|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Фоллитропина раствор** **концентрированный** |  | **ФС** |
|  |  |  |
| **Follitropini solutio concentrata** |  | **Вводится впервые** |

Аминокислотная последовательность

|  |
| --- |
|   |

*Эмпирическая формула:*C975 H1515 N267 O305 S26

*Молекулярная масса:* Альфа-субъединица около 14,217 кДа; бета-субъединица около 17,161 кДа.

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фоллитропин альфа рекомбинантный, субстанцию-раствор (замороженный). Раствор гетеродимерного гликопротеина со структурой фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГ), состоит из двух субъединиц: α-цепи из 92 аминокислот, характерной для других гормонов, имеющих гликопротеиновую природу и специфичной β-цепи из 111 аминокислот.

Продуцентом фоллитропина альфа являются генетически модифицированные линии клеток млекопитающих.

Субстанция предназначена для производства готовых лекарственных средств.

В состав субстанции входит консервант и вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство субстанции, полученной с использованием метода рекомбинантной ДНК, должно быть основано на системе серий посевного материала (системе банков клеток), в которой используются Главный банк клеток (ГБК) и Рабочий банк клеток (РБК).

Используемые в процессе производства клетки и материалы биологического происхождения должны быть охарактеризованы и соответствовать требованиям микробиологической и вирусной безопасности.

Все этапы процесса производства должны быть валидированы, в том числе, эффективность каждого этапа очистки в отношении удаления и/или инактивации посторонних агентов и примесей, источником которых могут быть клетки хозяина (вирусы и вирусные частицы, белки), штамм-продуцент (ДНК), а также в отношении удаления примесей, связанных с процессом производства, например, гетерологичных белков (компоненты питательных сред, иммуносорбенты для афинной хроматографии).

Производство субстанции должно проводиться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики и в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные средства, получаемые методом рекомбинантной ДНК», ОФС «Биологические лекарственные препараты», ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты».

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Раствор после размораживания представляет прозрачную или слегка желтоватую жидкость.

Замороженный раствор представляет собой плотную затвердевшую беловатого цвета массу.

**Подлинность.**

Основной пик на хроматограмме испытуемого раствора совпадает по времени удерживания с основным пиком на хроматограмме раствора сравнения, определение проводят методом изоэлектрического фокусирования в соответствии с ОФС «Изоэлектрическое фокусирование».

Обессоливают и выпаривают анализируемую субстанцию в соответствии валидированной методикой. Разводят восстановленный материал в воде для получения концентрации 5 мг/мл.

*Раствор сравнения.* Растворяют содержимое флакона стандартного образца субстанции фоллитропина в воде для получения концентрации 5 мг/мл.

Фокусирование:

– градиент pH: берут смесь амфолитов и электродных буферов, обеспечивающую функциональное разделение в изоэлектрической точке (pI) в диапазоне 3,5-5,5, в соответствии с критериями пригодности системы; вместе с гелями заводского производства возможно использование запатентованных электродных растворов; в ином случае берут подходящие слабые минеральные или органические кислоты или основания с уровнем pH, соответственно, ниже или выше функционального диапазона амфолитов;

– катодный раствор: 20,0 г/л раствор глицина;

– анодный раствор: раствор, содержащий 3,4 г/л аспарагиновой кислоты и 3,6 г/л глутаминовой кислоты, доведенный до pH 2,8-3,8;

– наносимый объем (аппликация): 10 мкл.

Пригодность системы:

– на электрофореграмме раствора сравнения количество полос в области, близкой к изоэлектрической точке 3,5-5,5, соответствует количеству полос на электрофореграмме раствора СО фоллитропина; распределение полос в области, близкой к изоэлектрической точке 3,5-5,5, совпадает с распределением полос на электрофореграмме раствора СО фоллитропина.

Результаты: оценивают электрофореграмму испытуемого раствора; определяют наблюдаемые полосы путем сравнения с электрофореграммой стандартного образца; распределение полос совпадает с распределением полос на электрофореграмме стандартного образца.

