония гидрокарбоната *P* растворяют в 1000 мл воды *P* и доводят фосфорной кислотой *P* до pH 7,0; доводят водой *P* до объема 2000 мл;

– скорость подвижной фазы: 0,5 мл/мин;

– спектрофотометрический детектор, длина волны 215 нм;

– объем вводимой пробы: 20 мкл.

Относительное удерживание (по отношению к мономеру филграстима, время удерживания — около 19 мин): комплексы — около 0,60; олигомер филграстима 1 — около 0,75; олигомер филграстима 2 — около 0,80; димер филграстима — около 0,85.

Пригодность хроматографической системы: раствор для проверки разрешения:

– время удерживания: мономер филграстима от 17 до 20 мин;

– разрешение: не менее 3 между пиками димера филграстима и мономера филграстима.

Рассчитывают процентное содержание димера, олигомеров и комплексов.

Предельное содержание примесей:

– примеси с молекулярными массами, превышающими молекулярную массу филграстима, и не являющиеся димером: не более 0,5 %;

– общее содержание примесей с молекулярными массами, превышающими молекулярную массу филграстима: не более 2 %.

**Примеси с молекулярными массами, отличающимися от молекулярной массы филграстима.** Электрофорез в полиакриламидном геле (2.2.31) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Размеры геля: 1 мм толщиной.

Разделительный гель: 13 %-ный акриламидный гель.

Буферный образцовый раствор (невосстанавливающие условия). Смешивают равные объемы воды *P* и буферного образцового раствора (концентрированного) для электрофореза в системе натрия додецилсульфат — полиакриламидный гель (SDS-PAGE) *P*.

Буферный образцовый раствор (восстанавливающие условия). Смешивают равные объемы воды *P* и буферного образцового раствора (концентрированного) для электрофореза в системе натрия додецилсульфат — полиакриламидный гель (SDS-PAGE) для восстановительных условий *P*, содержащего 2-меркаптоэтанол в качестве восстанавливающего агента.

Испытуемый раствор (а). Испытуемый образец доводят буферным образцовым раствором до получения раствора с концентрацией 100 мкг/мл.

Испытуемый раствор (b). К 0,20 мл испытуемого раствора (а) прибавляют 0,20 мл буферного образцового раствора.

Испытуемый раствор (c). 0,20 мл испытуемого раствора (b) доводят буферным образцовым раствором до объема 1 мл.

Испытуемый раствор (d). 0,20 мл испытуемого раствора (c) доводят буферным образцовым раствором до объема 1 мл.

Испытуемый раствор (e). К 0,20 мл испытуемого раствора (d) прибавляют 0,20 мл буферного образцового раствора.

Раствор сравнения (а). Используют раствор стандартов молекулярных масс, подходящий для градуирования ДСН-ПАГ гелей в диапазоне от 14,4 кДа до 94 кДа.

Раствор сравнения (b). ФСО филграстима доводят буферным образцовым раствором до получения раствора с концентрацией 100 мкг/мл.

Обработка образца: кипятят в течение 5 мин.

Условия хроматографирования:

- объем вводимой пробы: 20 мкл.
- проявление: окрашивание серебром;
- Пригодность хроматографической системы:**
  - раствор сравнения (а): должны соблюдаться критерии валидации;
  - на электрофореграмме испытуемого раствора (е) должна обнаруживаться полоса;
    - наблюдается градация интенсивности окрашивания на электрофореграммах испытуемых растворов от (а) до (е).
  - Предельное содержание примесей:** испытуемый раствор (а):
    - примеси с молекулярными массами, меньшими или большими, чем молекулярная масса филграстима: на электрофореграмме испытуемого раствора (а) любая полоса, кроме основной полосы, не должна превышать по интенсивности основную полосу на электрофореграмме испытуемого раствора (d) (2,0 %)