Анализируют хроматограммы, полученные при испытании на образование олигомеров в фоллитропине.

Для каждой субъединицы профиль хроматограммы испытуемого раствора должен совпадать с профилем хроматограммы соответствующего раствора сравнении. Определение проводят методом пептидного картирования в сочетании с методом ВЭЖХв соответствии с ОФС «Пептидное картирование».

**Разделение α- и β-субъединиц.**Выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

*Подвижная фаза А (ПФА)* 1 мл трифторуксусной кислоты до 1000 мл с помощью воды для хроматографии.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)* трифторуксусная кислота, вода для хроматографии, ацетонитрил (0,9:50:950)

*Испытуемый раствор*. Испытуемую субстанцию с помощью подвижной фазы А, доводят до концентрации примерно 0,4 мг/мл.

*Раствор сравнения***.** Стандартный образец (СО) фоллитропина для пептидного картирования с помощью подвижной фазы А, доводят до концентрации примерно 0,4 мг/мл.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | 12 × 4,6 мм, эндкепированный бутилсилильный силикагель для хроматографии, 5 мкм |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, эндкепированный бутилсилильный силикагель для хроматографии, 5 мкм |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 226 нм. |
| Объём пробы | 800 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 - 2 | 100 | 0 |
| 2 - 8 | 100 → 76 | 0 → 24 |
| 8 - 17 | 76 | 24 |
| 17 - 36 | 76 → 70 | 24 → 30 |
| 36 - 41 | 70 → 25 | 30 → 75 |
| 41 - 46 | 25 | 75 |
| 46 - 47 | 25 → 100 | 75 → 0 |
| 47 - 57 | 100 | 0 |

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения.

Отбирают фракции, содержащие α- и β-субъединицы и лиофилизируют их.

*Относительное время удерживания*: β-субъединица около14 мин.; α-субъединица около 30 мин.

**Обессоливание, восстановление, модификация очищенных субъединиц.**

*Подвижная фаза А (ПФА)* доводят 1 мл трифторуксусной кислоты до 1000 мл водой для хроматографии ;

*Подвижная фаза Б (ПФБ)* трифторуксусная кислота, вода для хроматографии R, ацетонитрил для хроматографии R (1:300:700)

*Раствор A.* 10 мкл трибутилфосфина доводят до 2 мл с помощью пропанола-2 и азотируют.

*Раствор Б.* 20 мкл 4-винилпиридина доводят до 200 мкл с помощью пропанола-2 и азотируют.

*Буферный раствор*

5,12 г натрия хлорида, 3,03 г трис(гидроксиметил)аминометана и 1,40 г натрия эдетата растворяют в 250 мл воды, доводят рН до 8,4 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 500 мл.

*Испытуемые растворы.*

Каждую фракцию α- и β-субъединиц, собранных из испытуемого раствора на предыдущем этапе растворяют в 300 мкл буферного раствора и инкубируют при 37 °C в течение 60 мин. Добавляют 100 мкл раствора А, перемешивают и азотируют. Инкубируют при 37 °C в течение 90 мин. Добавляют 10 мкл раствора Б, смешивают и азотируют. Инкубируют при 37 °C в течение 45 мин. Добавляют 100 мкл 10% раствора трифторуксусной кислоты и смешивают.

*Растворы сравнения.*

Приготовляют одновременно таким же образом, что и испытуемые растворы, но с использованием фракций α- и β-субъединиц, отобранных из раствора сравнения на предыдущем этапе.

**Обессоливание.** *Выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).*

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 2 × 4,6 мм, бутилсилильный силикагель для хроматографии 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 226 нм. |
| Объём пробы | 800 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 - 7 | 100 | 0 |
| 7 - 27 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 27 – 27,01 | 0 → 100 | 100 → 0 |
| 27,01 - 32 | 100 | 0 |

Испытуемые растворы и растворы сравнения с α- и β-субъединицами доводят до 840 мкл с помощью подвижной фазы A. Собирают фракции, содержащие моновинилпиридин-модифицированные субъединицы и лиофилизируют.

На хроматограмме каждого раствора основной пик соотносится с моновинилпиридин-модифицированной субъединицей, а несколько малых пиков – с ди- и олиговинилпиридин-модифицированными субъединицами. Для расщепления на следующем этапе используют только фракции, содержащие моновинилпиридин-модифицированные субъединици.

*Относительное время удерживания*:

моновинилпиридин-модифицированная α-субъединица около 15 мин;

моновинилпиридин-модифицированная β-субъединица около 16 мин.

**Селективное расщепление пептидных связей**

*Раствор В.* 480 г мочевины растворяют в 600 мл воды хроматографии и доводят до 1000 мл тем же растворителем. Добавляют около 3-5 г ионообменной смолы и перемешивают в течение примерно 1 часа. Перед применением фильтруют через стеклянный фильтр.

*Раствор Г.* 15,8 г аммония гидрокарбоната и 8,3 г натрия эдетата растворяют в 800 мл воды для хроматографии. Доводят до pH 7,8 раствором натрия гидроксида 2М и доводят до 1000 мл водой для хроматографии.

*Испытуемые растворы.* Растворяют каждую фракцию модифицированных α- и β-субъединиц, из испытуемых растворов на предыдущем этапе в 42,5 мкл раствора *В* и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Добавляют 42,5 мкл раствора *Г* и перемешивают. К 42,5 мкл растворов добавляют 35 мкл раствора содержащего 23 мЕ/мкл раствора эндопротеиназы и перемешивают. Инкубируют при 37 °C в течение 4 часов, затем добавляют 35 мкл того же раствора эндопротеиназы и перемешивают. Инкубируют при 37 °C в течение 12 часов, затем доводят до 420 мкл подвижной фазой A.

*Растворы сравнения.* Готовят одновременно таким же образом, что и испытуемые растворы, но с использованием фракций, отобранных из растворов сравнения на предыдущем этапе.

**Хроматографическое разделение.**

*Подвижная фаза А (ПФА)* доводят 1 мл трифторуксусной кислоты до 1000 мл водой для хроматографии;

*Подвижная фаза Б (ПФБ)* трифторуксусная кислота, вода для хроматографии, ацетонитри (1:300:700); *.*

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | 2 × 4,6 мм, октадецилсилильный силикагель для хроматографии, 5 мкм |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, октадецилсилильный силикагель для хроматографии 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 210 нм. |
| Объём пробы | 400 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 - 7 | 100 | 0 |
| 7 - 77 | 100 → 30 | 0 → 70 |
| 77 - 82 | 30 → 0 | 70 → 100 |
| 82 - 87 | 0 | 100 |
| 87 - 92 | 0 → 100 | 100 → 0 |
| 92 - 107 | 100 | 0 |

*Пригодность хроматографической системы:*

α-субъединица:

– хроматограмма раствора сравнения совпадает с хроматограммой пробы α-субъединицы на обеих хроматограммах наблюдаются пики, соотносящиеся с фрагментами L4, L6, L3, L5 и L1-2/L1;

– значения времени удерживания для испытуемого раствора и раствора сравнения отличаются не более чем на 5 % для фрагментов L4, L6 и L3, не более чем на 3 % для фрагмента L5 и не более чем на 2 % для фрагментов L1-2/L1;

β-субъединица:

– хроматограмма раствора сравнения совпадает с хроматограммой пробы β-субъединицы фоллитропина на обеих хроматограммах наблюдаются пики, соотносящиеся с фрагментами L5, L7, L6, и L1-4;

– значения времени удерживания для испытуемого раствора и раствора сравнения отличаются не более чем на 5 % для фрагмента L5, не более чем на 2 % для фрагментов L7 и L6 и не более чем на 1 % для фрагментов L1-4.



Рис.1 Типовая хроматограмма гидролизата модифицированной α-субъединицы



Рис.2 Типовая хроматограмма гидролизата модифицированной β-субъединицы.

**Примечание**

Количество характерных пиков используемых для подтверждения подлинности должно быть не менее 4.