**Примеси с зарядами, отличающимися от заряда филграстима.** Изоэлектрическое фокусирование (2.2.54).

**Испытуемый раствор.** Испытуемый образец доводят водой *P* до получения раствора с концентрацией 0,3 мг/мл.

**Раствор сравнения (а).** ФСО филграстима доводят водой *P* до получения раствора с концентрацией 0,3 мг/мл.

**Раствор сравнения (b).** ФСО филграстима доводят водой *P* до получения раствора с концентрацией 0,03 мг/мл.

**Раствор сравнения (с).** Используют раствор для градуирования изоэлектрической точки (pI) в диапазоне pI от 2,5 до 6,5, приготовленный в соответствии с инструкциями производителя.

**Фокусирование:**

- градиент pH: 4,5—8,0;
- катодный раствор: 1 М раствор натрия гидроксида *P*;
- анодный раствор: 0,04 М раствор глутаминовой кислоты *P* в 0,0025 % растворе (об/об) фосфорной кислоты *P*;
- объем вводимой пробы: 20 мкл.

**Проявление:** как описано в общей фармакопейной статье 2.2.54.

**Пригодность хроматографической системы:**

- на электрофореграмме раствора сравнения (с) маркеры соответствующих изоэлектрических точек распределены вдоль всей длины геля;
- на электрофореграмме раствора сравнения (а) pI основной полосы составляет от 5,7 до 6,3.

**Предельное содержание примесей:**

- любая примесь: на электрофореграмме испытуемого раствора любая полоса, кроме основной полосы, не должна превышать по интенсивности основную полосу на электрофореграмме раствора сравнения (b) (10 %)

**Сопутствующие белки.** Жидкостная хроматография (2.2.29): определение проводят методом нормализации.

**Испытуемый раствор.** Испытуемый образец доводят водой для хроматографии *P* до получения раствора с концентрацией 0,5 мг/мл.

**Раствор сравнения (а).** Содержимое виалы с ФСО филграстима доводят водой для хроматографии *P* до получения раствора с концентрацией 0,5 мг/мл.

**Раствор сравнения (b).** К 250 мкл раствора сравнения (а) прибавляют 2,5 мкл раствора 4,5 г/л пероксида водорода. Перемешивают и инкубируют при температуре (25±2) °С в течение 30 мин, затем прибавляют 1,9 мг *L*-метионина *P*.

Раствор сравнения (с). К 250 мкл раствора сравнения (а) прибавляют 0,25 мг дитиотреитола Р. Перемешивают и инкубируют при температуре  $(35\pm 2)$  °С в течение 60 мин.

Условия хроматографирования:

– колонка длиной 0,15 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем бутилсилильным для хроматографии Р (размер частиц 5 мкм) с размером пор 30 нм;

– температура: 60 °С;

– подвижная фаза:

– подвижная фаза А: разводят 1 мл трифторуксусной кислоты Р в 1000 мл воды для хроматографии Р;

– подвижная фаза В: разводят 1 мл трифторуксусной кислоты Р в 100 мл воды для хроматографии Р, затем прибавляют 900 мл ацетонитрила Р;

Время (мин)	Подвижная фаза А (%, об/об)	Подвижная фаза В (%, об/об)
0—30	60 → 20	40 → 80
30—35	20	80
35—45	20 → 60	80 → 40

– скорость подвижной фазы: 0,8 мл/мин;

– спектрофотометрический детектор, длина волны 215 нм;

– объем вводимой пробы: по 50 мкл испытуемого раствора и растворов сравнения (b) и (с);

Относительное удерживание (по отношению к филграстиму, время удерживания — около 23 мин): окисленный филграстим (форма 1) — около 0,84; окисленный филграстим (форма 2) — около 0,98; окисленный филграстим — около 1,04.

Пригодность хроматографической системы: раствор сравнения (b):

– фактор асимметрии: не более 1,8 для пика филграстима;

– коэффициент разделения пиков: не менее 2,0 ( $H_p$  — высота пика окисленной формы 2 относительно базовой линии;  $H_v$  — расстояние между базовой линией и нижней точкой кривой, разделяющей пик окисленной формы 2 и пик филграстима).