Использование пептидной карты как инструмента качественного определения не требует полной характеристики индивидуальных пептидных пиков. Однако валидация методики пептидного картирования при разработке частных фармакопейных статей и НД требует точной характеристики каждого из индивидуальных пиков пептидной карты. Для характеристики индивидуальных пиков могут быть использованы как метод N-концевого секвенирования с последующим анализом аминокислот, так и метод с использованием массспектроскопии. Для составления характеристики пиков с использованием N-концевого секвенирования и аминокислотного анализа проводят масштабирование стадии аналитического разделения. Необходимо убедиться на основании эмпирических данных, что ухудшения разрешения между пиками вследствие проведения масштабирования не происходит. Элюаты, соответствующие специфическим пептидным пикам, собирают, концентрируют в вакууме и, при необходимости, повторно хроматографируют. Аминокислотный анализ фрагментов может быть ограничен размером пептидов. В случае если N-концевая аминокислота заблокирована, может потребоваться ее высвобождение до секвенирования. С целью получения характеристики может также использоваться С-концевое секвенирование белков в комбинации с карбоксипептидазой и методом матричноактивированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным массанализатором.

**Анализ гликанового профиля.** Проводят по методу A или по методу Б.

**Метод А. Денатурация белков**

*Испытуемый раствор.* 500 мкг анализируемого вещества растворяют в 60 мкл 0,05 М раствора фосфатного буфера pH 7,5. Добавляют 6 мкл 10 мг/мл раствора натрия додецилсульфата и 35 мкл 1 % раствора 2-меркаптоэтанола. Перемешивают, используя вихревую мешалку, центрифугируют и инкубируют при 37 °C в течение 15 мин.

*Раствор сравнения.* Лиофилизируют пробу СО фоллитропина для пептидного картирования и анализа гликанов, содержащего 500 мкг фоллитропина. Растворяют в 60 мкл 0,05 М раствора фосфатного буфера pH 7,5 и выполняют те же действия, что и для испытуемого раствора.

**Селективное высвобождение гликанов**

*Испытуемый раствор.* К испытуемому раствору, полученному на предыдущем этапе, добавляют 0,75 мкл октилфенилполиэтиленгликоля и перемешивают, используя вихревую мешалку. Добавляют 25 мЕ пептид-N-гликозидазы, перемешивают, используя вихревую мешалку, и центрифугируют. Инкубируют при 37 °C в течение 24 часов, извлекая белковую фракцию, добавляя 600 мкл этанола, предварительно охлажденного при – 20 °C в течение 45 мин. Перемешивают, используя вихревую мешалку, и центрифугируют. Осаждают белки при – 20 °C в течение 15 мин., затем центрифугируют при 10 600 при 4 °C в течение 5 мин. Переносят надосадочную жидкость в отдельную пробирку и выпаривают этанол в течение 15 мин. Добавляют 1 мл воды не содержащей инородных частиц и продолжают выпаривать до достижения объема 500-800 мкл, затем лиофилизируют.

Отщепленные гликаны, содержащиеся в образце метят 2-аминобензамидом. Образец восстанавливают в 1,5 мл не содержащей инородных частиц воды.

*Раствор сравнения.* Готовят одновременно таким же образом, что и испытуемые растворы, но с использованием раствора сравнения на предыдущем этапе.

**Хроматографическое разделение.** Выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

*Подвижная фаза А (ПФА)* Ацетонитрил.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)* 0,5 М буферного раствора ацетата аммония pH 4,5; фильтруют через мембранный фильтр (номинальный размер пор 0,22 мкм)

*Подвижная фаза С (ПФС)* не содержащая инородных частиц вода

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 750 × 7,5 мм, слабая анионообменная смола, 10 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Скорость потока | 0,4 мл/мин; |
| Детектор | флуориметрический при длине волны возбуждения 330 нм и эмиссии 420 нм |
| Объём пробы | 50 мкл. |

 *Режим хроматографирования*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % | ПФС, % |
| 0 - 7 | 20 | 0 | 80 |
| 7 - 77 | 20 | 0 → 4 | 80 → 76 |
| 77 - 82 | 20 | 4 → 25 | 76 → 55 |
| 82 - 87 | 20 | 25 → 50 | 55 → 30 |
| 87 - 92 | 20 | 50 | 30 |
| 92 - 107 | 20 | 50 → 0 | 30 → 80 |

Пригодность системы: раствор сравнения:

– полученная хроматограмма совпадает с хроматограммой СО фоллитропина для пептидного картирования и анализа гликанов;

– – при сравнении с хроматограммой СО фоллитропина для пептидного картирования и анализа гликанов идентифицируют пики, соответствующие выходу нейтральных, моно-, ди-, три- и тетрасиалилированных форм; определяют площадь каждого пика и выражают ее в виде процента от общей площади; рассчитывают показатель Z, используя следующую формулу:

Z=(А0$×$0)+(А1$×$1)+(А2$×$2)+(А3$×$3)+(А4$×$4)

A0= процент площади пика, соответствующего нейтральной форме;

A1= процент площади пика, соответствующего моносиалилированной форме;

A2= процент площади пика, соответствующего дисиалилированной форме;

A3= процент площади пика, соответствующего трисиалилированной форме;

A4= процент площади пика, соответствующего тетрасиалилированной форме.

Z-показатель для раствора сравнения лежит в диапазоне 177-233.

**Метод Б. Денатурация белка**

*Раствор А.* К 1,952 г 2-[N-морфолино] этансульфоновой кислоты и 57,32 г гуанидингидрохлорида прибавляют 1 мл раствора 15,4 г/л дитиотреитола , 10 мл раствора 18,61 г/л эдетата натрия и 20 мл воды для хроматографии . Для растворения компонентов выдерживают в водяной бане при температуре около 37 °С в течение 1 мин. Доводят pH до 8.1 с помощью раствора гидроксида натрия 2 М и доводят объем до 100 мл водой для хроматографии, перемешивают.

*Раствор Б.* 37 мг иодоацетамида растворяют в 1 мл воды для хроматографии и перемешивают. Хранят в защищенном от света месте.

*Раствор В.* 26,7 г динатрия гидрофосфата дигидрата и 11,2 г эдетата натрия растворяют в 3000 мл воды для хроматографии и перемешивают. Доводят pH до 7.5 с помощью раствора гидроксида натрия 1 М.

*Испытуемый раствор.* К объему исследуемого препарата, содержащего 1 мг фоллитропина, прибавляют 0,2 мл раствора A и при температуре 37 ± 1 °C в течение 2 часов. Прибавляют 20 мкл свежеприготовленного раствора B, перемешивают и инкубируют при 37 ± 1 °C в течение еще 2 ч в защищенном от света месте. Прибавляют 10 мкл 2-меркаптоэтанола и перемешивают. Диализируют против 1000 мл раствора С. Прибавляют 200 мкл раствора С и перемешивают.

*Раствор сравнения (1).* К объему СО фоллитропина для анализа гликанов, который содержит 1 мг фоллитропина, прибавляют 0,2 мл раствора А. Инкубируют в водяной бане при температуре 37 ± 1 °C в течение 2 часов. Продолжают как в случае испытуемого раствора.

*Раствор сравнения (2)* Готовят одновременно таким же образом, что и испытуемые растворы, но используя фетуин вместо исследуемого препарата.

**Селективное высвобождение гликанов**

Испытуемый раствор, полученный ранее, разбавляют раствором В*,* чтобы получить концентрацию 1,1 г/л. К 500 мкг раствора прибавляют 1 мЕ пептидной N-гликозидазы, перемешивают и инкубируют при 37 ± 1 °C в течение 24 часов. Охлаждают раствор при помощи льда. Осаждают белок и соли тремя объёмами холодного этанола и выдерживают во льду в течение 10 мин. Центрифугируют при 16 000 g в течение около 5 мин и переносят надосадочную жидкость в отдельную пробирку. Прибавляют 3 мкл 1 мкг/мкл раствора мальтотриозы, после чего лиофилизуруют. Растворяют в 100 мкл воды для хроматографии.