Пригодность хроматографической системы: раствор сравнения (с):

– разрешение: не менее 1,5 между пиками филграстима и восстановленного филграстима;

– фактор асимметрии: не более 1,8 для пика филграстима.

Предельное содержание примесей:

– любая примесь: не более 1,0 % для каждой примеси;

– сумма примесей: не более 2,0 %.

**Бактериальные эндотоксины (2.6.14).** Менее 2 МЕ в объеме, содержащем 1,0 мг белка.

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

**Белок.** Жидкостная хроматография (2.2.29), как указано в испытании «Сопутствующие белки» со следующими изменениями.

Условия хроматографирования:

– объем вводимой пробы: по 50 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения (а).

Содержание филграстима ( $C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$ ) в процентах рассчитывают с учетом содержания  $C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$  в ФСО филграстима.

**Активность.** Активность испытуемого образца определяют с помощью сравнения разведений испытуемого образца с разведениями Международного стандартного образца филграстима или стандартного образца, калиброванного в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность в установленном количестве соответствующего Международного стандартного образца. Эквивалентность Международного стандартного образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Проводят количественное определение с помощью подходящего метода, например, приведенного ниже, в котором в качестве способа окрашивания используется переход соли тетразолия (MTS). Установлено, что другие методы количественного определения клеточной пролиферации, например, определение внутриклеточной АТФ с помощью билюминесценции люциферазы, также являются подходящими и могут быть использованы для считывания показаний при количественном определении при условии соответствующей валидации. Условия количественного определения (например, концентрация клеток, период инкубации и разведение) регулируются соответствующим образом.

Используют признанную клеточную линию, чувствительную к филграстиму. Установлено, что подходящими являются M-NFS-60 клетки (ATCC № CRL-1838), чувствительные к G-CSF. Инкубируют, варьируя разведения испытуемого образца и стандартного образца филграстима. Затем инкубируют с использованием раствора соли тетразолия P. С помощью клеточных дегидрогеназ этот цитохимический краситель преобразуется в окрашенный продукт формазана. Формазан затем определяют спектрофотометрически.

По 50 мкл среды разведения помещают во все ячейки микротитрационного планшета с 96 ячейками. Добавляют дополнительные 50 мкл раствора в ячейки, предназначенные для холостых растворов. Прибавляют по 50 мкл каждого испытуемого раствора в трех повторностях (испытуемый образец и образец сравнения с концентрацией около 800 МЕ/мл с последовательностью из десяти 2-кратных разведений для получения стандартной кривой). Готовят суспензию клеток M-NFS-60, содержащую  $7 \cdot 10^5$  клеток в миллилитре. Непосредственно перед использованием прибавляют 2-меркаптоэтанол до получения конечной концентрации 0,1 мМ, затем добавляют по 50 мкл приготовленной суспензии клеток в каждую ячейку, поддерживая при этом нахождение клеток в однородной суспензии.

Инкубируют планшет при температуре от 36,0 °C до 38,0 °C в течение от 44 ч до 48 ч в увлажненном инкубаторе с использованием  $(6 \pm 1) \% CO_2$ . Помещают по 20 мкл стерильного раствора 5,0 г/л соли тетразолия P в каждую ячейку и повторно инкубируют в течение 4 ч. Определяют количество формазана, полученного с использованием считывающего устройства микротитрационного планшета с ячейками, при длине волны 490 нм.

Рассчитывают активность испытуемого образца с использованием подходящего статистического метода, например, модели параллельных линий (5.3).

Найденная активность должна быть не менее 80 % и не более 125 % от заявленной. Доверительный интервал ( $P = 0,95$ ) должен быть не менее 74 % и не более 136 % от найденной активности.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- содержание, миллиграмм белка в миллилитре;
- активность, Международных Единиц в миллиграмме белка.