*Раствор сравнения (1).* Готовят одновременно таким же образом, что и испытуемые растворы, но с использованием раствора сравнения, полученного с СО фоллитропина для анализа гликанов на предыдущем этапе.

*Раствор сравнения (2).* Готовят одновременно таким же образом, что и испытуемые растворы, но с использованием раствора сравнения, полученного с фетуином на предыдущем этапе.

**Хроматографическое разделение*.*** *Выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)*

*Подвижная фаза А (ПФА):* 20 г/л раствора гидроксида натрия

*Подвижная фаза Б (ПФБ):* вода для хроматографии

*Подвижная фаза C (ПФС):* 41 г безводного натрия ацетата растворяют в 800 мл воды для хроматографии, разбавляют объем до 1000 мл тем же растворителем, перемешивают. Пропускают через мембранный фильтр номинальным размером пор 0,45 мкм; хранится в среде гелия.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | 5 × 4,0 мм, сильноосновный анионит для хроматографии  |
| Колонка | 250 × 4,0 мм, сильноосновный анионит для хроматографии |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | импульсный амперометрический детектор или его аналог с золотым индикаторным электродом, электродом сравнения серебро/хлорид серебра и вспомогательным электродом из нержавеющей стали, который является корпусом ячейки, удерживаемый соответственно при потенциалах обнаружения +0,05 В, окисления +0,75 В и восстановления -0,80 В с длительностью импульса в зависимости от используемого оборудования |
| Объём пробы | 45 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % | ПФС, % |
| 0 - 0.2 | 20 | 80 | 0 |
| 0.2 - 94.0 | 20 | 80 → 34 | 0 → 46 |
| 94.0 - 97.0 | 20 | 34 | 46 |
| 97.0 - 97.1 | 20 | 34 → 80 | 46 → 0 |
| 97.1 - 115.0 | 20 | 80 | 0 |

Пригодность хроматографической системы:

* хроматограмма, полученная с использованием раствора сравнения (2), соответствует хроматограмме фетуина, представленной с СО фоллитропина для пептидного картирования и анализа гликанов.
* хроматограммы, полученные с использованием испытуемого раствора и раствора сравнения (2), соответствуют хроматограмме, представленной с СО фоллитропина для пептидного картирования и анализа гликанов.

путем сравнения с хроматограммой, представленной с СО фоллитропина для пептидного картирования и анализа гликанов, идентифицируют пики, обусловленные нейтральными, моно-, ди-, три- и тетрасиалилированными формами на хроматограмме, полученной с использованием раствора сравнения (2).

Определяют площадь каждого пика и выражают его в процентах от общего количества. Вычисляют число Z по следующей формуле:

Z=(А0$×$0)+(А1$×$1)+(А2$×$2)+(А3$×$3)+(А4$×$4)

A0= процент площади пика, соответствующего нейтральной форме;

A1= процент площади пика, соответствующего моносиалилированной форме;

A2= процент площади пика, соответствующего дисиалилированной форме;

A3= процент площади пика, соответствующего трисиалилированной форме;

A4= процент площади пика, соответствующего тетрасиалилированной форме.

Z-показатель для раствора сравнения лежит в диапазоне 178-274.

**Прозрачность.** Должен выдерживать сравнение с эталоном II. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Должен выдерживать сравнение с эталоном Y5. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН.** От 6,5 до 7,5. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

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

**Бактериальные эндотоксины.** Менее 0,1 МЕ. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Чистота. Родственные соединения и посторонние примеси**

*Содержание олигомеров.* Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с ОФС «Эксклюзионная хроматография»**.**

Применяют процедуру нормализации.

*Раствор А.* 118 мг дигидрофосфата натрия, 1,65 г динатрия гидрофосфата дигидрата и 30,0 г сахарозы, растворяют в 40 мл воды для хроматографии и доводят объем до 100,0 мл тем же растворителем.

*Раствор Б.* 2,0 мг бычьего альбумина растворяют в 30 мл раствора A.

*Испытуемый раствор.* Исследуемую субстанцию разбавляют раствором А до концентрации 0,25 мг/мл.

*Раствор сравнения.* Содержимое флакона с СО фоллитропина растворяют в растворе А до концентрации 0,5 мг/мл, и смешивают равные объёмы этого раствора и раствора B до получение концентрации 0,25 мг/мл.

*Подвижная фаза.* 28,4 г безводного сульфата натрия растворяют в 2000 мл 0,1 М фосфатно-буферного раствора с pH 6,7 и пропускают через мембранный фильтр номинальным размером пор 0,45 мкм.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 × 7,8 мм, гидрофильный силикагель для хроматографии 5 мкм. |
| Температура колонки | 25°С; |
| Скорость потока | 0,5 мл/мин |
| Детектор | спектрофотометрический, 215 нм. |
| Объём пробы | 100 мкл. |

*Относительное время удерживания*: фоллитропин 14-16 мин.

Пригодность хроматографической системы: раствор сравнения:

 разрешение: не менее 1,2 между пиками бычьего альбумина и фоллитропина;

 в холостых пробах между 5 и 16 минутами пик не обнаружен.

Предел: сумма пиков со временем удерживания меньше, чем у основного пика, не более чем на 0.5%.

*Свободные субъединицы.* Не более 3 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

Электрофорез в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях.

*Толщина геля:* 1,5 мм.

*Разделяющий гель:* 12 % акриламида.

*Буфер для образца.* Буферный рабочий раствор для электрофореза в системе натрия лаурилсульфат-полиакриламидный гель.

*Испытуемый раствор.* Исследуемую субстанцию разводят водой до концентрации 2 мкг/мкл. К 55 мкл раствора прибавляют 55 мкл буфера для образца. Выдерживают при комнатной температуре в течение 4 часа.

*Раствор сравнения (А).* Растворяют содержимое флакона с СО фоллитропина в воде до концентрации 2 мкг/мкл. К 25 мкл раствора прибавляют 25 мкл буфера для образца. К 40 мкл этого раствора прибавляют 180 мкл буфера для образца и 180 мкл воды. Дают отстояться в течение 4 ч при комнатной температуре, затем кипятят в течение 5 мин.

*Раствор сравнения (Б).* Раствор соответствующих маркеров молекулярной массы, пригодный для калибровки полиакриламидных гелей в присутствии натрия лаурилсульфата в диапазоне 14,4 - 94 кДа.

Нанесение:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ячейка** | **Раствор** | **Объём (мкл)** |
| 1 | Раствор сравнения (А) | 40 |
| 2 | Раствор сравнения (А) | 30 |
| 3 | Раствор сравнения (А) | 20 |
| 4 | Раствор сравнения (А) | 15 |
| 5 | Раствор сравнения (А) | 10 |
| 6 | Раствор сравнения (А) | 5 |
| 7 | Испытуемый раствор | 50 |
| 8 | Испытуемый раствор + Раствор сравнения (А) | 50 + 25 |
| 9 | Раствор сравнения (Б) | 10 |

Детектирование: окрашивание Кумасси бриллиантовым.

Пригодность хроматографической системы:

* испытуемый раствор + раствор сравнения (а): полосы, соответствующие гетеродимеру фоллитропина и субъединицам, четко разделены;
* раствор сравнения (а): полос, соответствующих гетеродимеру фоллитропина, не наблюдается.

*Окисленный фоллитропин.* Не более 6 % Определение проводят методом методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

*Подвижная фаза А (ПФА)* 0,2 М фосфатный буферный раствор рН 2,5

*Подвижная фаза Б (ПФБ)* вода для хроматографии, ацетонитрил (40:60)

*Подвижная фаза С (ПФС)* вода для хроматографии

*Раствор (А).* 3,3 мг 2,4-дихлорбензойной кислоты растворяют в 10,0 мл этанола (96 %)

*Испытуемый раствор*. Исследуемый препарат разводят водой для хроматографии до концентрации 300 мкг/мкл.

*Раствор сравнения (А).* Растворяют содержимое флакона с СО фоллитропина в воде для хроматографии до концентрации 300 мкг/мкл.

*Раствор сравнения (Б).* Разбавляют 0,1 мл концентрированного раствора перекиси водорода до 30 мл водой для хроматографии. Растворяют содержимое флакона с СО фоллитропина в этом растворе до получения концентрации 300 мкг/мл. Инкубируют в течение 30-45 мин. Прибавляют раствор А в 2,4-дихлорбензойную кислоту до получения концентрации около 17 мкг/мл в общем объеме и сразу же вводят в хроматографическую колонку.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель для хроматографии с бутилсилилом концевой группы, 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 210 нм. |
| Объём пробы | 25 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время (мин) | ПФА, % | ПФБ, % | ПФС, % |
| 0 - 8.4 | 50 | 25 → 39 | 25 → 11 |
| 8.4 - 8.5 | 50 | 39 → 45 | 11 → 5 |
| 8.5 - 15 | 50 | 45 | 5 |
| 15 - 15.1 | 50 | 45 → 25 | 5 → 25 |
| 15.1 - 25 | 50 | 25 | 25 |

Пригодность хроматографической системы:

* пики окисленных α- и β-субъединиц фоллитропина отделены от пиков неокисленных субъединиц фоллитропина и от пика 2,4-дихлорбензойной кислоты;
* полученная хроматограмма соответствует хроматограмме СО фоллитропина.

Вычисляют процент окисленных субъединиц фоллитропина по формуле:

$$\frac{\left(А2+А4\right)×100}{А1+А2+А3+А4}$$

A1 = площадь пика α-субъединицы фоллитропина;

A2 = площадь пика окисленной α-субъединицы фоллитропина;

A3 = площадь пика β-субъединицы фоллитропина;

A4 = площадь пика окисленной β-субъединицы фоллитропина.

**Количественное определение**

***Фоллитропин альфа*** Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с ОФС «Эксклюзионная хроматография»**.**

*Подвижная фаза* смешивают 6,74 мл фосфорной кислоты, 14,2 г безводного сульфата натрия и 900 мл воды для хроматографии, доводят pH до 6,7 с помощью 0,5 г/мл раствора гидроксида натрия и разбавляют до 1000 мл водой для хроматографии; пропускают через мембранный фильтр номинальным размером пор 0,45 мкм.

*Раствор А.* Растворяют 100 мг полоксамера 188 в 900 мл воды для хроматографии и разбавляют до 1000 мл тем же растворителем.

*Испытуемый раствор.* Разбавляют исследуемый препарат раствором А до получения концентрации около 0,03 мг/мл.

*Раствор сравнения.* Растворяют содержимое флакона СО фоллитропина в растворе А до получения концентрации около 0,03 мг/мл.

*Хроматографические условия:*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300x7,8, гидрофильный силикагель для хроматографии 5мкм |
| Режим элюирования/время | Изократический/60 мин |
| Скорость потока | 1 мл/мин. |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм. |
| Объем вводимой пробы стандартного раствора  | 100 мкл. |
| Объем вводимой пробы испытуемого образца | 20 мкл |

Пригодность хроматографической системы: раствор сравнения:

число теоретических тарелок: не менее 1300;

 рассчитывается для пика фоллитропина.

вычисляют содержание фоллитропина с учетом заданного содержания СО фоллитропина.

**Определение остаточных белков клетки-хозяина.** Не более 20 нг/мг основного вещества. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение остаточных белков клетки-хозяина».

**Остаточная ДНК.** Не более 120 фг/мкг основного вещества. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение остаточной ДНК».

**Биологическая активность.** Найденная активность должна быть не менее 80 % и не более 125 % от заявленной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Биологические испытания гонадотропинов»

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксична. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

**Хранение.** При температуре ниже минус 35°С в защищенном от света месте. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств»