МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для медицинского применения

ЛП-003584

(номер регистрационного удостоверения лекарственного препарата)

Наименование держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия Dr. Reddy's Laboratories Ltd.
Адрес местонахождения держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	8-2-337, Road № 3, Banjara Hills, Hyderabad, Telangana - 500034, India
Дата государственной регистрации лекарственного препарата	**25.04.2016**
Срок действия регистрационного удостоверения лекарственного препарата	31.12.2025
Дата внесения изменений в регистрационное удостоверение лекарственного препарата (дата замены регистрационного удостоверения лекарственного препарата)	10.05.2023
Информация о зарегистрированном лекарственном препарате:	
Торговое наименование	**Реддитукс®**
Международное непатентованное, или группировочное, или химическое наименование	Ритуксимаб
Лекарственная форма	концентрат для приготовления раствора для инфузий
Дозировка	10 мг/мл
Качественный состав и количественный состав действующих веществ и качественный состав вспомогательных веществ	
ритуксимаб 10.00 мг, вспомогательные вещества (натрия цитрата дигидрат, натрия хлорид, полисорбат 80, вода для инъекций)	
Форма выпуска (лекарственная форма, дозировка, первичная упаковка, количество лекарственной формы в первичной упаковке, количество первичной упаковки в потребительской упаковке, комплектность)	концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл (флакон) 10/50 мл x 1 (пачка картонная) Упаковка "in bulk": концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл (флакон) 10 мл x 63 (коробка картонная) концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл (флакон) 50 мл x 30 (коробка картонная)
Реквизиты нормативной документации	ЛП-003584-100523

048061

АО «ОПЦИОН», Москва, 2022 г., «Бл. ГЗ № 876»

Производственные площадки, участвующие в процессе производства лекарственного препарата, с указанием стадий производства, названий и фактических адресов местонахождения	
Производитель (Все стадии производства)	Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия / Dr. Reddy's Laboratories Ltd., India
Survey No. 47, Bachupally Village, Bachupally Mandal, Medchal-Malkajgiri District, Telangana - 500 090, India	
Производитель (Все стадии производства)	Акционерное общество "Р-Фарм" (АО "Р-Фарм"), Россия
Ярославская обл., г.о. г. Ярославль, г. Ярославль, ул. Громова, д. 15	

Заместитель Министра (подпись) **О.О. Салагай**

М.П.

ЛП-003584 от 10.05.2023

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № ЛП-003584

Дата регистрации «25» апреля 2016 г.

Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.,
8-2-337, Роад № 3, Банжара Хиллс, Хайдерабад, Телангана-500034, Индия

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

(номер)

Реддитукс®

(торговое наименование лекарственного препарата)

Ритуксимаб

(международное непатентованное или химическое наименование)

концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл

(лекарственная форма, дозировка)

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия
АО «Р-Фарм», Россия

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)
Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия
АО «Р-Фарм», Россия

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)
Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия
АО «Р-Фарм», Россия

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА
Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия
АО «Р-Фарм», Россия

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Реддитукс®,

концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл

«Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный	Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или слегка желтоватая жидкость.
Подлинность Ритуксимаб	Пептидное картирование (Обращенно-фазовая ВЭЖХ)	Хроматографический профиль испытуемого раствора должен соответствовать профилю раствора стандартного образца ритуксимаба по временам удерживания и относительной интенсивности пиков пептидных фрагментов (характерные пики). Времена удерживания пиков HC23, LC5 и HC5 на хроматограмме испытуемого раствора должны отличаться от времен удерживания соответствующих пиков на хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба не более, чем на 5 %, рассчитанных по хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба.
	Эксклюзионная ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба.
Прозрачность	ГФ РФ, Визуальный	Опалесценция раствора не должна превышать опалесценцию эталона III.
Цветность	ГФ РФ, Визуальный	Раствор должен быть окрашен не более интенсивно, чем эталон Y_5.
pH	ГФ РФ, Потенциометрический	От 6,30 до 6,70.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Показатель	Метод	Норма
Механические включения **Видимые частицы**	Eur. Ph., Визуальный	Видимые механические включения отсутствуют.
Невидимые частицы	USP, Счетно-фотометрический	Частицы размером ≥ 10 мкм: не более 6000 на флакон Частицы размером ≥ 25 мкм: не более 600 на флакон
Молекулярно-массовое распределение	Эксклюзионная ВЭЖХ	Мономер – не менее 92 %; Сумма агрегатов – не более 8 %.
Чистота	Электрофорез в полиакриламидном геле с Na-ДДС в восстанавливающих условиях	На электрофореграмме испытуемого раствора две основные полосы, соответствующие молекулярным массам 25 кДа и 50 кДа, должны иметь подвижность, сравнимую с соответствующими полосами на электрофореграмме раствора стандартного образца ритуксимаба. Суммарное содержание основных полос должно составлять не менее 95,0 %. Допускается наличие дополнительных минорных полос, суммарное содержание которых должно составлять не более 5,0 %.
Осмоляльность	ГФ РФ, Криоскопический	342 – 382 мОсмоль/кг.
Извлекаемый объем	ГФ РФ, Гравиметрический	Не менее номинального.
Бактериальные эндотоксины	ГФ РФ, Гель-тромб тест или хромогенный кинетический тест	Не более 0,5 ЕЭ/мг ритуксимаба.
Стерильность	ГФ РФ, Метод мембранной фильтрации	Должен быть стерильным.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Показатель	Метод	Норма
Аномальная токсичность	ГФ РФ, Биологический	Должен быть нетоксичным.
Специфическая активность	Комплемент-зависимый цитотоксический тест	$0,8 \times 10^5 – 1,3 \times 10^5$ ЕД/мл.
Количественное определение ритуксимаба	УФ-спектрофотометрия	9,0 – 11,0 мг/мл.
Количественное определение полисорбата 80	Обращенно-фазовая ВЭЖХ	0,049 – 0,091 %.
Упаковка	По 10 мл или 50 мл препарата во флаконы из бесцветного стекла класса 1 (USP), укупоренные резиновыми пробками, обжатые алюминиевыми колпачками с предохранительными пластиковыми крышечками. По 1 флакону вместе с инструкцией по применению в пачку картонную. В случае упаковки фирмой «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.» пачку картонную упаковывают в прозрачный пакет из полиэтилена низкой плотности. **Упаковка «in bulk»:** По 63 флакона с препаратом (по 10 мл) или по 30 флаконов с препаратом (по 50 мл) помещают в картонную коробку с картонными решетками. Картонные коробки упаковывают в прозрачные пакеты из полиэтилена низкой плотности и помещают в картонный короб. Картонные короба помещают в транспортную упаковку с хладоэлементами.	
Маркировка	В соответствии с НД.	
Транспортирование	При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать.	
Хранение	При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать.	
Срок годности	3 года.	

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

Реддитукс®,

концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл

«Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия

Состав препарата на 1 мл:

Наименование вещества	Количество, мг	НД*
Действующее вещество		
Ритуксимаб**	10,00	НД фирмы
Вспомогательные вещества		
Натрия цитрата дигидрат***	7,35	USP
Натрия хлорид	9,00	USP
Полисорбат 80	0,70	EP
Вода для инъекций	до 1 мл	USP

** - ссылки приведены на действующие издания Фармакопей.*

*** - продуцируется линией клеток яичника китайского хомяка (Chinese Hamster Ovary (CHO) cells).*

**** - в качестве pH-корректирующего агента используется лимонной кислоты моногидрат. Количество натрия цитрата дигидрата может быть скорректировано в зависимости от добавляемого количества лимонной кислоты моногидрата.*

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Действующее вещество. Ритуксимаб (НД фирмы).

Ритуксимаб представляет собой химерные моноклональные антитела мыши/человека, специфичные к трансмембранному антигену CD20. Продуцируется линией клеток яичника китайского хомяка (Chinese Hamster Ovary (CHO) cells). Содержание остаточного белка и остаточной ДНК продуцента контролируются фирмой в субстанции. Фирма гарантирует качество по данным показателям.

Структурная формула

Легкая цепь:

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSN
LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

Тяжелая цепь:

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWI
GAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
STYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

Эмпирическая формула. $C_{6416}H_{9874}N_{1688}O_{1987}S_{44}$

Молекулярная масса. 145 кДа

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Методы и нормы

Примечания

1. Стандартный образец ритуксимаба (НД фирмы) размораживают при температуре 2 – 8 °С.

2. Замороженный стандартный образец ритуксимаба хранят при температуре не выше минус 70 °С; после размораживания стандартный образец ритуксимаба хранят при температуре 2 – 8 °С: до вскрытия упаковки продолжительность хранения см. сертификат анализа стандартного образца ритуксимаба, и после вскрытия – 15 сут.

3. Объемы приготовленных растворов могут быть изменены по необходимости, для чего количества ингредиентов корректируют соответствующим образом.

4. Свежеприготовленные растворы стабильны в течение 24 ч.

Описание. Испытание проводят визуальным методом.

Норма. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или слегка желтоватая жидкость.

Подлинность

Метод 1. Испытание проводят методом пептидного картирования (обращенно-фазовая ВЭЖХ).

Норма. Хроматографический профиль испытуемого раствора должен соответствовать профилю раствора стандартного образца ритуксимаба по временам удерживания и относительной интенсивности пиков пептидных фрагментов (характерные пики). Времена удерживания пиков HC23, LC5 и HC5 на хроматограмме испытуемого раствора должны отличаться от времен удерживания соответствующих пиков на хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба не более, чем на 5 %, рассчитанных по хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба.

Реактивы:

Трипсин (Sequencing grade, Promega, кат. № V5111 или аналогичного качества)

Трис(гидроксиметил)аминометан (Molecular biology grade, Merck, кат. № 1.93315.0521 или аналогичного качества)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Хлористоводородная кислота концентрированная (Analytical grade, Merck кат. № 1.93401.2521 или аналогичного качества)

Гуанидина гидрохлорид (Molecular biology grade, Sigma-Aldrich, кат. № G3272 или аналогичного качества)

Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевой соли дигидрат (Analytical grade, Thermo Fisher Scientific (Qualigens), кат. № 12635 или аналогичного качества)

Реактив Бредфорда концентрированный (5x Protein Assay Dye Reagent (Bradford reagent)) (Bio-Rad, кат. № 500-0006 или аналогичный)

Дитиотреитол (для электрофореза, Molecular biology grade, Sigma-Aldrich, кат. № D9163 или аналогичного качества)

2-Йодацетамид (для синтеза, Molecular biology grade, Merck, кат. № 804744 или аналогичного качества)

Мочевина (для ВЭЖХ, Merck, кат. № 61772005001730 или аналогичного качества)

Гидроксиламина гидрохлорид (для ВЭЖХ, Qualigens, кат. № 12854 или аналогичного качества)

Трифторуксусная кислота (for protein sequence analysis, Molecular biology grade, Merck, кат. № 108178 или аналогичного качества)

Ацетонитрил (для ВЭЖХ, Merck, кат. № 61830025001730 или аналогичного качества)

Вода, прошедшая через систему высокой очистки Milli-Q Merck, или аналогичного качества

Материалы. Обессоливающие колонки PD-10 (GE Healthcare Life Sciences, кат. № 17-0851-01)

Стандартный образец. Стандартный образец ритуксимаба (НД фирмы), производитель «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия.

Денатурирующий буферный раствор pH 7,5 (8,2 М гуанидина гидрохлорид + 1 мМ ЭДТА в 0,1 М трис-буферном растворе pH 7,5). 15,6 г гуанидина гидрохлорида, 7,44 мг этилендиаминтетрауксусной кислоты

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

динатриевой соли дигидрата и 0,24 г трис(гидроксиметил)аминометана помещают в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл, прибавляют 8,5 мл воды и перемешивают на вортексе до полного растворения (около 20 мин). Доводят значение pH полученного раствора хлористоводородной кислотой концентрированной до 7,5 ± 0,1. Доводят объем полученного раствора водой до 20 мл и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

При образовании кристаллов раствор готовят заново.

0,5 М раствор дитиотреитола. 77 мг дитиотреитола помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 1000 мкл воды и перемешивают до растворения.

Раствор используют свежеприготовленным.

0,5 М раствор 2-йодацетамида. 92,5 мг 2-йодацетамида помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 1000 мкл воды и перемешивают до растворения. До использования хранят в темном месте.

Раствор используют свежеприготовленным.

Буферный раствор для гидролиза pH 7,5. 93 мг этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевой соли дигидрата помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 230 мл воды и перемешивают до растворения, прибавляют 3 г трис(гидроксиметил)аминометана, 15 г мочевины, 0,3475 г гидроксиламина гидрохлорида и перемешивают до растворения. Доводят значение pH раствора хлористоводородной кислотой концентрированной до 7,5 ± 0,2 и доводят объем полученного раствора водой до метки, перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор трипсина. 200 мкл восстанавливающего буферного раствора (поставляется вместе с трипсином) прибавляют в пробирку с трипсином (содержит 20 мкг трипсина) и перемешивают с помощью автоматической пипетки.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор трифторуксусной кислоты. 500 мкл трифторуксусной кислоты помещают с помощью стеклянной пипетки в мерный цилиндр вместимостью 10 мл, содержащий 2,5 мл воды, и доводят объем раствора водой до 5 мл, перемешивают.

50 мкл раствора переносят с помощью стеклянной пипетки в мерный цилиндр вместимостью 10 мл, содержащий 2,5 мл воды, и доводят объем раствора водой до 5 мл, перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор реактива Бредфорда (1х). К 1 мл реактива Бредфорда (5х) прибавляют 4 мл воды и перемешивают.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Подвижная фаза А (ПФ А) (0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде). 900 мл воды помещают в мерный цилиндр вместимостью 1 л, прибавляют с помощью стеклянной пипетки 1,0 мл трифторуксусной кислоты, доводят объем раствора водой до 1 л, перемешивают. Переносят раствор в колбу из дюранового стекла вместимостью 1 л и дегазируют в ультразвуковой водяной бане в течение 10 мин.

Срок годности подвижной фазы А 7 сут при хранении при комнатной температуре.

Подвижная фаза В (ПФ В) (0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле). 900 мл ацетонитрила помещают в мерный цилиндр вместимостью 1 л, прибавляют с помощью стеклянной пипетки 1,0 мл трифторуксусной кислоты, доводят объем раствора ацетонитрилом до 1 л, перемешивают. Переносят раствор в колбу из дюранового стекла вместимостью 1 л и дегазируют в ультразвуковой водяной бане в течение 10 мин.

Срок годности подвижной фазы В 7 сут при хранении при комнатной температуре.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Испытуемый раствор. *X* мкл препарата помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют (1000 – *X*) мкл денатурирующего буферного раствора.

Примечание. Объем препарата (*X*, мкл), необходимый для приготовления раствора, вычисляют по формуле: $\frac{1000}{C}$, где *C* – концентрация препарата, в мг/мл (полученная по результатам количественного определения ритуксимаба или из данных сертификата анализа препарата «Реддитукс®»).

Восстановление и алкилирование образца. Прибавляют к полученному раствору 10 мкл 0,5 М раствора дитиотреитола и инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 30 мин. Охлаждают раствор до комнатной температуры, прибавляют 13 мкл 0,5 М раствора 2-йодацетамида и инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 40 мин.

Замена буфера. Обессоливающую колонку PD-10 промывают 30 мл воды и уравновешивают 30 мл буферного раствора для гидролиза. Наносят на колонку весь объем раствора восстановленного и алкилированного образца, элюат отбрасывают. Последовательно наносят на колонку по 1 мл буферного раствора для гидролиза 6 раз, собирают по 1 мл элюата в 6 разных микроцентрифужных пробирки вместимостью 1,5 мл (фракции 1, 2, 3, 4, 5 и 6).

Определение фракции, содержащей белок. Определение белка во фракциях возможно двумя альтернативными способами:

1. Измеряют оптическую плотность фракций 1 – 6 на УФ-спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 280 нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм или на УФ-Виз спектрофотометре с переменной длиной оптического пути в кварцевой микрокювете или пластиковой миникювете. Использование раствора сравнения не требуется.

2. Определяют фракцию, содержащую белок, по высокой оптической плотности. В лунки 96-луночного планшета прибавляют по 10 мкл каждой фракции и 200 мкл раствора реактива Бредфорда (1х). Раствор в лунке

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

с максимальной интенсивностью окрашивания содержит наибольшее количество белка.

Примечание. При наличии белка в более чем одной фракции, для дальнейшего анализа выбирают фракцию с наиболее высокой оптической плотностью (способ 1) или с максимальной интенсивностью окрашивания (способ 2).

Гидролиз. 500 мкл фракции, содержащей белок, помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 100 мкл раствора трипсина и инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в течение (17 ± 2) ч. После инкубирования прибавляют 4,8 мкл раствора трифторуксусной кислоты, центрифугируют при 10000 об/мин в течение 5 мин и используют супернатант для анализа.

Срок годности раствора 2 сут при температуре хранения 2 – 8 °С.

Раствор стандартного образца ритуксимаба. Y мкл стандартного образца ритуксимаба помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют $(1000 - Y)$ мкл денатурирующего буферного раствора.

Примечание. Объем стандартного образца ритуксимаба (Y, мкл), необходимый для приготовления раствора, вычисляют по формуле: $\frac{1000}{C_0}$, где C_0 – концентрация стандартного образца ритуксимаба, в мг/мл (см. сертификат анализа стандартного образца ритуксимаба).

Восстановление и алкилирование образца. Прибавляют к полученному раствору 10 мкл 0,5 М раствора дитиотреитола и инкубируют при температуре (37 ± 2) °С в течение 30 мин. Охлаждают раствор до комнатной температуры, прибавляют 13 мкл 0,5 М раствора 2-йодацетамида и инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 40 мин.

Последующие этапы («Замена буфера», «Определение фракции, содержащей белок» и «Гидролиз») проводят по методике приготовления испытуемого раствора. Используют новую PD-10 колонку.

Срок годности раствора 2 сут при температуре хранения 2 – 8 °С.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Примечание. При необходимости изменения объема испытуемого раствора или раствора стандартного образца ритуксимаба, объем фракции, отбираемой для анализа, и объем раствора трипсина корректируют с сохранением пропорций.

Хроматографические условия

Прибор	Waters HPLC system или аналогичный, оборудованный PDA-детектором
Колонка	250 мм × 4,6 мм, 5 мкм, 130 Å, XBridge BEH C18 (Waters, кат. № 186003117) или аналогичная
ПФ	A. 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде B. 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле
Температура колонки	(58 ± 2) °C
Температура образца	(5 ± 3) °C
Детектор	PDA, 214 нм
Объем пробы	100 мкл
Время хроматографирования	180 мин

Программы хроматографирования

Инициализация новой колонки

Время (мин)	Ацетонитрил (%)	ПФ А (%)	ПФ В (%)	Скорость потока (мл/мин)
0	100	0	0	0,1
5	100	0	0	1,0
5,01 – 65	0	0	100	0,8
65,01 – 245	0	100	0	0,8

Уравновешивание колонки

Время (мин)	ПФ А (%)	ПФ В (%)	Скорость потока (мл/мин)
0	0	100	0,8
60	0	100	0,8
60,01 – 240	100	0	0,8

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Анализ

Время (мин)	ПФ А (%)	ПФ В (%)	Скорость потока (мл/мин)
0	100	0	0,5
10	100	0	0,5
120	55	45	0,5
125	0	100	0,8
160	0	100	0,8
165	100	0	0,5
180	100	0	0,5

Градиентная программа для анализа:

0 – 10 мин – изократический режим
10 – 120 мин – градиентный режим
120 – 125 мин – градиентный режим
125 – 160 мин – изократический режим
160 – 165 мин – градиентный режим
165 – 180 мин – изократический режим

Очистка и хранение колонки*

Время (мин)	ПФ А (%)	ПФ В (%)	Скорость потока (мл/мин)
0 – 30	0	100	0,8

*100 % ацетонитрил также может быть использован для очистки и хранения колонки при тех же условиях.

Проводят прайминг всех каналов соответствующими растворами.

При использовании новой колонки проводят ее инициализацию в соответствии с программой хроматографирования.

Уравновешивают колонку в соответствии с программой хроматографирования.

В хроматограф вводят 100 мкл воды. Если базовая линия не стабильна, процедуру повторяют до ее стабилизации.

В хроматограф вводят 100 мкл раствора стандартного образца ритуксимаба и проводят визуальное сопоставление полученного профиля пиков с профилем пиков на рисунках 1 – 2 (кондиционирование колонки).

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Примечание. При использовании новой колонки раствор стандартного образца ритуксимаба вводят 2 раза для достижения устойчивого профиля пиков. При необходимости процедуру повторяют.

В хроматограф вводят 2 раза по 100 мкл раствора стандартного образца ритуксимаба. Регистрируют хроматограммы, определяют времена удерживания и относительные площади пиков.

Примечание. Относительную площадь индивидуального пика в процентах (X_0) на хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба вычисляют с помощью хроматографического программного обеспечения по формуле:

$$X_0 = \frac{S_0}{\sum S_s} \times 100,$$

где: S_0 – площадь индивидуального пика на хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба;

$\Sigma\ S_s$ – сумма площадей всех характерных пиков ритуксимаба на хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба.

Идентификация и интегрирование пиков.

На хроматограммах раствора стандартного образца ритуксимаба обнаруживаются множественные пики, элюирующие как раздельно, так и совместно. На хроматограммах размечаются и интегрируются только пики идентифицированных фрагментов, указанные в таблице 2. Для разных пиков, в зависимости от их профиля, выбирают наиболее подходящий способ интегрирования: по базовой линии от начала к концу пика, от «долины» к «долине», методом опускания перпендикуляра к базовой линии от точки соприкосновения пиков. Времена удерживания округляют до десятых.

Идентифицируют 3 референсных пика: HC23, LC5 и HC5 по следующим критериям:

HC23 – двойной пик с временем удерживания около 37 мин, один из сдвоенных пиков интенсивнее другого (см. рис. 5);

LC5 – пик с временем удерживания около 70 мин, является пиком с наибольшей интенсивностью по сравнению с соседними пиками (см. рис. 6);

HC5 – пик с временем удерживания около 83 мин, является пиком с наибольшей интенсивностью из двух близко расположенных пиков

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

(см. рис. 7).

Характеристику референсных пиков см. таблицу 1.

Таблица 1. Характеристика референсных пиков ритуксимаба.

Пептид	Значимость/ функция	Положение в белковой цепи	Последовательность аминокислот в пептиде	Время удерж. (мин)
HC23	Связывание с FCgR	297 – 305	EEQYN STYR	Около 37
LC5	CDR (определяющая комплементар-ность область)	77 – 102	VEAED AATYY CQQWT SNPPT FGGGT K	Около 70
HC5	CDR (определяющая комплементар-ность область)	44 – 63	GLEWI GAIYP GNGDT SYNQK	Около 83

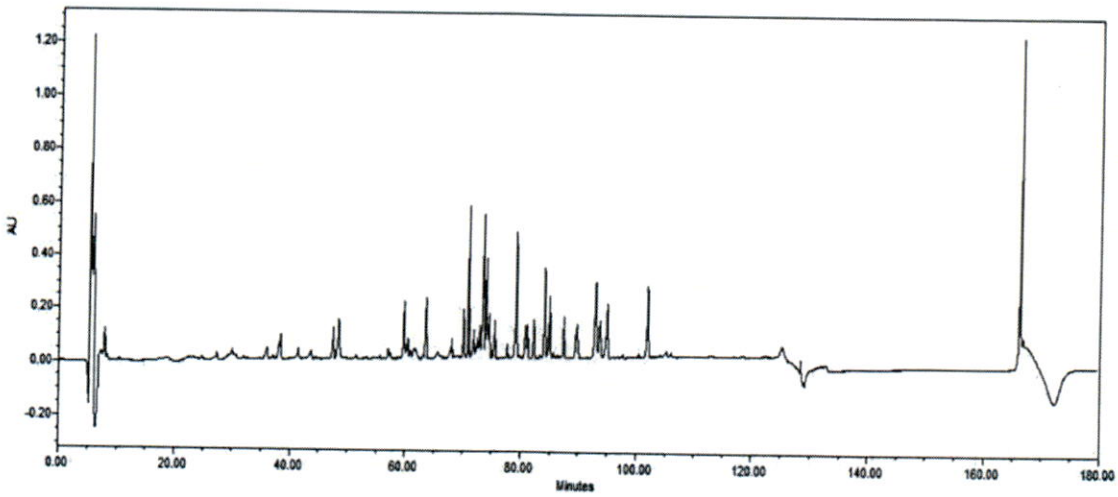

Рис. 1. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба (в масштабе полной шкалы)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

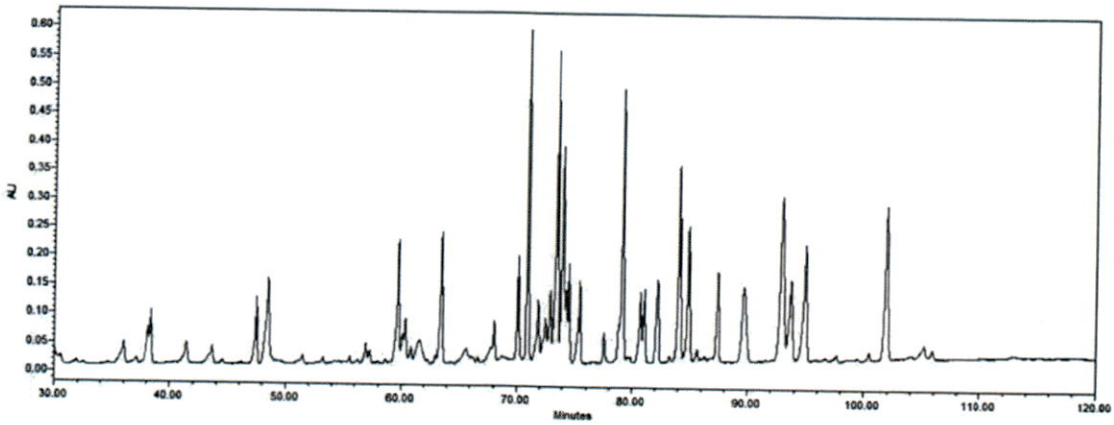

Рис. 2. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба 30 – 120 мин (в увеличенном масштабе)

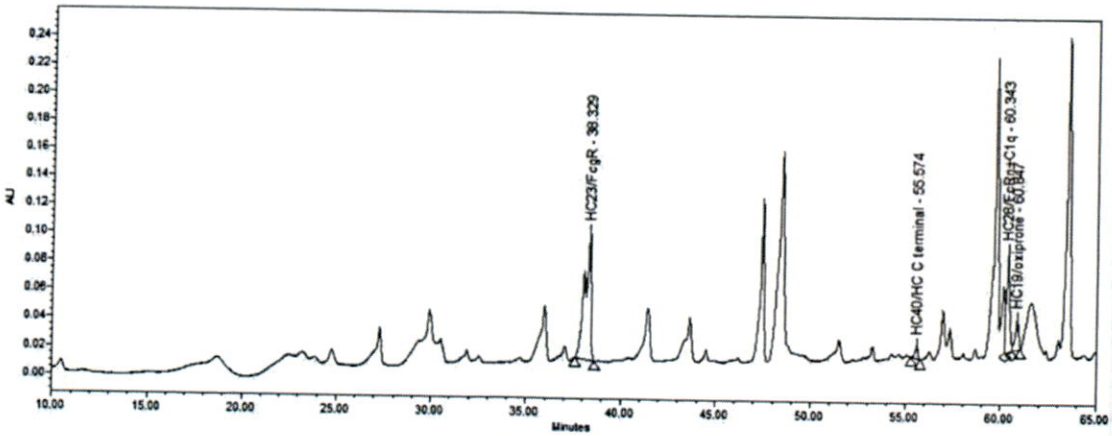

Рис. 3. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба (в увеличенном масштабе) с указанием характерных пиков, включая референсные, и разметки при их интегрировании (10 – 65 мин)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

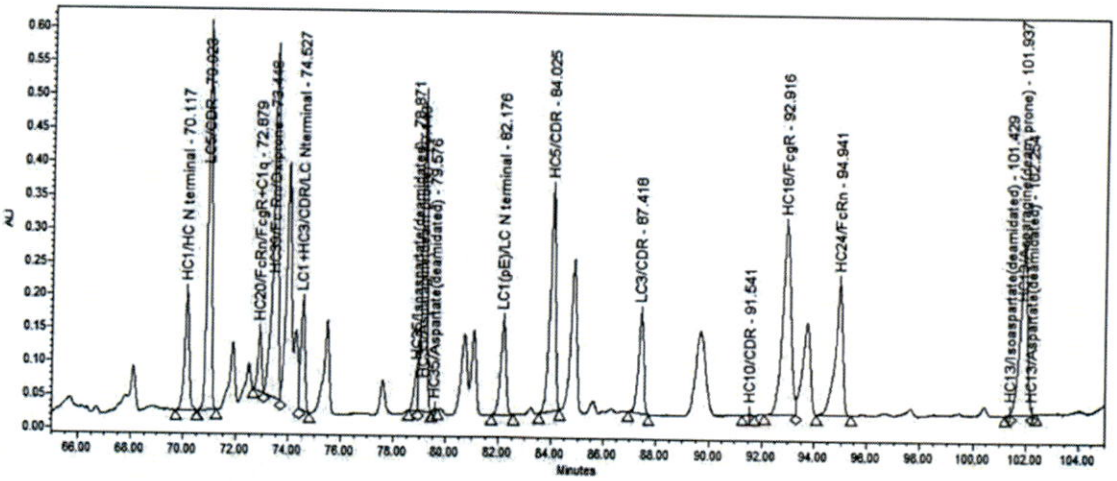

Рис. 4. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба (в увеличенном масштабе) с указанием характерных пиков, включая референсные, и разметки при их интегрировании (65 – 105 мин)

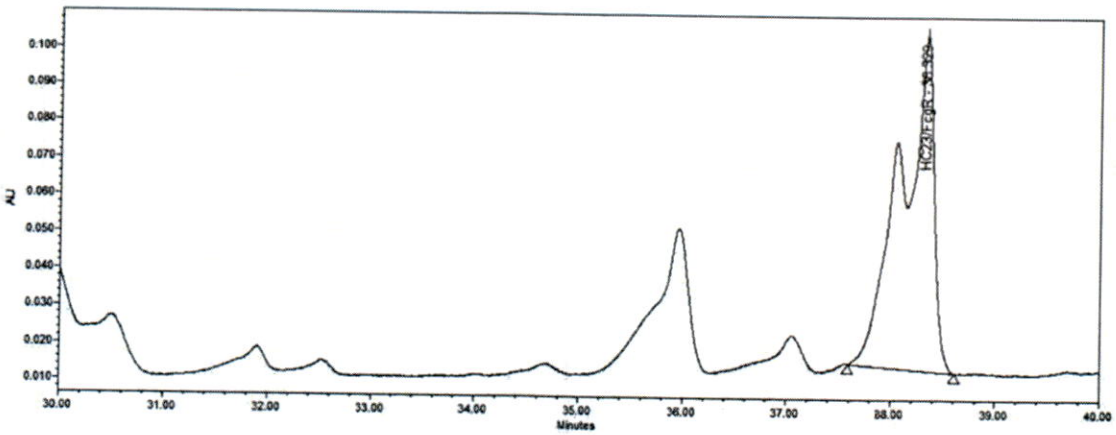

Рис. 5. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба с разметкой при интегрировании референсного пика HC23 (в увеличенном масштабе)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

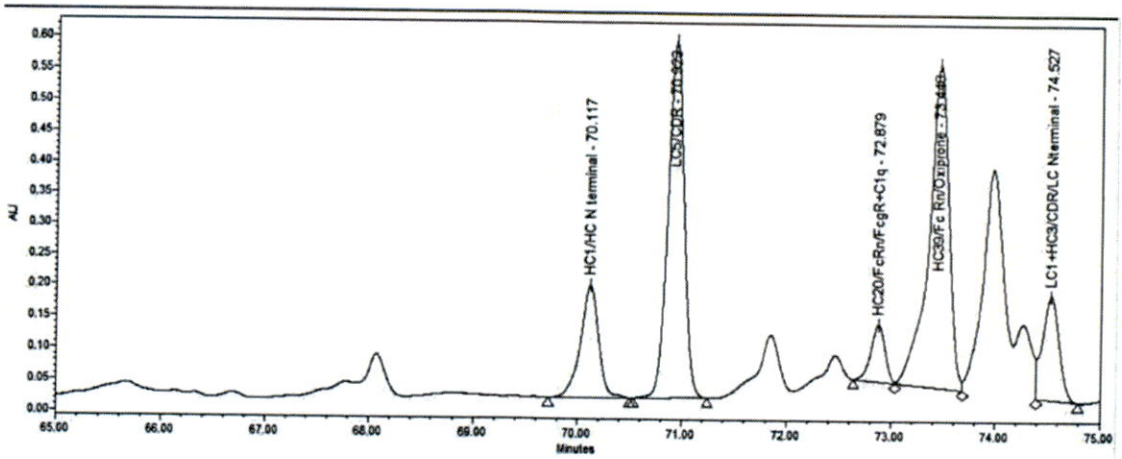

Рис. 6. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба с разметкой при интегрировании референсного пика LC5 (в увеличенном масштабе)

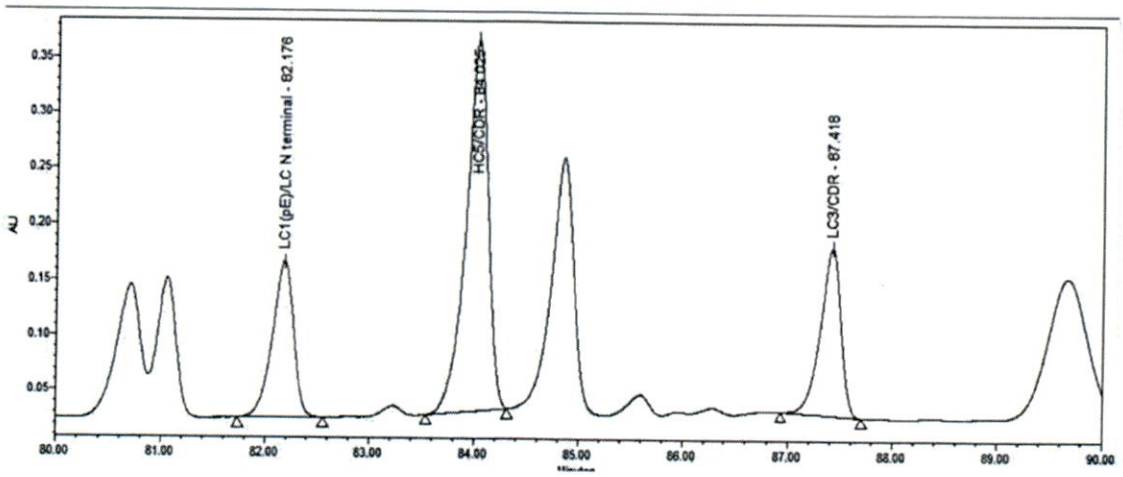

Рис. 7. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба с разметкой при интегрировании референсного пика HC5 (в увеличенном масштабе)

Другие характерные пики ритуксимаба (см. рис. 3, 4) идентифицируют, используя их относительное время удерживания по пику LC5 или HC5 (см. таблицу 2).

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Таблица 2. Характерные пики ритуксимаба.

Характерные пептиды	Значимость/ функция	Положение в белковой цепи	Последовательность аминокислот в пептиде	Относительное время удерживания по пику LC5	Относительное время удерживания по пику HC5
1	2	3	4	5	6
HC23	HC23 / связывание с FCgR	297 – 305	EEQYN STYR	–	–
HC40	HC40 / С-концевая последовательность тяжелой цепи	444 – 451	SLSLSPGK	0,80 ± 0,02	–
HC28	HC28 / связывание с FcRn и C1q/[1]	331 – 338	ALPAPIEK	0,85 ± 0,02	–
HC19	HC19 / Последовательность, подверженная окислению, связывание с FCgR/[1]	253 – 259	DTLMISR	0,85 ± 0,02	–
HC1 (pE)	HC1 / N-концевая последовательность тяжелой цепи	1 – 19	pEVQLQQPGAE LVKPGASVK	0,99 ± 0,02	–
LC5	LC5 / CDR (определяющая комплементарность область)	77 – 102	VEAED AATYY CQQWT SNPPT FGGGT K	1,00	–
HC20	HC20 / связывание с FCgR и C1q	260 – 278	TPEVTCVVVDV SHEDPEVK	1,03 ± 0,01	–
HC39	HC39 / связывание с FCgR2/FcRn, последовательность, подверженная окислению и деамидированию	421 – 443	WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQK	1,04 ± 0,01	–
HC3	LC1 + HC3 / CDR pk 2 / N-концевая последовательность легкой цепи	24 – 38	ASGYTFTSYNM HWVK	1,05 ± 0,01	–

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

1	2	3	4	5	6
HC35	HC35 / связывание с C1q, последовательность, подверженная деамидированию/[2]	375 – 396	GFYPSDIAVEW ESNGQPENNYK	1,12 ± 0,01	–
LC1 (pE)	LC1 / N-концевая последовательность легкой цепи	1 – 18	pEIVLSQSPAILS ASPGEK	1,17 ± 0,01	–
HC5	HC5 / CDR (определяющая комплементарность область)	44 – 63	GLEWI GAIYP GNGDT SYNQK	–	1,00
LC3	LC3 / CDR (определяющая комплементарность область)	25 – 60	ASSSVSYIHWF QQKPGSSPKPW IYATSNLASGV PVR	–	1,04 ± 0,01
HC10	HC10 / CDR (определяющая комплементарность область)	99 – 125	STYYGGDWYF NVWGAGTTVT VSAASTK	–	1,09 ± 0,01
HC18	HC18 / связывание с FCgR	227 – 252	THTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPP KPK	–	1,11 ± 0,01
HC24	HC24 / связывание с FcRn	306 – 321	VVSVLTVLHQ DWLNGK	–	1,13 ± 0,01
HC13	HC13 / Аспарагин (деамидированный)/[2]	152 – 214		–	–
	HC13 / Аспарагин (подверженный деамидированию)		DYFPEPVTVSW NSGALTSGVHT FPA	–	1,22 ± 0,01
	HC13 / Аспарагин (деамидированный)/[2]			–	–

[1] – В большинстве случаев пики HC28 и HC19 элюируют совместно. В этом случае определяют относительное время удерживания общего пика – 0,85 ± 0,02.

[2] – Данные пики склонны к вариабельности, в следствие чего их интегрирование на основе относительного времени удерживания невозможна. Способ интегрирования данных пиков описан ниже.

Интегрирование пиков, подверженных вариабельности, проводят следующим образом:

пики HC35 и HC13 – плечи основных пиков образованы модифицированными формами аспарагина: изоаспартатом и аспартатом (см.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

рис. 8 и 9). Интегрирование пиков модифицированных форм (изоаспартата и аспартата) проводят по факту наличия данных пиков, в соответствии со схемами интегрирования, показанными на рисунках 8 и 9;

пик HC40 может элюировать единым пиком или двойным пиком с недостаточным разделением. В любом случае данный пик обозначают как HC40 и проводят его интегрирование в соответствии со схемами интегрирования, представленными на рисунках 10 и 11;

пики HC28 и HC19 могут элюировать единым пиком или двойным пиком. В случае если HC28 и HC19 элюируют одним пиком, данный пик обозначают как HC28+HC19. Схему интегрирования см. рисунки 12 и 13;

пик HC10 может варьировать в интенсивности. В любом случае, пик обозначают как HC10 и проводят его интегрирование в соответствии со схемами интегрирования, представленными на рисунках 14 и 15;

разрешение между пиками HC39 и HC3 может варьировать. Вне зависимости от вариации в разрешении, данные пики должны быть интегрированы в соответствии со схемами интегрирования, представленными на рисунках 16 и 17.

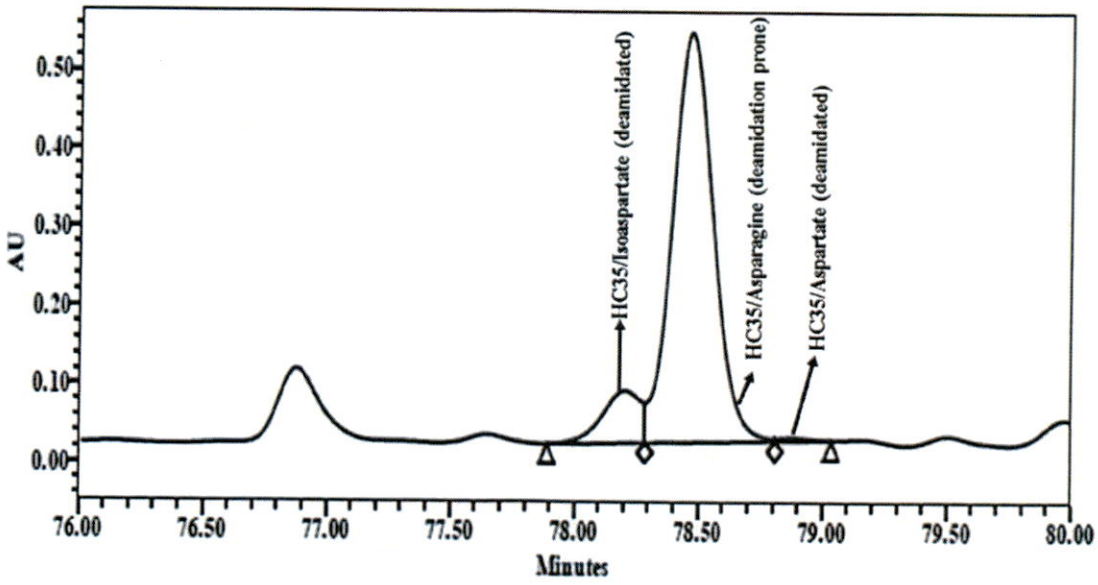

Рис. 8. Интегрирование пика HC35 (с плечевыми пиками)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

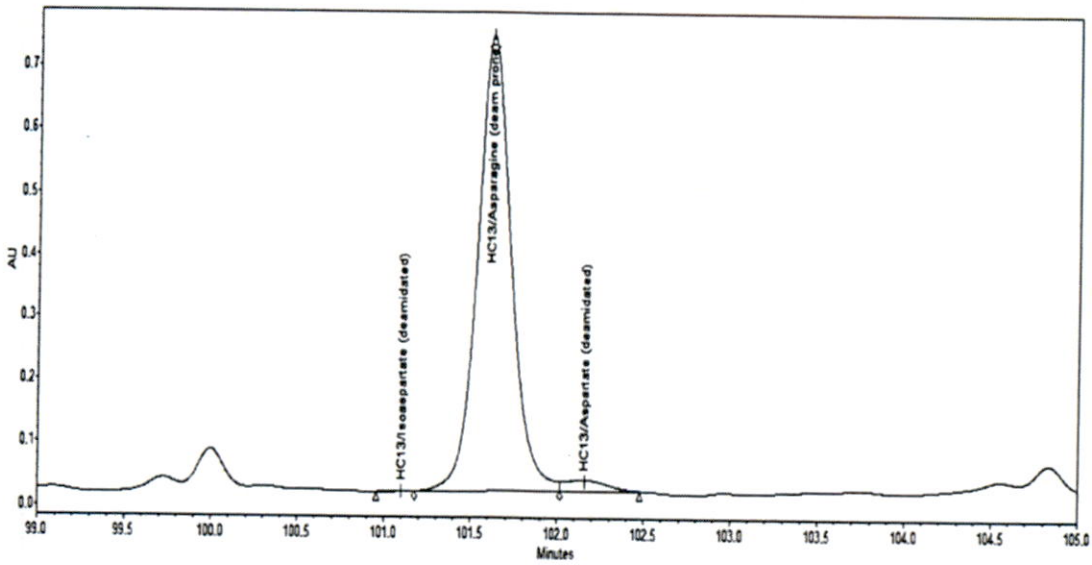

Рис. 9. Интегрирование пика HC13 (с плечевыми пиками)

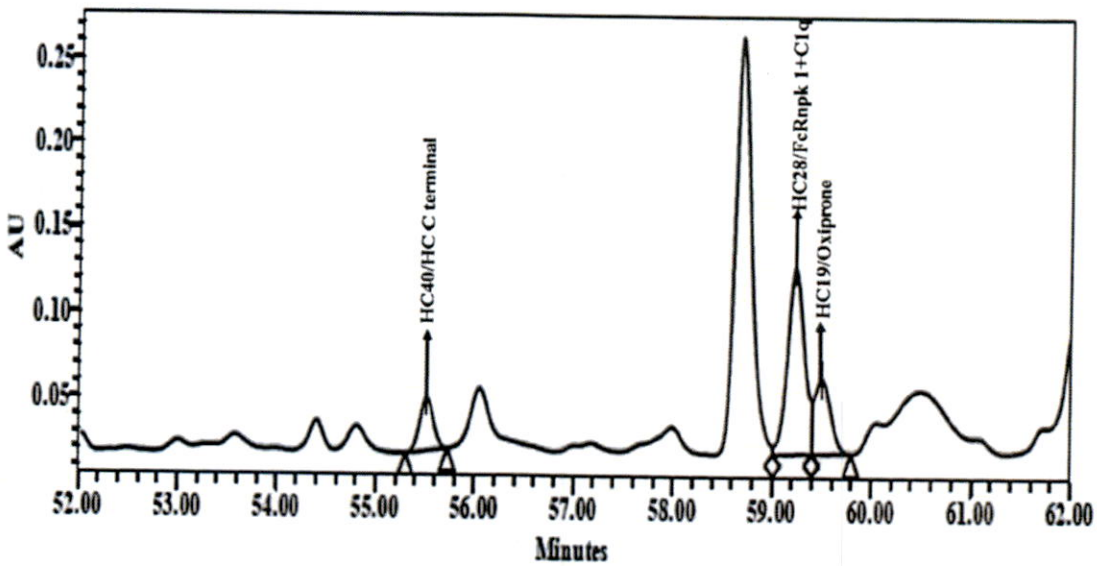

Рис. 10. Интегрирование пика HC40 (отдельный пик)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

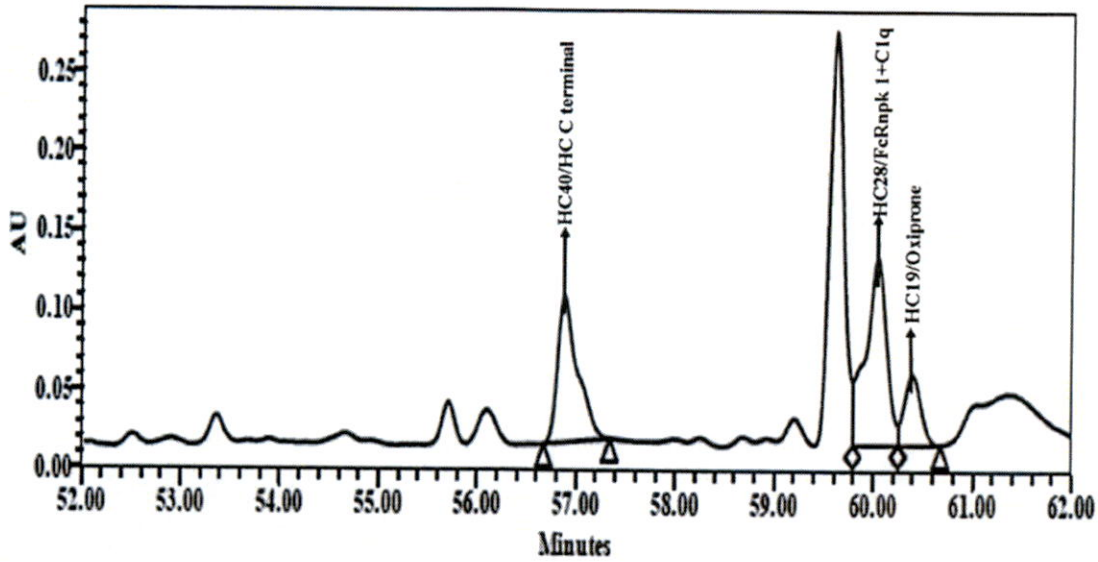

Рис. 11. Интегрирование пика HC40 (двойной недостаточно разделенный пик)

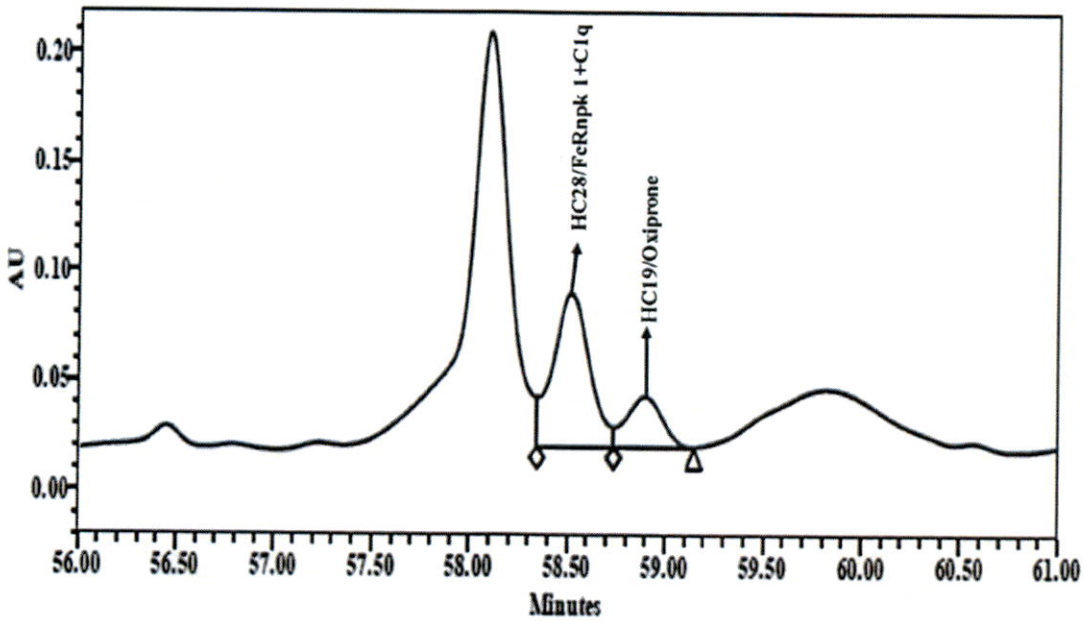

Рис. 12. Интегрирование пиков HC28 и HC19 (двойной пик)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

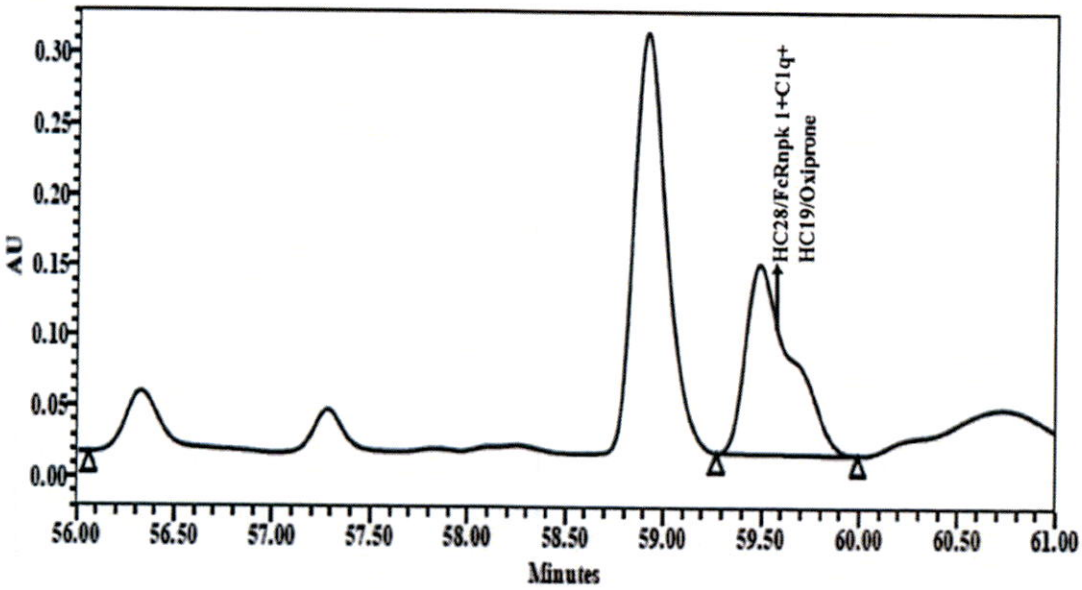

Рис. 13. Интегрирование пиков HC28 и HC19 (единый пик)

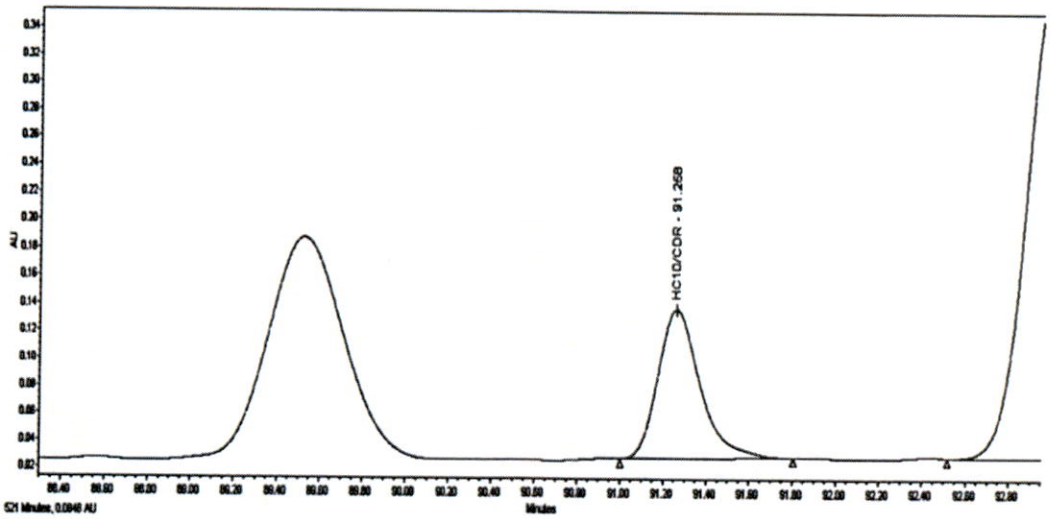

Рис. 14. Интегрирование пика HC10 (высокая интенсивность)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

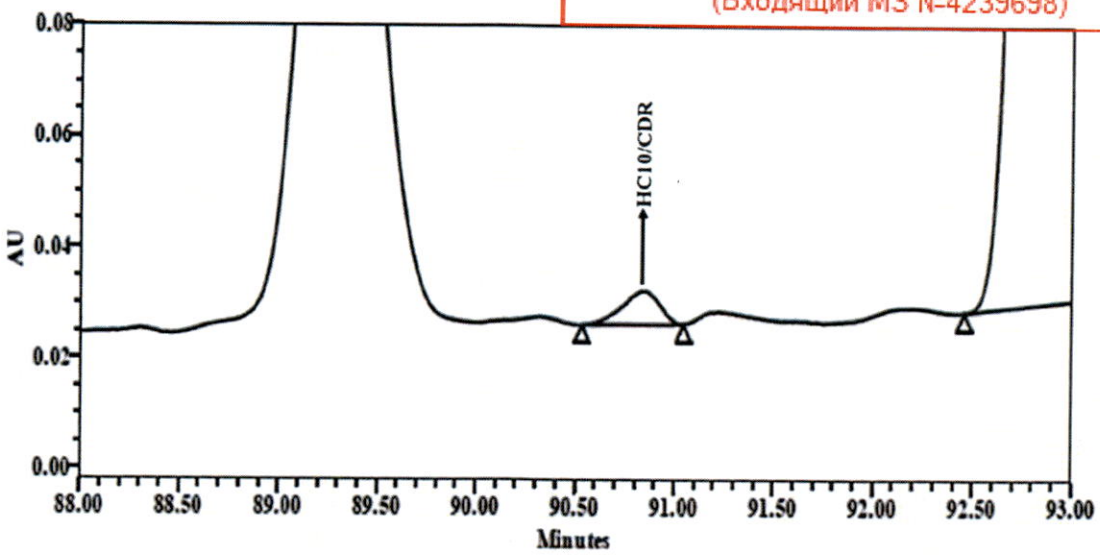

Рис. 15. Интегрирование пика HC10 (низкая интенсивность)

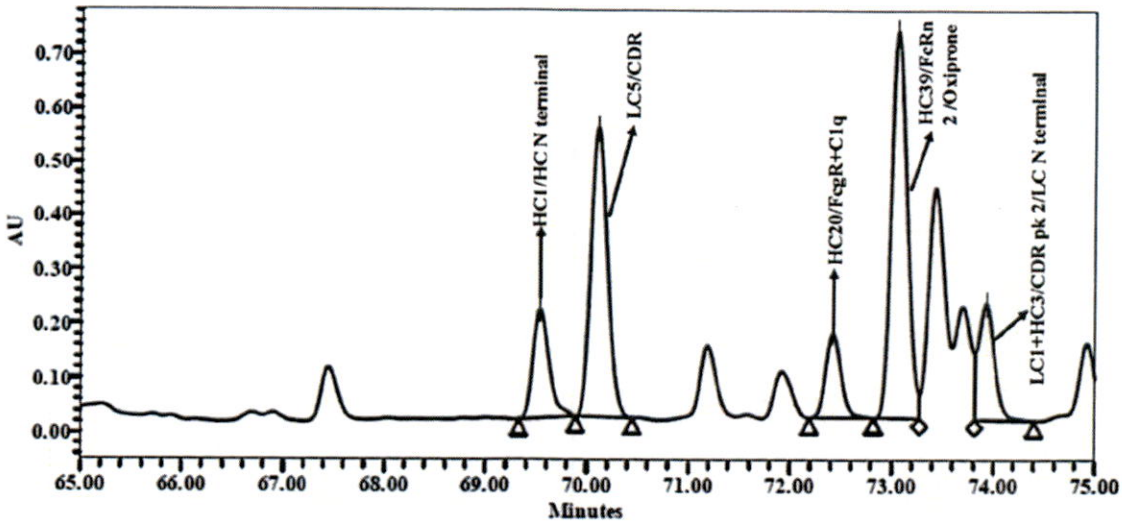

Рис. 16. Интегрирование пиков HC39 и HC3 (вариант 1)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

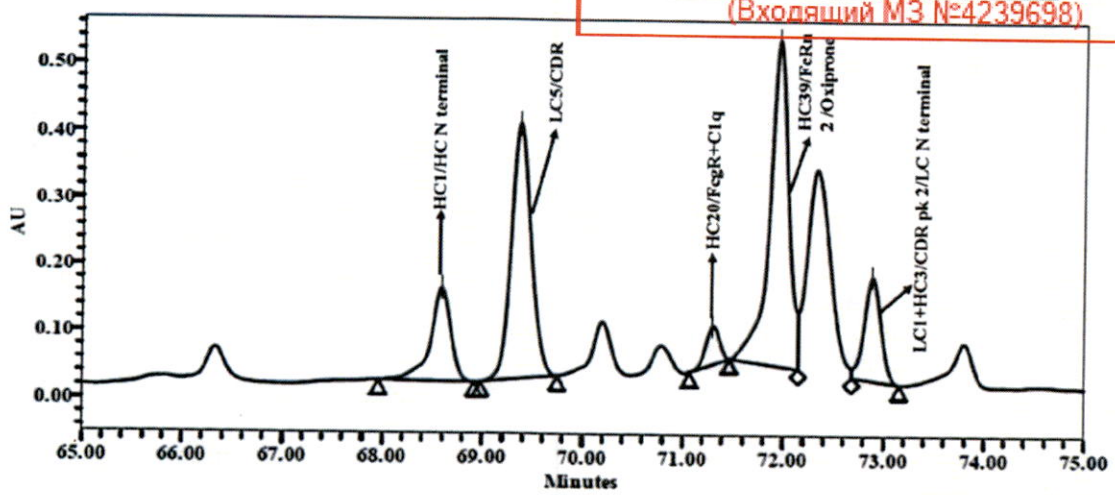

Рис. 17. Интегрирование пиков HC39 и HC3 (вариант 2)

Хроматографическая система считается пригодной, если:

1. Фактически получаемый профиль хроматограммы раствора стандартного образца ритуксимаба соответствует профилю типичной хроматограммы раствора стандартного образца ритуксимаба (рис. 3, 4).

2. На хроматограммах раствора стандартного образца ритуксимаба:

2.1. Разрешение *R* между пиками HC5 и LC3 не менее 5,0.

2.2. Относительная площадь пика HC23 составляет 2,5 % – 4,6 %;

относительная площадь пика LC5 составляет 6,8 % – 12,6 %;

относительная площадь пика HC5 составляет 6,3 % – 11,8 %.

Примечания

1. Критерии 1, 2.1 определяются для каждой из двух хроматограмм раствора стандартного образца ритуксимаба. Критерий 2.2 определяется по среднему значению относительных площадей пиков, полученных для двух хроматограмм стандартного раствора ритуксимаба.

2. Если хроматографическая система не удовлетворяет критериям пригодности системы, колонку промывают в соответствии с программой хроматографирования и процедуру проверки пригодности системы повторяют. Если после повторного проведения процедуры хроматографическая система не соответствует критериям пригодности, проводят оценку других параметров системы, таких как подвижные фазы и др.

В хроматограф вводят по 100 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца ритуксимаба.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Примечание. Раствор стандартного образца ритуксимаба вводят в конце цикла измерений и, при необходимости анализа нескольких образцов подряд, после каждых шести инжекций.

Проводят идентификацию и интегрирование пиков на хроматограммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца ритуксимаба в соответствии с процедурой, описанной в разделе «Идентификация и интегрирование пиков».

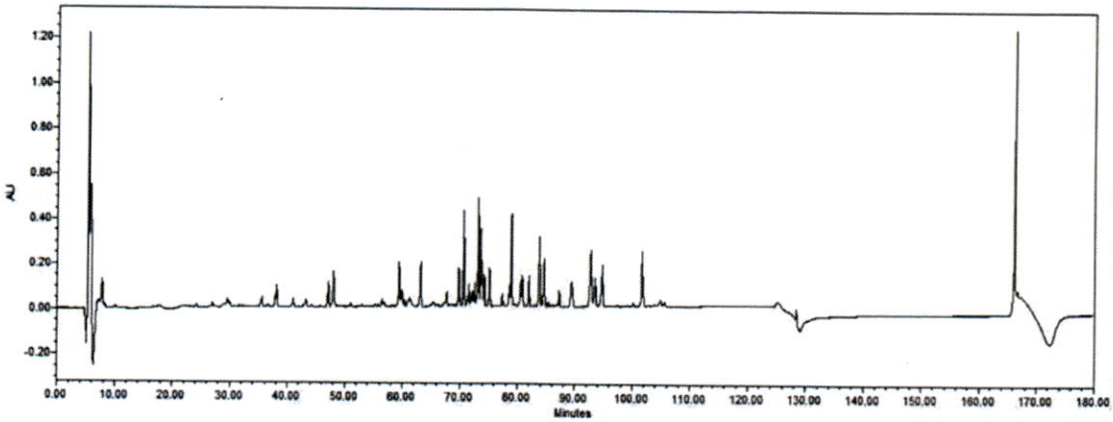

Рис. 18. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в масштабе полной шкалы)

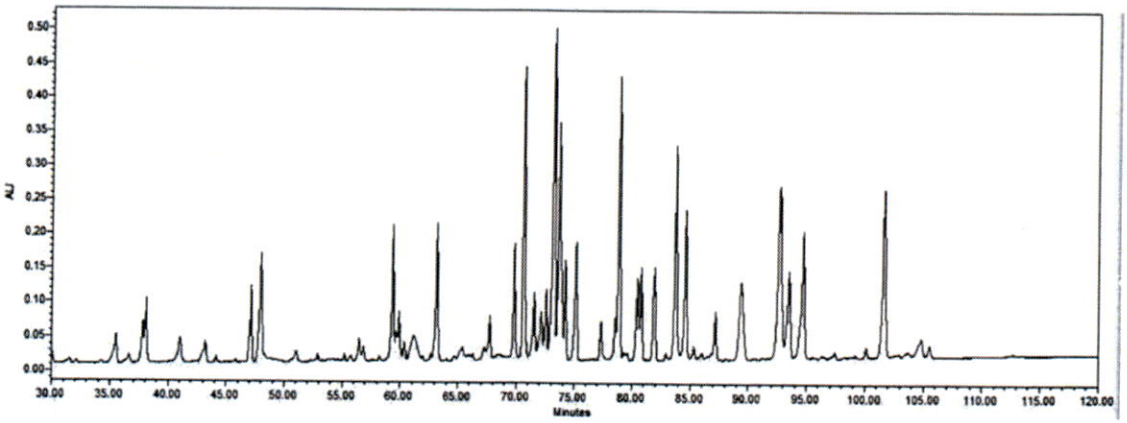

Рис. 19. Типичная хроматограмма испытуемого раствора 30 – 120 мин (в увеличенном масштабе)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

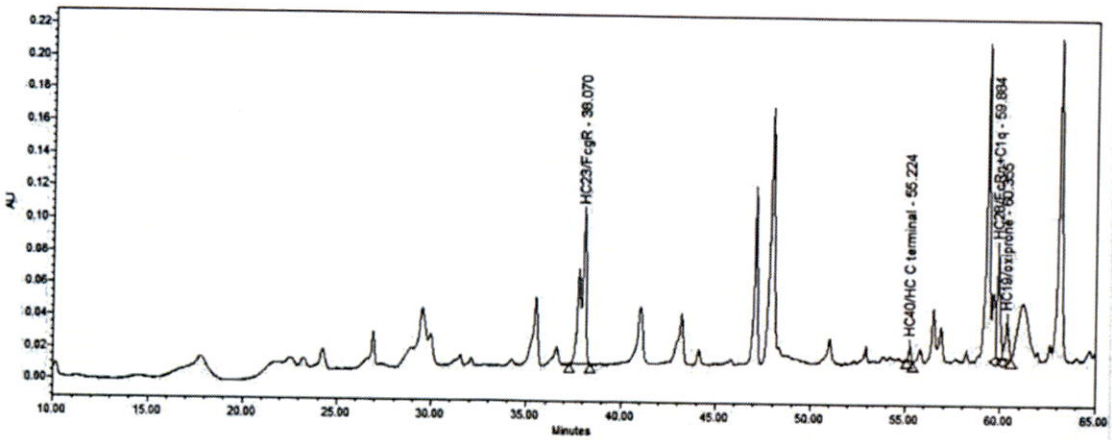

Рис. 20. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в увеличенном масштабе) с указанием характерных пиков, включая референсные, и разметки при их интегрировании (10 – 65 мин)

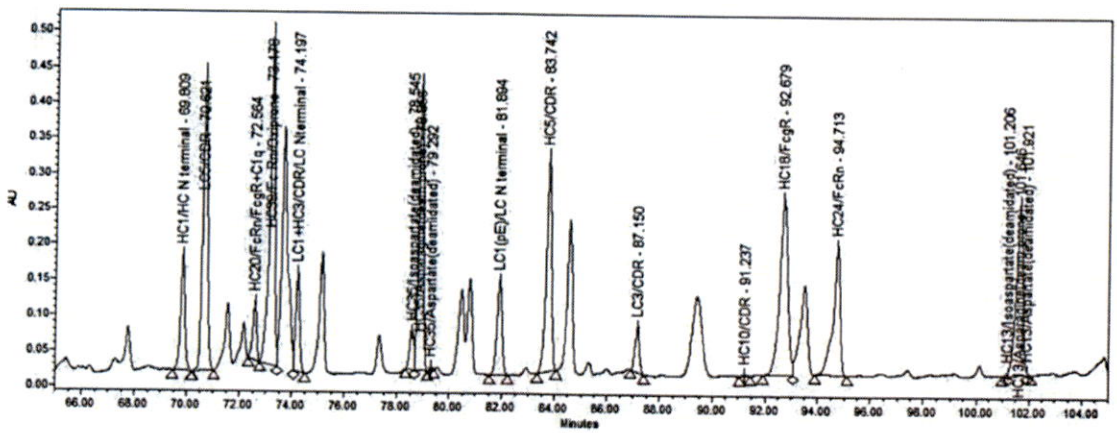

Рис. 21. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в увеличенном масштабе) с указанием характерных пиков, включая референсные, и разметки при их интегрировании (65 – 105 мин)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

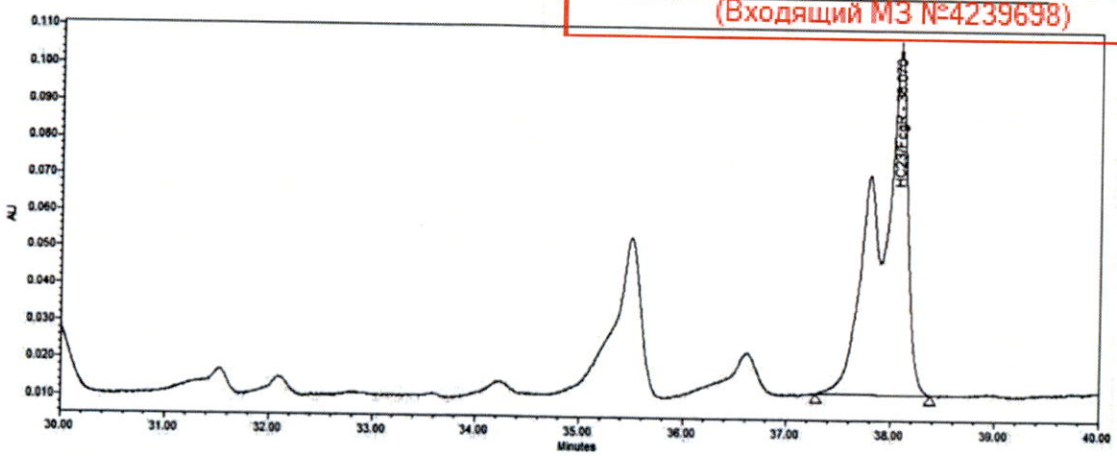

Рис. 22. Типичная хроматограмма испытуемого раствора с разметкой при интегрировании референсного пика HC23 (в увеличенном масштабе)

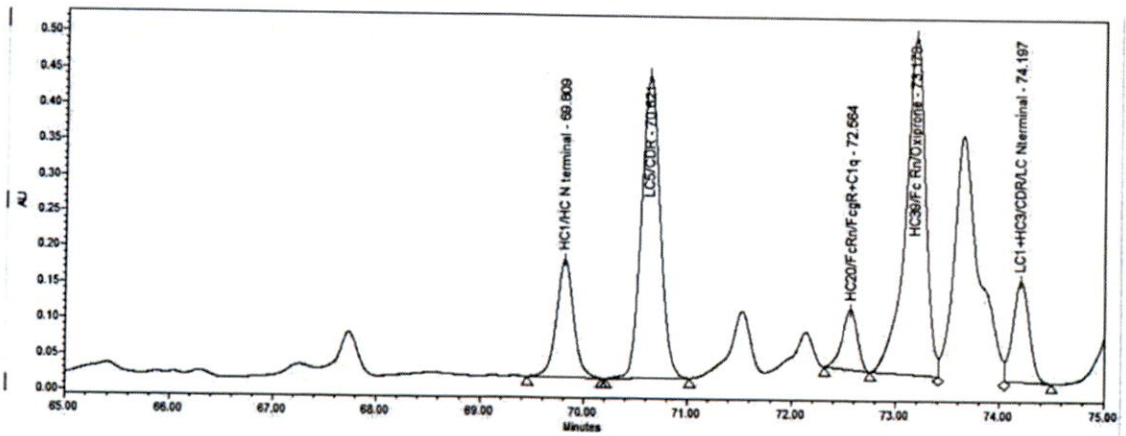

Рис. 23. Типичная хроматограмма испытуемого раствора с разметкой при интегрировании референсного пика LC5 (в увеличенном масштабе)

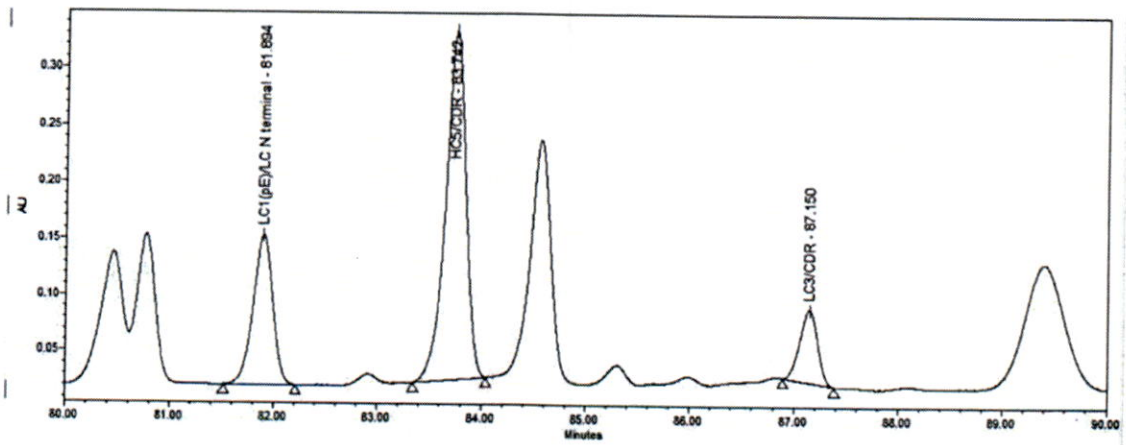

Рис. 24. Типичная хроматограмма испытуемого раствора с разметкой при интегрировании референсного пика HC5 (в увеличенном масштабе)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Результаты анализа считаются достоверными, если средние значения относительных площадей пиков HC23, LC5 и HC5, полученные для хроматограммы второй инжекции раствора стандартного образца ритуксимаба и хроматограммы раствора стандартного образца ритуксимаба в конце анализа соответствуют критериям пригодности хроматографической системы.

По окончании анализа колонку промывают согласно программе хроматографирования.

Колонку хранят, заполненной подвижной фазой В.

Учет результатов

Используют программное обеспечение Empower или аналогичное. Сравнивают профили характерных пиков ритуксимаба на хроматограмме испытуемого раствора и хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба в рамках одного анализа. Относительное стандартное отклонение относительных площадей пиков, рассчитанное по хроматограммам второй инжекции раствора стандартного образца ритуксимаба и испытуемого раствора:

HC23, HC1 (pE), LC5, HC20, HC39, HC3, HC35/Аспарагин (подверженный деамидированию), LC1 (pE), HC5, HC18 и HC24 – не более 20 %.

Примечания

1. Относительную площадь индивидуального пика в процентах (X_i) вычисляют с помощью хроматографического программного обеспечения по формуле:

$$X_i = \frac{S_i}{\sum S_s} \times 100,$$

где: S_i – площадь индивидуального пика на хроматограмме испытуемого раствора;

$\Sigma\ S_s$ – сумма площадей всех характерных пиков ритуксимаба на хроматограмме испытуемого раствора.

2. Относительное стандартное отклонение относительных площадей пиков в процентах (X), рассчитанное по хроматограммам второй инжекции раствора стандартного образца ритуксимаба и испытуемого раствора, вычисляют по формулам:

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

(1)

$$\bar{X} = \frac{X_{0i2} + X_i}{2},$$

(2)

$$SD = \sqrt{\frac{(X_{0i2} - \bar{X})^2 + (X_i - \bar{X})^2}{2}},$$

(3)

$$X = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100,$$

где: X_{0i2} – относительная площадь индивидуального пика на хроматограмме второй инжекции раствора стандартного образца ритуксимаба;

X_i – относительная площадь индивидуального пика на хроматограмме испытуемого раствора;

$\bar{X}$ – среднее арифметическое значение между относительными площадями пика на хроматограмме испытуемого раствора и хроматограмме второй инжекции раствора стандартного образца ритуксимаба;

SD – стандартное отклонение относительных площадей пика;

X – относительное стандартное отклонение относительных площадей пика, в процентах.

3. Максимально допустимое отличие времен удерживания референсных пиков на хроматограммах испытуемого раствора оценивают по диапазону ± 5 % от времен удерживания соответствующих пиков на хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба по формулам:

допустимое отклонение времени удерживания пика HC23исп = $\pm\left(\frac{\text{время удерживания пика HC23стд} \times 5}{100}\right)$ мин;

допустимое отклонение времени удерживания пика LC5исп = $\pm\left(\frac{\text{время удерживания пика LC5стд} \times 5}{100}\right)$ мин;

допустимое отклонение времени удерживания пика HC5исп = $\pm\left(\frac{\text{время удерживания пика HC5стд} \times 5}{100}\right)$ мин.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Метод 2. Испытание проводят методом эксклюзионной ВЭЖХ (см. «Молекулярно-массовое распределение»).

Норма. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца ритуксимаба.

Прозрачность. Испытание проводят визуальным методом в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

Норма. Опалесценция раствора не должна превышать опалесценцию эталона III.

Цветность. Испытание проводят визуальным методом в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0006.15 «Степень окраски жидкостей», Метод 2.

Норма. Раствор должен быть окрашен не более интенсивно, чем эталон Y_5.

pH. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия».

Норма. От 6,30 до 6,70.

Механические включения.

Видимые частицы. Испытание проводят визуальным методом в соответствии с требованиями Eur. Ph.

Норма. Видимые механические включения отсутствуют.

С 10 флаконов удаляют наклеенные этикетки, моют снаружи и сушат. Флакон с препаратом плавно вращают или переворачивают, избегая образования воздушных пузырьков, и просматривают в течение около 5 с перед белым экраном. Эту процедуру повторяют перед черным экраном. Отмечают наличие любых частиц.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Невидимые частицы. Испытание проводят счетно-фотометрическим методом в соответствии с требованиями USP.

Норма. Частицы размером ≥10 мкм: не более 6000 на флакон; частицы размером ≥ 25 мкм: не более 600 на флакон.

Анализ проводят с помощью автоматического счетчика частиц методом световой блокировки, откалиброванного по сертифицированным эталонным материалам, состоящим из дисперсий сферических частиц известного размера в интервале от 10 мкм до 25 мкм.

Метод 1 (с использованием инжектора объемом 5 мл).

Предварительная подготовка. Тест выполняют предпочтительно в шкафу с ламинарным потоком. Всю стеклянную лабораторную посуду и фильтровальное оборудование, за исключением мембранных фильтров, тщательно промывают теплым раствором моющего средства и ополаскивают большим количеством воды, чтобы удалить все следы моющего средства. Непосредственно перед использованием оборудование ополаскивают сверху донизу и с внешней и внутренней сторон водой, не содержащей частиц.

Следует избегать образования пузырьков воздуха в исследуемом препарате.

Для проверки пригодности условий для проведения теста, проверки стеклянной лабораторной посуды и используемой воды, выполняют следующий тест: определяют присутствие механических включений в 5 образцах по 5 мл воды, не содержащей частиц. Если для объединенной пробы воды объемом 25 мл число частиц размером 10 мкм или более превышает 25, то меры предосторожности для проведения теста недостаточны.

Подготовительные этапы следует повторять до тех пор, пока условия, лабораторная посуда и вода не станут пригодными для проведения теста.

Методика. 3 флакона вместимостью 50 мл или 10 флаконов вместимостью 10 мл освобождают от внешней упаковки и бумажных этикеток. Ополаскивают внешнюю поверхность флакона профильтрованной или

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

деионизированной водой. Содержимое каждого флакона перемешивают, медленно переворачивая флакон 20 раз. Внешнюю поверхность флакона промывают под струей воды, не содержащей частиц, и удаляют колпачок, не подвергая контаминации. Пузырьки воздуха удаляют, оставляя флакон стоять в течение 2 мин, или обрабатывают ультразвуком в течение 30 с.

Производят разгерметизацию флакона вместимостью 50 мл и помещают счетчик пробы в середину раствора. Аккуратно перемешивают содержимое флакона, вращая его в руках. Содержимое флаконов вместимостью 10 мл объединяют и тщательно перемешивают. Отбирают не менее четырех проб препарата, каждая из которых не менее 5 мл, в свето-защищенный счетчик частиц. Подсчитывают в каждой пробе количество нормируемых частиц (10 мкм и 25 мкм). Не учитывают результат определения для первой пробы.

Среднее значение количества частиц во флаконе испытуемого препарата (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{P \times D}{V},$$

где: P – среднее значение количества частиц в пробе, рассчитанное по трем пробам;

D – объем препарата во флаконе, в миллилитрах;

V – объем пробы, в миллилитрах.

Метод 2 (с использованием инжектора объемом 1 мл).

Для испытания отбирают 1 флакон вместимостью 50 мл или 1 флакон вместимостью 10 мл.

Испытание проводят в соответствии с методикой, описанной выше, отбирая не менее четырех проб препарата, каждая из которых не менее 1 мл, в свето-защищенный счетчик частиц. Не учитывают результат определения для первой пробы.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Молекулярно-массовое распределение. Испытание проводят методом эксклюзионной ВЭЖХ.

Норма. Мономер – не менее 92 %; сумма агрегатов – не более 8 %.

Реактивы:

Калия дигидрофосфат (Molecular biology grade, Merck, кат. № 529568 или аналогичного качества)

Дикалия гидрофосфат (Analytical grade, Merck, кат. № 137010 или аналогичного качества)

Калия хлорид (Analytical grade, Merck, кат. № 104936 или аналогичного качества)

Этанол (для ВЭЖХ, Sigma-Aldrich, кат. № 02854 или аналогичного качества)

Гуанидина гидрохлорид (Molecular biology grade, Sigma-Aldrich, кат. № G3272 или аналогичного качества)

Вода, прошедшая через систему высокой очистки Milli-Q Merck, или аналогичного качества

Плацебо-раствор препарата (НД фирмы), производитель «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия или АО «Р-Фарм», Россия.

Стандартный образец. Стандартный образец ритуксимаба (НД фирмы), производитель «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия.

Раствор А. К 27,2 г калия дигидрофосфата и 18,65 г калия хлорида прибавляют около 700 мл воды, перемешивают при помощи магнитной мешалки до полного растворения, переносят раствор в мерный цилиндр вместимостью 1 л, доводят объем раствора до 1 л водой и перемешивают.

Примечание. При необходимости можно приготовить уменьшенное вдвое количество раствора А. Для этого пересчитывают количество используемых реактивов соответствующим образом.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор В. К 69,7 г дикалия гидрофосфата и 37,3 г калия хлорида прибавляют около 700 мл воды и перемешивают при помощи магнитной

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

мешалки до полного растворения, переносят раствор в мерный цилиндр вместимостью 2 л, доводят объем раствора до 2 л водой и перемешивают.

Примечание. При необходимости можно приготовить уменьшенное вдвое количество раствора В. Для этого пересчитывают количество используемых реактивов соответствующим образом.

Раствор используют свежеприготовленным.

Подвижная фаза (ПФ) (200 мМ калий-фосфатный буфер с 250 мМ калия хлоридом, pH 7,0 ± 0,1). К 800 мл раствора А прибавляют 1400 мл раствора В и перемешивают на магнитной мешалке в течение 5 мин. При постоянном перемешивании на магнитной мешалке продолжают прибавление раствора В (примерно по 5 – 10 мл) до достижения pH значения 7,0 ± 0,1. Фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазируют в ультразвуковой водяной бане (без вакуума) в течение 10 мин.

Примечание. При необходимости можно приготовить уменьшенное вдвое количество подвижной фазы. Для этого пересчитывают количество используемых реактивов соответствующим образом.

Срок годности подвижной фазы 14 сут при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

Раствор этанола. 100 мл этанола помещают в колбу вместимостью 1 л, прибавляют 400 мл воды и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес при хранении при комнатной температуре.

Испытуемый раствор. *X* мкл препарата помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 2,0 мл, прибавляют (400 – *X*) мкл плацебо-раствора препарата и перемешивают.

Примечания

1. Объем препарата (*X*, мкл), необходимый для приготовления раствора, вычисляют по формуле: $\frac{5}{C} \times 400$, где *C* – концентрация препарата, в мг/мл (по результатам количественного определения ритуксимаба или из данных сертификата анализа препарата «Реддитукс®»), *5* – количество ритуксимаба в 1 мл испытуемого раствора, в мг.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

2. Объем испытуемого раствора может быть изменен по необходимости. Для этого пересчитывают количество используемых реактивов соответствующим образом.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца ритуксимаба. 100 мкл стандартного образца ритуксимаба (НД фирмы) помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 2,0 мл, прибавляют 100 мкл плацебо-раствора препарата и перемешивают.

Примечание. Объем раствора стандартного образца ритуксимаба может быть изменен по необходимости. Для этого пересчитывают количество используемых реактивов соответствующим образом.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. *X* мкл стандартного образца ритуксимаба (НД фирмы) помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 0,5 мл, прибавляют (100 – *X*) мкл плацебо-раствора препарата и перемешивают.

Примечание. Объем стандартного образца ритуксимаба (*X*, мкл), необходимый для приготовления раствора, вычисляют по формуле: $\frac{1}{C_0} \times 100$, где C_0 – концентрация стандартного образца ритуксимаба, в мг/мл (из данных сертификата анализа стандартного образца ритуксимаба), *1* – количество ритуксимаба в 1 мл раствора после первого разведения, в мг.

10 мкл полученного раствора помещают в пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 990 мкл плацебо-раствора препарата и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия

Прибор	Waters HPLC system или аналогичный, оборудованный диодно-матричным спектрофотометрическим детектором (PDA-детектор) или спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны (УФ-детектор)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Колонка	300 мм × 7,8 мм, 5 мкм, 250 Å, TSKgel G3000 SWXL (Tosoh Bioscience, кат. № 08541) или аналогичная
Предколонка	40 мм × 6,0 мм, TSKgel SWXL Guardcol (Tosoh Bioscience, кат. № 08543) или аналогичная
ПФ	200 мМ калий-фосфатный буфер с 250 мМ калия хлоридом, pH 7,0 ± 0,1
Скорость потока	0,5 мл/мин
Градиент	Изократический
Температура колонки	(25 ± 2) °C
Температура образца	(5 ± 3) °C
Детектор	PDA или УФ, 215 нм
Нагрузка белка на колонку	25 мкг
Время хроматографирования	30 мин

Программы хроматографирования

	Канал А	**Канал В**	**Канал С**
Время (мин)	**Вода (%)**	**Раствор этанола (%)**	**ПФ (%)**
Рекомендации по инициализации новой колонки			
0 – 30	100	0	0
31 – 170	0	0	100
Уравновешивание колонки			
0 – 50	0	0	100
Анализ			
0 – 30	0	0	100
Рекомендации по очистке колонки			
0 – 30	100	0	0
31 – 90	0	100	0
Рекомендации по хранению колонки			
0 – 60	0	100	0

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Проводят прайминг всех каналов соответствующими растворами.

При использовании новой колонки проводят ее инициализацию в соответствии с программой хроматографирования.

Проводят уравновешивание колонки в соответствии с программой хроматографирования.

В хроматограф вводят 5 мкл воды. Если базовая линия не стабильна, процедуру повторяют до ее стабилизации.

В хроматограф вводят по 5 мкл плацебо-раствора препарата, раствора стандартного образца ритуксимаба и проводят визуальное сопоставление полученного профиля пиков с профилем пиков на рисунке 26 (кондиционирование колонки).

Примечания

При использовании новой колонки:

1. Плацебо-раствор препарата вводят только после процедуры кондиционирования колонки.
2. Во время кондиционирования колонки раствор стандартного образца ритуксимаба вводят 3 раза для достижения устойчивого профиля пиков. При необходимости процедуру повторяют.

В хроматограф вводят по 5 мкл плацебо-раствора препарата («холостая проба»), раствора стандартного образца ритуксимаба (2 раза) и 25 мкл раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (1 раз).

Идентификация и интегрирование пиков.

Идентификацию и интегрирование пиков проводят в автоматическом режиме.

Автоматический режим интегрирования

Параметры автоматического режима для системы Waters с программным обеспечением Empower 3.0 или аналогичным указаны в таблице 3. При расчетах и интегрировании не учитывают пики холостой пробы. Для исключения пиков холостой пробы можно воспользоваться функцией вычитания хроматограмм холостой пробы из хроматограмм

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

раствора стандартного образца ритуксимаба/испытуемого раствора, соответственно, с помощью хроматографического программного обеспечения.

Таблица 3. Параметры режима автоматического интегрирования для системы Waters.

Параметр	**Установленное значение (раствор стандартного образца ритуксимаба и испытуемый раствор)**	**Установленное значение (раствор для проверки чувствительности хроматографической системы)**
Алгоритм интегрирования (Integration algorithm)	Apex track	Apex track
Время начала (Start time)	10 мин*	16 мин*
Время окончания (End time)	23 мин*	18 мин*
Ширина пика (Peak Width)	350 (от 100 до 700)	350 (от 100 до 700)
Порог интегрирования (Threshold)	60 (от 10 до 100)	60 (от 10 до 100)
Точка конца пика (Touchdown) (%)	0,050 (от 0,01 до 0,1)	0,00 (от 0,00 до 0,1)
Минимальная высота (Minimum height)	200 (от 100 до 500)	200 (от 100 до 500)
Минимальная площадь (Minimum Area)	0	0
Отношение «долина/долина»	от 20 до 23 мин*	-
Детектировать плечи (Detect shoulders)	от 17,5 до 20 мин*	-
Задание ширины пика для разметки пиков-наездников (Tangential skim Set peak width) (с)	от 17,5 до 20 мин 50 (от 10 до 100) time window (17,5 мин*)	-

* Время начала и окончания интегрирования может быть скорректировано на основании времени выхода основного пика.

Примечание. В случае, если пики не интегрируются автоматически, то при разметке пиков применяют коррекцию базовой линии или ручной режим интегрирования. Вычитают пики холостой пробы. Интегрируют пики в

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

интервале 10 – 23 мин: пик мономера (пик с максимальной интенсивностью), пики агрегатов (пики до пика мономера), пик низкомолекулярных соединений (пик с относительным временем удерживания по пику мономера около 1,2). Интегрируют по базовой линии от начала пиков агрегатов до конца пика низкомолекулярных соединений, опуская перпендикуляры к базовой линии от начала пика мономера и начала пика низкомолекулярных соединений (см. рис. 26 – 27). Если на хроматограмме присутствует пик низкомолекулярных примесей (LMW-1) в виде «наездника», интегрирование производят согласно рисункам 31 – 32. В случае, если пики разделены до базовой линии, их интегрируют отдельно, по базовой линии от начала до конца пика.

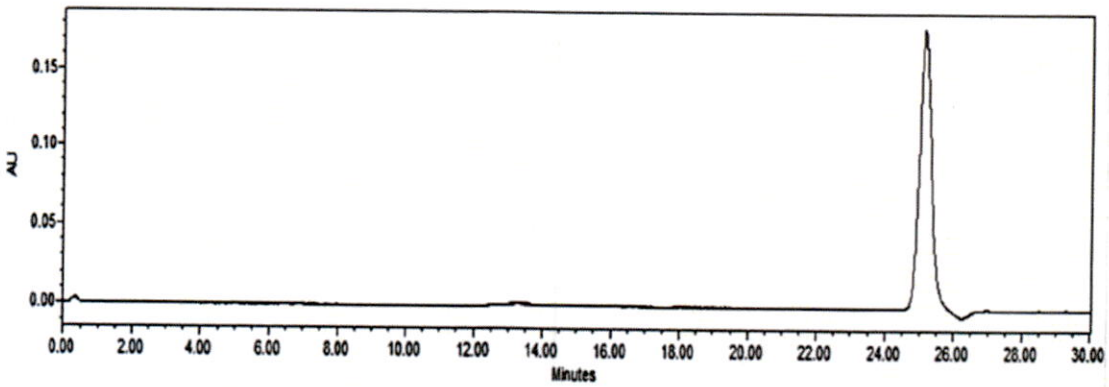

Рис. 25. Типичная хроматограмма «холостой пробы» раствора стандартного образца ритуксимаба

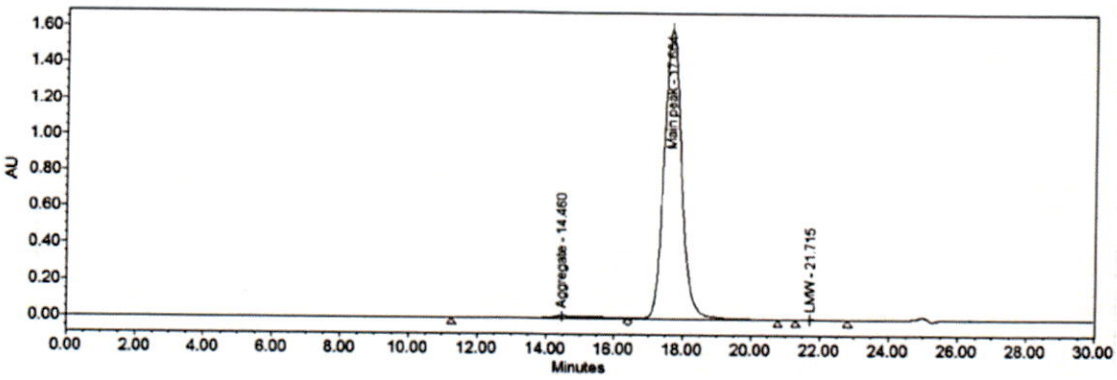

Рис. 26. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба (в масштабе полной шкалы) с указанием разметки пиков при их интегрировании

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

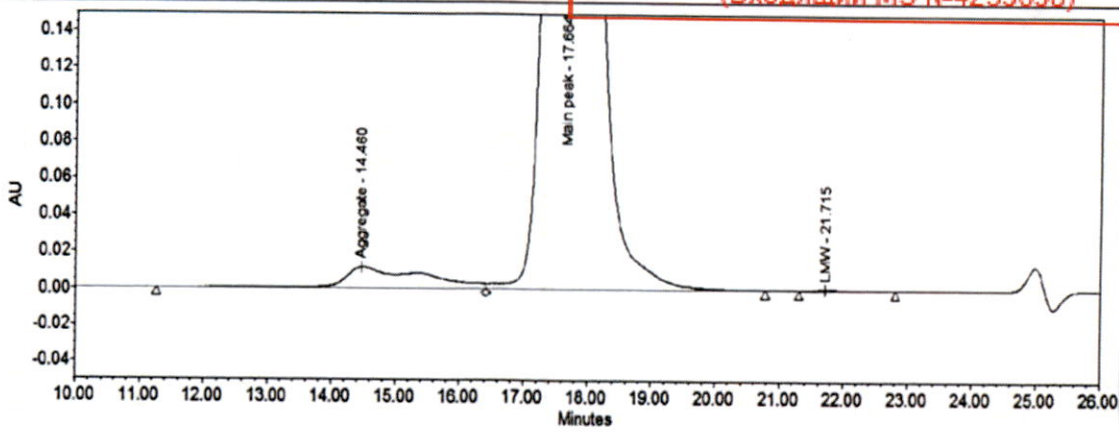

Рис. 27. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца ритуксимаба (в масштабе, соответствующем пикам примесей) с указанием разметки пиков при их интегрировании

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие требования:

1. На хроматограммах раствора стандартного образца ритуксимаба

– относительное стандартное отклонение времени удерживания пика мономера не более 2,0 %;

– относительное стандартное отклонение суммарной площади пиков агрегатов не более 15 %;

– фактор асимметрии пика мономера от 0,8 до 1,5;

– разрешение *R* между пиком мономера и ближайшим к нему пиком агрегата не менее 1,5.

2. На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы отношение сигнал-шум для пика мономера ритуксимаба не менее 10.

Примечание. При несоответствии хроматографической системы критериям пригодности, процедуру повторяют. Если после повторного проведения процедуры хроматографическая система не соответствует критериям пригодности, проводят оценку других параметров системы, таких как подвижная фаза, колонка и др.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

В хроматограф вводят по 5 мкл плацебо-раствора препарата («холостая проба»), испытуемого раствора (2 раза) и раствора стандартного образца ритуксимаба.

Примечание. Раствор стандартного образца ритуксимаба вводят в конце цикла измерений и, при необходимости анализа нескольких образцов подряд, после каждых десяти образцов.

Проводят идентификацию и интегрирование пиков на хроматограммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца ритуксимаба в соответствии с процедурой, описанной в разделе «Идентификация и интегрирование пиков».

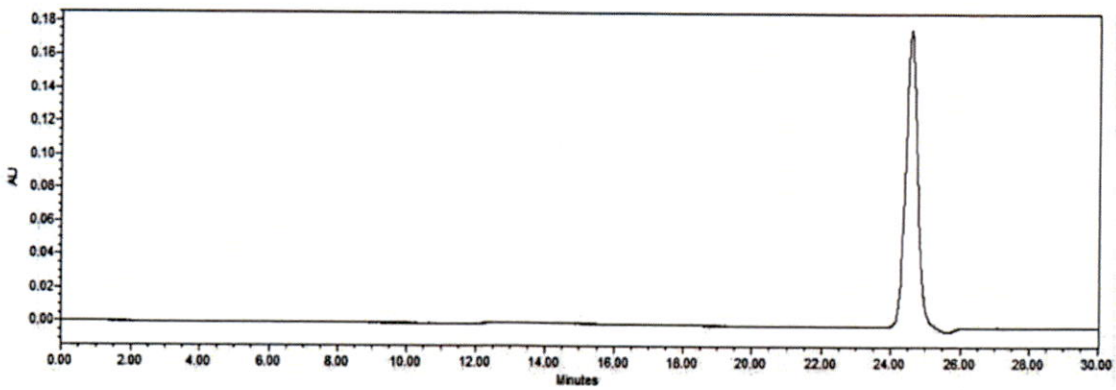

Рис. 28. Типичная хроматограмма «холостой пробы» испытуемого раствора

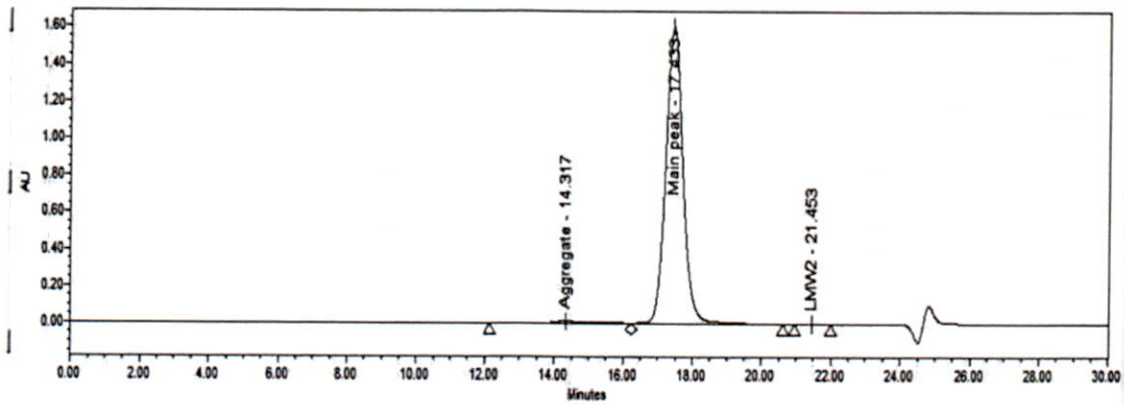

Рис. 29. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в масштабе полной шкалы) с указанием разметки пиков при их интегрировании

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

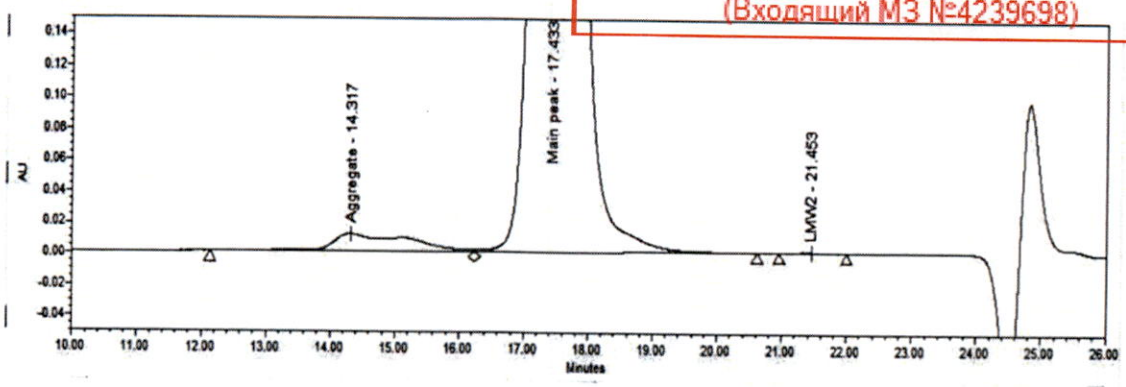

Рис. 30. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в масштабе, соответствующем пикам примесей) с указанием разметки пиков при их интегрировании

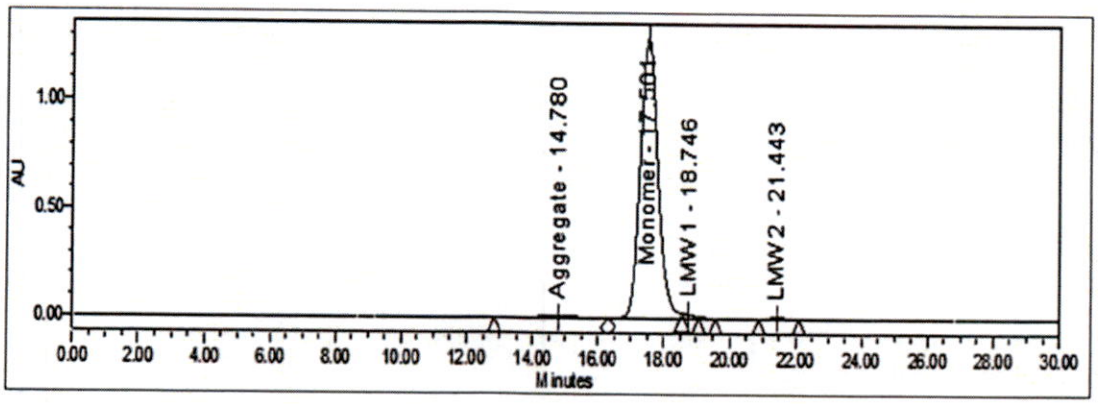

Рис. 31. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в масштабе полной шкалы) с указанием разметки пика LMW-1 в случае его присутствия

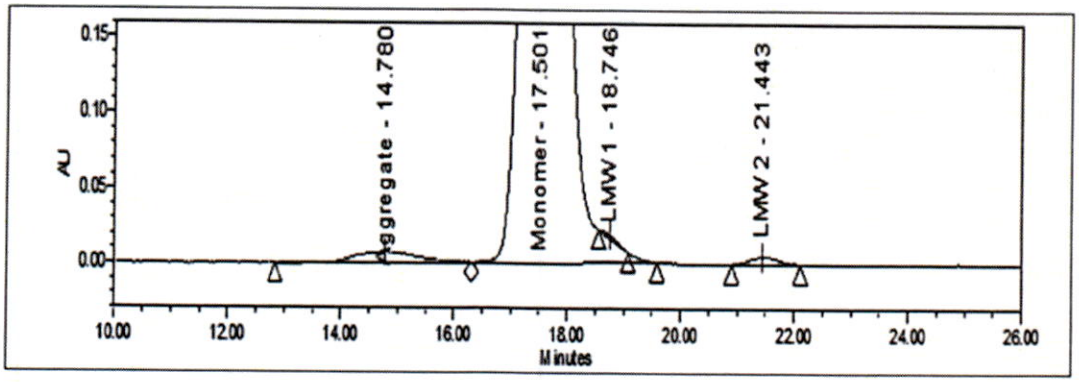

Рис. 32. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в масштабе, соответствующем пикам примесей) с указанием разметки пика LMW-1 в случае его присутствия

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограммах раствора стандартного образца ритуксимаба, полученных при определении пригодности хроматографической системы в начале и в конце анализа, выполняются следующие требования пригодности хроматографической системы:

– относительное стандартное отклонение времени удерживания пика мономера не более 2,0 %;

– относительное стандартное отклонение суммарной площади пиков агрегатов не более 15 %;

– фактор асимметрии пика мономера от 0,8 до 1,5;

– разрешение R между пиком мономера и ближайшим к нему пиком агрегата не менее 1,5.

Примечание. При несоответствии хроматографической системы критериям приемлемости, рассчитанным по инжекциям раствора стандартного образца ритуксимаба в начале и в конце анализа, колонку промывают согласно программе хроматографирования. Если промывание не улучшает показатели системы, вводят по 50 мкл раствора гуанидина гидрохлорида (5 раз) и повторяют анализ.

Приготовление раствора гуанидина гидрохлорида. 7,6 г гуанидина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 7 сут при хранении при комнатной температуре.

По окончании анализа колонку промывают согласно программе хроматографирования.

Колонку хранят плотно закрытой с обоих концов, заполненной раствором этанола.

Учет результатов

Используют программное обеспечение Empower или аналогичное (формулы расчета представлены для информации). Расчет содержания определяемых компонентов проводят методом внутренней нормализации.

Содержание мономера в процентах (X) вычисляют по формуле:

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

$$X = \frac{S_m}{\sum S_s} \times 100,$$

где: S_m – площадь пика мономера на хроматограмме испытуемого раствора;

$\Sigma\ S_s$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора за исключением пиков плацебо-раствора препарата и пика веществ небелковой природы с относительным временем удерживания (по пику мономера) около 1,4.

За результат анализа принимают среднее значение из двух вычислений.

Содержание агрегатов в процентах (Y) вычисляют по формуле:

$$Y = \frac{\sum S_a}{\sum S_s} \times 100,$$

где: $\Sigma\ S_a$ – суммарная площадь пиков агрегатов на хроматограмме испытуемого раствора;

$\Sigma\ S_s$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора за исключением пиков плацебо-раствора препарата и пика веществ небелковой природы с относительным временем удерживания (по пику мономера) около 1,4.

За результат анализа принимают среднее значение из двух вычислений.

Чистота. Испытание проводят методом электрофореза в полиакриламидном геле с Na-ДДС в восстанавливающих условиях.

Норма. На электрофореграмме испытуемого раствора две основные полосы, соответствующие молекулярным массам 25 кДа и 50 кДа, должны иметь подвижность, сравнимую с соответствующими полосами на электрофореграмме раствора стандартного образца ритуксимаба. Суммарное содержание основных полос должно составлять не менее 95,0 %.

Допускается наличие дополнительных минорных полос, суммарное содержание которых должно составлять не более 5,0 %.

Реактивы и материалы:

Набор гелей Mini-PROTEAN® TGX™, 4–15% (Bio-Rad, кат. № 4561084 или 4561083, или аналогичный)

2x Laemmli Sample Buffer буферный раствор для образцов (Bio-Rad, кат. № 1610737 или аналогичного качества)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

2-меркаптоэтанол (Analytical grade, Bio-Rad, кат. № 1610710 или аналогичного качества)

Буферный рабочий раствор для электрофореза в системе SDS-PAGE (10x Tris/Glycine/SDS running buffer, Bio-Rad, кат. № 1610732 или кат. № 1610772, или приготовленный из отдельных реактивов)

Трис(гидроксиметил)аминометан (Merck, кат. № 108382 или аналогичного качества)

Глицин (Finar, кат. № 10721SG500 или аналогичного качества)

Натрия додецилсульфат (Sigma-Aldrich, кат. № L4509 или аналогичного качества)

Маркеры молекулярной массы Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (Bio-Rad, кат. № 1610375 или аналогичного качества)

Кислотный синий 83 (Coomassie brilliant blue R) (Analytical grade, Sigma-Aldrich, кат. № B0149 или аналогичного качества)

Метанол (Analytical grade)

Ледяная уксусная кислота (Analytical grade)

Вода, прошедшая через систему высокой очистки Milli-Q Merck, или аналогичного качества

Стандартный образец. Стандартный образец ритуксимаба (НД фирмы), производитель «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия.

Оборудование:

Установка для электрофореза в полиакриламидном геле (Bio-Rad, Mini-PROTEAN™ 3 Cell; Hoefer, Mightly Small II или аналогичная)

Шейкер (Gel Rocker GeNei, GR-2, кат. № 107107GB или аналогичный)

Система гель-документирования (Bio-Rad Laboratories, Inc., Gel Doc™ EZ или аналогичная)

Чувствительность метода. 0,1 мкг белка.

Буферный раствор для образцов. 50 мкл 2-меркаптоэтанола помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 950 мкл 2x Laemmli Sample Buffer и перемешивают.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Раствор используют свежеприготовленным.

Буферный раствор для электрофореза. 100 мл буферного рабочего раствора для электрофореза в системе SDS-PAGE помещают в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до 1 л и перемешивают.

Примечание. Для приготовления буферного рабочего раствора для электрофореза в системе SDS-PAGE из отдельных реактивов 30,25 г трис(гидроксиметил)аминометана, 144,14 г глицина и 10 г натрия додецилсульфата помещают в колбу из дюранового стекла вместимостью 1 л, содержащую 800 мл воды. Переносят раствор в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до 1000 мл и перемешивают.

Срок годности раствора 6 мес при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

Раствор используют свежеприготовленным.

Красящий раствор Кумасси. 2,5 г кислотного синего 83 (Coomassie brilliant blue R) помещают в колбу из темного боросиликатного стекла вместимостью 2 л и прибавляют 900 мл метанола, перемешивают до растворения, прибавляют 200 мл ледяной уксусной кислоты и 400 мл воды, перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 ч. Доводят объем раствора водой до 2 л и фильтруют через бумажный фильтр Ватман № 1.

Срок годности раствора 6 мес при хранении в колбе из темного боросиликатного стекла при комнатной температуре.

Обесцвечивающий раствор. 400 мл метанола, 100 мл ледяной уксусной кислоты, 500 мл воды помещают в пластиковую колбу вместимостью 1 л, тщательно перемешивают.

Срок годности раствора 6 мес при хранении при комнатной температуре.

Испытуемый раствор (0,5 мкг/мкл, нагрузка 10 мкг). 100 мкл препарата разводят водой до концентрации 1 мг/мл, перемешивают на вортексе в течение 3 – 5 с на максимальной скорости и осаждают содержимое кратким (около 30 с) центрифугированием.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

20 мкл полученного раствора и 20 мкл буферного раствора для образцов помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 0,5 мл, укупоривают крышкой, чтобы избежать попадания воды, перемешивают на вортексе в течение 3 – 5 с на максимальной скорости, осаждают содержимое кратким (около 30 с) центрифугированием и помещают в кипящую водяную баню на 30 с. Затем центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течение 2 – 5 мин.

Раствор используют свежеприготовленным.

Исходный раствор стандартного образца ритуксимаба (1 мкг/мкл). 50 мкл стандартного образца ритуксимаба (НД фирмы) помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 450 мкл воды, перемешивают на вортексе и осаждают содержимое кратким (около 30 с) центрифугированием.

Раствор стандартного образца ритуксимаба (0,5 мкг/мкл, нагрузка 10 мкг). 20 мкл исходного раствора стандартного образца ритуксимаба и 20 мкл буферного раствора для образцов помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 0,5 мл, укупоривают крышкой, чтобы избежать попадания воды, перемешивают на вортексе в течение 3 – 5 с на максимальной скорости, осаждают содержимое кратким (около 30 с) центрифугированием и помещают в кипящую водяную баню на 30 с. Затем центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течение 2 – 5 мин.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для проверки чувствительности системы (0,005 мкг/мкл, нагрузка 0,1 мкг). 10 мкл исходного раствора стандартного образца ритуксимаба помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 990 мкл воды, перемешивают на вортексе в течение 3 – 5 с на максимальной скорости и осаждают содержимое кратким (около 30 с) центрифугированием.

20 мкл полученного раствора и 20 мкл буферного раствора для образцов помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 0,5 мл,

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

укупоривают крышкой, чтобы избежать попадания воды, перемешивают на вортексе в течение 3 – 5 с на максимальной скорости, осаждают содержимое кратким (около 30 с) центрифугированием и помещают в кипящую водяную баню на 30 с. Затем центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течение 2 – 5 мин.

Раствор используют свежеприготовленным.

Примечание. Рекомендуется образцы испытуемого раствора, раствора стандартного образца ритуксимаба и раствора для проверки чувствительности системы поместить на водяную баню, используя плавающий штатив. Содержимое пробирок должно полностью подвергаться кипячению на протяжении всего времени.

Подготовка геля к нанесению образцов. Осторожно удаляют гребенку, избегая повреждения ячеек геля Mini-PROTEAN® TGX™. Перед нанесением образцов аккуратно, стараясь не повредить ячейки, промывают ячейки геля буферным раствором для электрофореза, используя шприц объемом 2 мл или одноразовые пипетки, оставляют на 10 – 15 мин. При необходимости выпрямляют стенки ячеек. Устанавливают гель в установку для электрофореза и заполняют ее камеру буферным раствором для электрофореза.

Процедура нанесения на гель. При помощи микрошприца или микропипетки с наконечником для нанесения образцов на гель образцы наносят тонким слоем на «дно» ячеек геля: 10 мкл маркеров молекулярной массы Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 кДа), пропускают одну ячейку и последовательно наносят по 20 мкл раствора стандартного образца ритуксимаба (эквивалентно 10 мкг ритуксимаба), раствора для проверки чувствительности системы (эквивалентно 0,1 мкг ритуксимаба), и испытуемого раствора (эквивалентно 10 мкг ритуксимаба).

Примечание. При необходимости нанесения нескольких испытуемых растворов (не более двух на один гель) их нанесение чередуют с нанесением раствора стандартного образца ритуксимаба. Крайние ячейки оставляют незаполненными.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Условия электрофореза. Электрический потенциал 70 В в течение 10 мин и электрический потенциал 100 В до тех пор, пока полоса красителя не достигнет черной референсной границы, отмеченной на дне кассеты (к этому моменту фрагмент с молекулярной массой 10 кДа должен пройти не менее 80 % длины геля).

После окончания электрофореза демонтируют камеру, промывают гель водой и осторожно извлекают.

Окрашивание в красящем растворе Кумасси. Дальнейшие этапы выполняются с использованием шейкера при постоянном встряхивании.

Гель помещают в пластиковый контейнер и окрашивают красящим раствором Кумасси при комнатной температуре в течение 2 – 3 ч или оставляют на ночь. Удаляют красящий раствор и трижды промывают гель водой. Добавляют к гелю обесцвечивающий раствор и выдерживают до появления отчетливо различимой полосы раствора для проверки чувствительности системы, соответствующей молекулярной массе около 50 кДа.

Примечание. Если полоса раствора для проверки чувствительности системы становится невидимой, процедуру окрашивания и обесцвечивания геля проводят повторно.

Удаляют обесцвечивающий раствор, добавляют воду и выдерживают в течение 1 ч. Удаляют воду и фотографируют гель с использованием системы гель-документирования: детектируют полосы маркеров молекулярной массы и образцов, присваивают в программном обеспечении значения молекулярных масс маркерам и проводят анализ полос образцов (при этом полосы на электрофореграмме испытуемого раствора с интенсивностью окрашивания менее, чем интенсивность окрашивания полосы, соответствующей молекулярной массе около 50 кДа на электрофореграмме раствора для проверки чувствительности системы, в оценке содержания примесей не учитывают).

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Ниже представлена типичная электрофореграмма в восстанавливающих условиях с разметкой «дорожек» и указанием масс маркеров молекулярной массы.

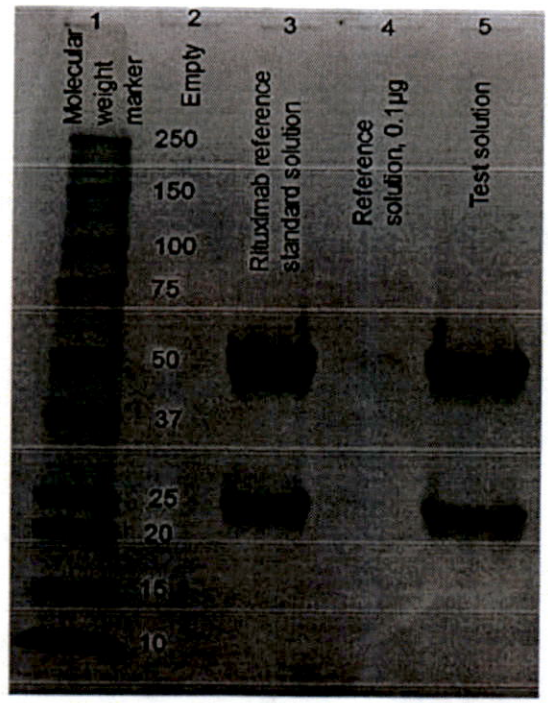

Рис. 33. Типичная электрофореграмма (в восстанавливающих условиях)

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются следующие требования пригодности системы:

полоса на электрофореграмме раствора для проверки чувствительности системы должна соответствовать молекулярной массе около 50 кДа и быть хорошо различима, и ее интенсивность должна быть выше интенсивности фона геля;

маркер с молекулярной массой 10 кДа должен пройти не менее 80 % длины геля;

коэффициент линейной регрессии (R^2) зависимости расстояния, пройденного маркерами, от логарифма их молекулярной массы должен составлять не менее 0,95.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Учет результатов

Оценивают электрофореграммы испытуемого раствора, раствора стандартного образца ритуксимаба и раствора для проверки чувствительности системы:

1. Основные полосы на электрофореграмме испытуемого раствора, соответствующие молекулярным массам 25 кДа и 50 кДа, должны по подвижности соответствовать основным полосам на электрофореграмме раствора стандартного образца ритуксимаба. Допустимое отклонение молекулярных масс основных компонентов испытуемого раствора от молекулярных масс основных компонентов раствора стандартного образца ритуксимаба должно быть не более 4,0 кДа.

2. Суммарная интенсивность основных полос на электрофореграмме испытуемого раствора должна быть не менее 95,0 %. Суммарная интенсивность дополнительных минорных полос должна быть не более 5,0 %.

3. Дополнительные полосы на электрофореграмме испытуемого раствора с интенсивностью окрашивания менее, чем интенсивность окрашивания полосы, соответствующей молекулярной массе около 50 кДа на электрофореграмме раствора для проверки чувствительности системы, не учитывают в оценке содержания примесей.

Осмоляльность. Испытание проводят криоскопическим методом в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0003.15 «Осмолярность».

Норма. 342 – 382 мОсмоль/кг.

Извлекаемый объем. Испытание проводят гравиметрическим методом в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0003.15 «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

Плотность препарата 1,0124 г/см^3.

Норма. Не менее номинального.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Бактериальные эндотоксины. Испытание проводят гель-тромб тестом (Метод А или В) или хромогенным кинетическим тестом (Метод D) в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины».

Норма. Не более 0,5 ЕЭ/мг ритуксимаба.

Стерильность. Испытание проводят методом мембранной фильтрации в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность».

Норма. Должен быть стерильным.

Аномальная токсичность. Испытание проводят биологическим методом в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0004.15 «Аномальная токсичность».

Норма. Должен быть нетоксичным.

Тест-доза 0,5 мл препарата (5 мг ритуксимаба) вводят мышам в хвостовую вену со скоростью 0,1 мл/с.

Специфическая активность. Испытание проводят комплемент-зависимым цитотоксическим тестом.

Норма. $0,8 \times 10^5 – 1,3 \times 10^5$ ЕД/мл.

Метод. Комплемент-зависимый цитолиз.

Принцип метода. Специфическая активность ритуксимаба основана на его способности вызывать лизис клеток клеточной линии WIL2-S в присутствии комплемента через комплемент-зависимую цитотоксичность. Клетки клеточной линии WIL2-S инкубируют совместно с кроличьим комплементом и различными разведениями стандартного образца ритуксимаба и испытуемого образца. Ритуксимаб вызывает дозозависимую цитотоксичность клеток, которая измеряется захватом и метаболизмом окислительно-восстановительного красителя Аламара синего жизнеспособными клетками. Активный компонент Аламара синего – резазурин, который способен проникать внутрь клеток, но

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

не флуоресцирует. Фермент дегидрогеназа, продуцируемая жизнеспособными клетками, восстанавливает резазурин до растворимой флуоресцирующей формы красного цвета, резоруфина, уровень которого можно измерить спектрофотометрически в относительных единицах флуоресценции (RFU). Уровень цитотоксической активности ритуксимаба измеряется по снижению флуоресценции окислительно-восстановительного красителя Аламара Синего, которое достигается за счет снижения уровня его метаболизма жизнеспособными клетками при уменьшении их числа.

Реактивы и материалы:

1. Клеточная линия WIL2-S (ATCC, кат. № CRL-8885) – линия клеток В-лимфобластов
2. Среда RPMI 1640 (Cell culture grade, Sigma-Aldrich, кат. № R-8005 (содержит 15 mM HEPES), или жидкая среда HiMedia, кат. № AL1004A (содержит 15 mM HEPES), или жидкая среда Gibco® by Thermo Fisher Scientific, кат. № 22400-071 (содержит 25 mM HEPES), или аналогичного качества)
3. Натрия гидрокарбонат (Cell culture grade, Thermo Scientific by Thermo Fisher Scientific, кат. № 28382 или аналогичного качества)
4. Фетальная бычья сыворотка (Cell culture grade, Moregate Biotech, кат. № FBSF или аналогичного качества)
5. Раствор пенициллина и стрептомицина (Cell culture grade, Gibco® by Thermo Fisher Scientific, кат. № 15140-122, кат. № 15140-148, или Sigma-Aldrich кат. № P0781, или аналогичного качества)
6. 1 M раствор HEPES (Cell culture grade, Sigma-Aldrich, кат. № H0887, или Gibco® by Thermo Fisher Scientific, кат. № 15630-080, или аналогичного качества)
7. Раствор натрия пирувата (100 mM, Cell culture grade, Sigma-Aldrich, кат. № S8636 или аналогичного качества)
8. Раствор глюкозы (200 г/л, Gibco® by Thermo Fisher Scientific, кат. № A24940-01 или аналогичного качества)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

9. Комплемент кроличий замороженный (Tissue culture grade, Cedarlane Laboratories Ltd., кат. № CL3441-S, № CL3441-S50, № CL3441-S100)
10. Раствор трипанового синего (Cell culture grade, 0,4 % м/о, Sigma-Aldrich, кат. № T8154 или аналогичного качества)
11. Аламар Синий (Cell culture grade, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, кат. № DAL1100 или аналогичного качества)
12. ДМСО (Sigma-Aldrich, кат. № D2650)
13. Натрия гидроксид (Emparta®, Merck, кат. № 1.93102 или аналогичного качества)
14. Кислота хлористоводородная концентрированная (Emplura®, Merck, кат. № 1.93401 или аналогичного качества)
15. Стерильная вода для инъекций
16. Вода, прошедшая через систему высокой очистки Milli-Q Merck, или аналогичного качества
17. 70 % раствор изопропилового спирта для дезинфекции
18. Наконечники для микропипеток от 0,1 мкл до 10 мкл, от 2 мкл до 200 мкл, от 20 мкл до 300 мкл, от 50 мкл до 1000 мкл (Eppendorf, кат. № 030 073002, кат. № 030 073061, кат. № 030 073088, кат. № 030 073100 или аналогичные)
19. Флаконы для клеточных культур (Corning, кат. № CLS430639, CLS430641U, CLS431080 или аналогичные)
20. Криогенные флаконы (Nunc, кат. № 375418 или аналогичные)
21. Стерильные центрифужные пробирки 15 мл, 50 мл (Tarson, кат. № 546021, кат. № 546041 или аналогичные)
22. Микроцентрифужные пробирки 1,5 мл, 2,0 мл (Tarson, кат. № 500010, кат. № 500020 или аналогичные)
23. Стерильные серологические пипетки (Eppendorf, кат. № 0030 127.714, кат. № 0030 127.722, кат. № 0030 127.730 или аналогичные)
24. Стерильные одноразовые фильтрующие системы Rapid-Flow Nalgene для вакуумной фильтрации: мембрана PES, размер пор 0,2 мкм (Thermo Scientific, кат. № 567-0020 или аналогичные)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

25. Стерильный глубоколуночный планшет (Greiner Bio-One, кат. № 780271 или аналогичный)
26. 96-луночный культуральный планшет (Thermo Scientific by Thermo Fisher Scientific, кат. № 167008, CellStar by Greiner Bio-One, кат. № 655180, или аналогичный)
27. Резервуар для реактивов (Thermo Scientific by Thermo Fisher Scientific, кат. № 9510027 или аналогичный)
28. Калиброванные многоканальные пипетки (Eppendorf, кат. № 4861000147 или аналогичные)
29. Калиброванные одноканальные пипетки (Eppendorf, кат. № 4861000031 или аналогичные)

Стандартный образец. Стандартный образец ритуксимаба (НД фирмы), производитель «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия.

Оборудование:

1. Мультимодовый микропланшетный ридер (Multi-mode microplate reader) (Molecular Devices, SpectraMax M3 или аналогичный) с программным обеспечением SoftMax Pro или аналогичным
2. CO_2-инкубатор (Thermo Scientific, модель CB 210 или аналогичный)
3. Гемоцитометр (Sigma-Aldrich, кат. № Z359629-1EA, или Beckman Coulter Vi-Cell XR, кат. № 731196, или аналогичный)
4. Аналитические весы (Sartorius, модель MSA225S-100-DA или аналогичные)
5. pH-метр (Mettler Toledo, Seven Excellence Multi parameter или аналогичный)
6. Холодильник (Thermo Scientific или аналогичный)
7. Бокс биологической защиты (ESCO / Telsar, CPR BSR C / S 4000 или аналогичный)
8. Магнитная мешалка (Remi laboratories, Remi 5MLH или аналогичная)
9. Центрифуга (Eppendorf 5810/5810R, кат. № 5810000017 или аналогичная)
10. Морозильная камера (жидкий азот) (Thermo Scientific, Cryo Extra 20 или аналогичная)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

11. Морозильные камеры (≤ -20 °C и ≤ -70 °C) (Thermo Scientific или аналогичные)
12. Инвертированный световой микроскоп (Nikon, модель TS-100 или TMS или аналогичный)
13. Дозатор для серологических пипеток (Eppendorf, Easypet 3 или аналогичный)
14. Водяная баня (Julabo, TW8 или аналогичная)
15. Вакуумный насос (Millipore или аналогичный)
16. Термоохлаждаемый контейнер (Thermo Scientific, Nalgene Mr. Frosty Cryo 1 °C cooler или аналогичный)

Примечания

1. В анализе используют стерильные серологические пипетки и стерильные наконечники для автоматических пипеток.
2. Перед отбором раствора серологические пипетки и наконечники для автоматических пипеток 1 – 2 раза смачивают этим раствором.

Приготовление растворов реактивов и питательных сред

Фетальная бычья сыворотка, инактивированная при нагревании. Сыворотку размораживают при температуре от 2 до 8 °C и перед инактивацией выдерживают до достижения комнатной температуры. Далее выдерживают на водяной бане при температуре (56 ± 2) °C в течение (35 ± 5) мин, периодически перемешивая вращательными движениями.

Восстановленная среда RPMI 1640. Растворяют содержимое упаковки производителя среды RPMI 1640 (с содержанием 15 mM Hepes) вместимостью 1 л в 800 мл стерильной воды для инъекций или воды Milli-Q. Перемешивают на магнитной мешалке. Прибавляют 2,2 г натрия гидрокарбоната и снова перемешивают на магнитной мешалке. Измеряют pH полученного раствора. При несоответствии значения pH интервалу 7,2 – 7,4, доводят значение pH до требуемого с помощью 1 М раствора натрия гидроксида или 1 М раствора кислоты хлористоводородной. Доводят объем полученного раствора до 1 л стерильной водой для инъекций или водой Milli-Q и перемешивают. Фильтруют в асептических условиях через

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

мембранный фильтр из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,22 мкм, используя вакуумный насос. Проверяют полученную восстановленную среду на стерильность, инкубируя 10 мл среды (флакон Т-25) в CO_2-инкубаторе минимально в течение 16 – 24 ч для определения специфической активности, и при необходимости наблюдают в течение 72 ч при температуре (37 ± 1) °С и содержании CO_2 (5 ± 0,5) %.

Срок годности восстановленной среды RPMI 1640 6 мес при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

Примечание. Жидкую среду RPMI 1640 производства Gibco или HiMedia можно использовать в качестве эквивалента вместо восстановленной среды RPMI 1640.

Среда для выращивания клеточной культуры (ростовая среда).

1. <u>При использовании восстановленной среды RPMI 1640 или жидкой среды RPMI 1640 производства HiMedia.</u> 435 мл восстановленной среды RPMI 1640 или жидкой среды RPMI 1640 производства HiMedia помещают в колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 50 мл фетальной бычьей сыворотки, инактивированной при нагревании, 5 мл раствора пенициллина и стрептомицина, 5 мл раствора натрия пирувата и 5 мл 1 М раствора HEPES, перемешивают. Полученный раствор фильтруют в асептических условиях через мембранный фильтр из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,22 мкм, используя вакуумный насос.

2. <u>При использовании жидкой среды RPMI 1640 производства Gibco.</u> 433,75 мл жидкой среды помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 50 мл фетальной бычьей сыворотки, инактивированной при нагревании, 5 мл раствора пирувата натрия, 5 мл раствора пенициллина и стрептомицина и 6,25 мл раствора глюкозы (концентрация в полученном растворе 2,5 г/л) и перемешивают. Полученный раствор фильтруют в асептических условиях через мембранный фильтр из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,22 мкм, используя вакуумный насос.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Срок годности ростовой среды 1 мес при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

Среда для анализа (среда для количественного определения).

1. При использовании восстановленной среды RPMI или жидкой среды HiMedia. 440 мл восстановленной среды RPMI 1640 или жидкой среды RPMI 1640 производства HiMedia помещают в колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 50 мл фетальной бычьей сыворотки, инактивированной при нагревании, 5 мл раствора пенициллина и стрептомицина и 5 мл 1 М раствора HEPES и перемешивают. Полученный раствор фильтруют в асептических условиях через мембранный фильтр из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,22 мкм, используя вакуумный насос.

2. При использовании жидкой среды RPMI 1640 производства Gibco. 438,75 мл жидкой среды RPMI 1640 производства Gibco помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавляют 50 мл фетальной бычьей сыворотки, инактивированной при нагревании, 5 мл раствора пенициллина и стрептомицина и 6,25 мл раствора глюкозы (концентрация в полученном растворе 2,5 г/л) и перемешивают. Полученный раствор фильтруют в асептических условиях через мембранный фильтр из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,22 мкм, используя вакуумный насос.

Срок годности среды для анализа 1 мес при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

Среда для замораживания. Смешивают ДМСО и ростовую среду в соотношении 1:9 и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Комплемент кроличий. Флакон с комплементом кроличьим замороженным хранят при температуре не выше минус 70 °С. Перед приготовлением аликвот флакон с комплементом помещают в холодильник при температуре от 2 до 8 °С до полного оттаивания. По 1,1 мл комплемента кроличьего разливают в пробирки вместимостью 1,5 мл, находящиеся на льду,

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

и немедленно помещают их в условия глубокой заморозки при температуре не выше минус 70 °С. Аликвоты необходимо использовать в течение 1 года.

Примечания

1. Для квалификации каждой новой партии комплемента кроличьего проводят анализ с использованием образца QC 100. Результаты должны соответствовать всем критериям пригодности системы.

2. При использовании альтернативного способа приготовления раствора комплемента кроличьего, указанного в разделе «Проведение анализа», допускается замораживание аликвот объемом 1 мл.

Подготовка клеточной культуры

Культивирование клеток

Клетки WIL2-S выращивают в суспензионной культуре в ростовой среде и пересевают в соответствии с документацией на клеточную линию каждые 1 – 3 дня.

Для этого флакон с рабочим банком клеток извлекают из жидкого азота, переносят в лабораторию в термоохлаждаемом контейнере (Cryo 1 °C cooler) и помещают на водяную баню при температуре 37 °С. Быстро размораживают клетки, погрузив нижнюю часть флакона в воду и постоянно перемешивая его содержимое осторожными вращательными движениями. Протирают внешнюю поверхность флакона 70 % раствором изопропилового спирта и помещают в бокс биологической защиты. С помощью стерильной серологической пипетки осторожно, по каплям переносят содержимое флакона в центрифужную пробирку вместимостью 15 или 50 мл, содержащую около 5 мл предварительно нагретой (до 37 °С на водяной бане) ростовой среды, центрифугируют при 800 об/мин в течение 5 мин, супернатант отбрасывают. Осадок ресуспендируют в 5 – 7 мл предварительно нагретой (до 37 °С на водяной бане) ростовой среды и проводят подсчет клеток.

Подсчет клеток

25 – 50 мкл однородной суспензии культуры переносят в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют равный объем раствора трипанового синего, тщательно перемешивают и немедленно

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

проводят подсчет клеток. Количество живых клеток определяют подсчетом под микроскопом в гемоцитометрической камере после окрашивания мертвых клеток трипановым синим, учитывая разведение красителем.

Количество жизнеспособных клеток в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{Q \times 4 \times N \times 10^4 \times 100}{P \times 4 \times N \times 10^4} = \frac{Q \times 100}{P},$$

где: Q – число жизнеспособных клеток на 4-х квадратах;

P – общее число клеток на 4-х квадратах;

N – фактор разведения.

Если количество жизнеспособных клеток составляет более 80 %, то клетки инкубируют в CO_2-инкубаторе в культуральных флаконах в течение 24 – 72 ч (см. таблицу ниже) при температуре (37 ± 1) °С, содержании CO_2 – (5 ± 0,5) % и относительной влажности – 95 %. Плотность клеток при посеве должна составлять:

Время инкубирования (ч)	Плотность при посеве (клеток/мл)	Объем ростовой среды* (мл)
24 ± 2	$0{,}1 \times 10^6$	50
48 ± 2	$0{,}0375 \times 10^6$	50
72 ± 2	$0{,}025 \times 10^6$	50

* Объем ростовой среды указан для флаконов Т-175.

Примечания

1. В случае недостаточного роста клеток при указанных условиях, возможно увеличить плотность при посеве до $0{,}2 \times 10^6$, $0{,}05 \times 10^6$, $0{,}03 \times 10^6$ клеток/мл при времени инкубирования 24 ± 2, 48 ± 2 и 72 ± 2 ч, соответственно.
2. Допускается 3 – 22 пересева клеток для использования в количественном определении.
3. Допускается изменять объем ростовой среды для достижения указанной плотности клеток при посеве.

Замораживание клеток

Примечание. Рекомендуется замораживать клетки в логарифмической фазе роста. Для этого, например, можно заменить ростовую среду за 24 ч до замораживания.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Перемешивают клетки в культуральном флаконе 2 – 4 раза с помощью серологической пипетки, собирают суспензию клеток в центрифужную пробирку вместимостью 15 или 50 мл.

Отбирают клетки для подсчета, подсчет проводят как указано в разделе «Подсчет клеток». Количество жизнеспособных клеток должно быть не менее 90 %. Если количество жизнеспособных клеток менее 90 %, производят еще 1 – 2 пассажа и проводят подсчет. Если после дополнительных пассажей количество жизнеспособных клеток менее 90 %, данные клетки отбрасывают и проводят культивирование клеток заново.

Центрифугируют пробирку при 1000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отбрасывают, осторожно постукивают по стенкам пробирки для отделения осажденных клеток и медленно по стенке добавляют среду для замораживания к осадку.

Доводят концентрацию клеток примерно до $1\times10^6 – 3\times10^6$ клеток/мл, перемешивают суспензию клеток 2 – 3 раза серологической пипеткой и разливают аликвоты по 1 мл клеточной суспензии в криофлаконы.

Примечание. Подсчет клеток проводят перед центрифугированием. При центрифугировании ожидаются потери, поэтому итоговое количество клеток может быть ниже целевого.

Перед замораживанием культуру клеток проверяют с помощью инвертированного микроскопа на контаминацию. При подозрении на контаминацию бактериями или грибами клетки отбрасывают.

Помещают криофлаконы в термоохлаждаемый контейнер (Cryo 1 °C cooler) и постепенно замораживают их до температуры не менее минус 70 °C в течение не менее 8 ч (при скорости охлаждения от минус 1 до минус 3 °C/мин), но не более 2 сут. Затем хранят криофлаконы в жидком азоте.

Пробоподготовка

Промежуточное разведение стандартного образца ритуксимаба (200 мкг/мл). 490 мкл среды для анализа помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл, прибавляют 10 мкл стандартного образца

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

ритуксимаба (НД фирмы) и аккуратно перемешивают, переворачивая пробирку вручную несколько раз. Маркируют пробирку как пробирка 1. Аналогичным образом готовят пробирки 2 и 3. Объединяют содержимое всех трех пробирок в пробирке вместимостью 2,0 мл и перемешивают.

Примечание. Для приготовления разведения вместо пробирок можно использовать глубоколуночный планшет.

QC 100 образец. Используют стандартный образец ритуксимаба (НД фирмы).

Промежуточное разведение QC 100 образца (200 мкг/мл). Готовят по аналогии с промежуточным разведением стандартного образца ритуксимаба.

Промежуточное разведение испытуемого образца (200 мкг/мл). 10 мкл препарата разводят в асептических условиях средой для анализа до концентрации 200 мкг/мл, аккуратно перемешивают, переворачивая пробирку вручную несколько раз. Маркируют пробирку как пробирка 1. Аналогичным образом готовят пробирки 2 и 3. Объединяют содержимое всех трех пробирок в пробирке вместимостью 2,0 мл (при необходимости используют пробирку большей вместимости) и перемешивают.

Примечание. Для приготовления разведения вместо пробирок можно использовать глубоколуночный планшет.

Разведения стандартного, QC 100 и испытуемого образцов.

Примечание. Разведения стандартного, QC 100 и испытуемого образцов в глубоколуночном планшете проводят параллельно, с использованием многоканальной автоматической пипетки.

Разведения выполняют в соответствии с таблицей 4. Для каждого разведения при внесении образцов используют новые наконечники для автоматических пипеток.

В первый вертикальный ряд лунок стерильного глубоколуночного планшета помещают по 433 мкл среды для анализа, во второй вертикальный ряд лунок помещают по 540 мкл среды для анализа, с третьего по седьмой

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

вертикальные ряды лунок помещают по 300 мкл среды для анализа, в восьмой вертикальный ряд лунок помещают по 540 мкл среды для анализа.

По 100 мкл промежуточного разведения стандартного образца ритуксимаба, промежуточного разведения QC 100 образца и промежуточного разведения испытуемого образца помещают в первые лунки первого вертикального ряда стерильного глубоколуночного планшета, содержащего среду для анализа (разведение 1).

60 мкл разведения 1 переносят во второй ряд лунок планшета и тщательно и осторожно перемешивают при помощи многоканальной автоматической пипетки 4 – 6 раз, избегая пенообразования (разведение 2).

300 мкл разведения 2 переносят в третий ряд лунок планшета и тщательно и осторожно перемешивают при помощи многоканальной автоматической пипетки 4 – 6 раз, избегая пенообразования (разведение 3).

Процедуру повторяют для 4 последующих разведений (разведения 4 – 7).

60 мкл разведения 7 переносят в восьмой ряд лунок планшета и тщательно и осторожно перемешивают при помощи многоканальной автоматической пипетки 4 – 6 раз, избегая пенообразования (разведение 8).

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Таблица 4. Приготовление разведений стандартного, QC 100 и испытуемого образцов ритуксимаба.

№ разведения	Из разведения	Концентрация ритуксимаба (мкг/мл)	Объем раствора (мкл)	Объем среды для анализа (мкл)	Кратность разведения	Концентрация ритуксимаба в лунке глубоколуночного планшета (мкг/мл)	Концентрация ритуксимаба в лунке культурального планшета (мкг/мл)
1	Промежуточн.	200	100	433	5,33	37,5	12,5
2	1	37,5	60	540	10	3,75	1,25
3	2	3,75	300	300	2	1,88	0,63
4	3	1,88	300	300	2	0,94	0,31
5	4	0,94	300	300	2	0,47	0,16
6	5	0,47	300	300	2	0,23	0,08
7	6	0,23	300	300	2	0,12	0,04
8	7	0,12	60	540	10	0,012	0,004

Проведение анализа

Примечания

1. В продолжении всего анализа среда для анализа должна находиться при комнатной температуре.

2. Для переноса разведений стандартного, QC 100 и испытуемого образцов, клеточной суспензии, раствора комплемента кроличьего и красителя Аламара Синего используют многоканальные автоматические пипетки с наконечниками объемом до 100 мкл.

В каждую лунку 96-луночного культурального планшета переносят при помощи многоканальной автоматической пипетки 50 мкл разведения стандартного, QC 100 или испытуемого образца из глубоколуночного планшета в трех повторностях в соответствии со схемой.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Схема заполнения планшета:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Стд повт.1	И1 повт.1	И2 повт.1	QC повт.1	Стд повт.2	И1 повт.2	И2 повт.2	QC повт.2	Стд повт.3	И1 повт.3	И2 повт.3	QC повт.3
A	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1	Разв. 1
B	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2	Разв. 2
C	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3	Разв. 3
D	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4	Разв. 4
E	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5	Разв. 5
F	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6	Разв. 6
G	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7	Разв. 7
H	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8	Разв. 8

Стд – разведение стандартного образца ритуксимаба
И1 – разведение испытуемого образца 1
И2 – разведение испытуемого образца 2 (Испытуемый образец 2 может добавляться при необходимости, например, при анализе на предприятии)
QC – разведение QC 100 образца

Подготовка клеточной культуры для проведения анализа. Содержимое культуральных флаконов осторожно перемешивают для получения однородной суспензии клеток. Переносят клетки из культуральных флаконов в стерильные центрифужные пробирки вместимостью 50 мл и центрифугируют в течение 5 мин при 1000 об/мин. Ростовую среду аспирируют и аккуратно ресуспендируют осадок с помощью микропипетки в 10 – 15 мл среды для анализа. Содержимое пробирок объединяют и проводят подсчет числа клеток.

Разводят суспензию клеток средой для анализа до концентрации ($1\times10^6 \pm 1\times10^5$) клеток/мл в количестве, достаточном для проведения анализа (из расчета 50 мкл на лунку), осторожно перемешивают, путем

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

переворачивания пробирки вручную 3 – 4 раза, и переносят в резервуар для реактивов.

В каждую лунку планшета прибавляют при помощи многоканальной автоматической пипетки по 50 мкл гомогенной клеточной суспензии.

Приготовление раствора комплемента кроличьего для проведения анализа. Требуемое количество пробирок с комплементом (из расчета 1 пробирка на 96-луночный планшет) извлекают из морозильной камеры и помещают в холодильник на 1 – 3 ч перед добавлением в планшет. Аликвота комплемента кроличьего должна быть полностью разморожена перед использованием.

5,0 мл среды для анализа помещают в коническую пробирку вместимостью 15 мл или резервуар для реактивов, прибавляют 1,0 мл комплемента кроличьего, осторожно перемешивают 2 – 3 раза стерильной серологической пипеткой вместимостью 10 мл и сразу прибавляют при помощи многоканальной автоматической пипетки по 50 мкл к содержимому каждой лунки планшета.

Примечания

1. Полученный раствор комплемента кроличьего не встряхивать.
2. Раствор комплемента кроличьего необходимо вносить в лунки планшета сразу (!) после внесения клеточной суспензии в лунки планшета.
3. При использовании пробирки раствор комплемента кроличьего сразу переносят в резервуар для реактивов.
4. Аликвоты кроличьего комплимента для каждого планшета разбавляют отдельно.
5. Возможно альтернативное приготовление раствора комплемента кроличьего. Для этого аликвоту комплемента кроличьего помещают в холодильник для размораживания в течение ~1 ч. При этом часть комплемента остается не размороженной. 5,0 мл среды для анализа помещают в резервуар для реактивов. 300 – 500 мкл среды для анализа отбирают из резервуара и вносят в пробирку с комплементом, отбирают образовавшийся раствор из пробирки и вносят в резервуар со средой для анализа, данные действия повторяют до тех пор, пока весь комплемент не будет полностью разморожен и перенесен в резервуар. Далее содержимое резервуара перемешивают, осторожно покачивая резервуар в горизонтальном направлении (действие выполняют вручную).

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Инкубируют планшет в течение 2 ч ± 15 мин в CO_2-инкубаторе при температуре (37 ± 1) °С, содержании CO_2 – (5 ± 0,5) % и относительной влажности – 95 %.

После помещения культурального планшета в инкубатор, краситель Аламар Синий помещают в коническую пробирку вместимостью 15 мл из расчета 3 мл красителя на 1 планшет и помещают пробирку в инкубатор для достижения той же температуры.

Примечание. Поскольку Аламар Синий чувствителен к свету, следует избегать прямого его воздействия. Во время добавления реагента в боксе биологической защиты должен быть выключен свет.

После окончания инкубирования краситель Аламар Синий и культуральный планшет достают из инкубатора. Аламар Синий переносят в резервуар для реактивов и аккуратно перемешивают. Далее прибавляют по 25 мкл красителя в каждую лунку культурального планшета в том же порядке, что и при добавлении раствора комплемента кроличьего.

Инкубируют планшет в течение (18 ± 2) ч в CO_2-инкубаторе при температуре (37 ± 1) °С, содержании CO_2 – (5 ± 0,5) % и относительной влажности – 95 %.

По окончании инкубирования достают планшет и оставляют при комнатной температуре на 7 – 10 мин, затем оценивают флуоресценцию в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ) при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны эмиссии 590 нм, используя Мультимодовый микропланшетный ридер Spectra Max M3 или аналогичный (считывание с верха лунок).

Учет результатов

Для обработки полученных данных используют программное обеспечение SoftMax Pro или аналогичное.

Анализ выбросов проводят, применяя статистический метод (медиана распределения). Значение флуоресценции < (M – N) или > (M + N) считается выбросом (M – медиана, N = M × 0,3). Для трех повторностей не более одного

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

значения может быть удалено как выброс. На планшет в рамках одного анализа возможно удаление не более 8 выбросов.

Рассчитывают относительное стандартное отклонение (CV) значения флуоресценции для трех повторностей каждого разведения стандартного образца ритуксимаба, QC 100 образца и испытуемого образца. CV должно быть не более 20 % не менее чем для шести разведений из восьми для каждого образца.

Строят 4-х параметрическую логистическую кривую зависимости концентрации от относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) и применяют четырехпараметрический метод анализа *S*-образных кривых. Последовательно оценивают параметры A верхняя асимптота (максимальный ответ), B коэффициент наклона, D нижняя асимптота (минимальный ответ) для разведений стандартного образца ритуксимаба, QC 100 образца и испытуемого образца.

Дальнейшую оценку пригодности системы для анализа проводят поэтапно.

Критерии пригодности системы.

Для разведений стандартного образца ритуксимаба должны выполняться следующие требования пригодности системы:

1	$A_{Стд} - D_{Стд}$	≥ 5000 ОЕФ
2	$B_{Стд}$	0,6 – 1,5

Значения $A_{Стд}$, $D_{Стд}$ и $B_{Стд}$ получают из модели без ограничений (Unrestricted Model) 4-х параметрической логистической кривой.

Для разведений QC 100 образца должны выполняться следующие требования пригодности системы:

1	Соотношение $[A_{QC100} / A_{Стд}]$	0,85 – 1,15
2	Соотношение $[(A_{QC100} - D_{QC100}) / (A_{Стд} - D_{Стд})]$	0,85 – 1,15
3	B_{QC100}	0,6 – 1,5
4	Соотношение $[B_{QC100} / B_{Стд}]$	0,70 – 1,30

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Вычисляют относительную активность QC 100 образца, используя модель с ограничениями (Restricted Model) в программном обеспечении SoftMax Pro или аналогичном.

5	Относительная активность QC 100	0,75 – 1,25

Примечание. Если требования пригодности системы не выполняются, анализ повторяют заново.

Критерии приемлемости результатов испытания.

Для разведений испытуемого образца должны выполняться следующие требования приемлемости результатов испытания:

1	Соотношение [$A_{Исп}$ / $A_{Стд}$]	0,85 – 1,15
2	Соотношение [($A_{Исп}$ – $D_{Исп}$) / ($A_{Стд}$ – $D_{Стд}$)]	0,85 – 1,15
3	$B_{Исп}$	0,6 – 1,5
4	Соотношение [$B_{Исп}$ / $B_{Стд}$]	0,70 – 1,30

Примечание. Если требования приемлемости результатов испытания не выполняются, анализ повторяют заново.

Расчет отчетного значения.

Для каждого испытуемого образца проводят по три независимых определения, повторяя процедуру с этапа приготовления разведений стандартного, QC 100 и испытуемого образцов.

Примечание. Допускается постановка всех трех независимых определений:

1. Разными аналитиками в один день.
2. Минимум двумя аналитиками (по одному анализу на человека) в минимум два разных дня.
3. Одним аналитиком в разные дни.

С помощью программы статистической обработки вычисляют относительную активность испытуемого образца (безразмерная величина) для каждой независимой повторности.

Рассчитывают среднее арифметическое значение относительной активности испытуемого образца, а также коэффициент вариации значений

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

относительной активности испытуемого образца для трех независимых повторностей. Результаты анализа считаются достоверными, если CV относительной активности испытуемого образца для трех независимых повторностей анализа составляет не более 20 %.

Примечание. Если CV относительной активности препарата составляет более 20 %, то проводят процедуру выявления выброса в результатах трех независимых повторностей анализа и заново воспроизводят одну повторность. В случае, если выброс не выявлен, воспроизводят заново все три повторности анализа.

Рассчитывают специфическую активность испытуемого образца в ЕД/мл ритуксимаба (P) следующим образом:

$$P = p \times P_{\text{Стд.}},$$

где: p – величина относительной активности испытуемого образца, безразмерная величина;

$P_{\text{Стд.}}$ – активность стандартного образца ритуксимаба, указанная в сертификате анализа на использованный в испытании стандартный образец ритуксимаба, в ЕД/мл.

Количественное определение ритуксимаба. Испытание проводят методом УФ-спектрофотометрии.

Норма. 9,0 – 11,0 мг/мл.

Реактивы:

Плацебо-раствор препарата (НД фирмы), производитель «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия или АО «Р-Фарм», Россия.

Стандартный образец. Стандартный образец ритуксимаба (НД фирмы), производитель «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия.

Испытуемый раствор. 100 мкл препарата помещают в пробирку вместимостью 5 мл, прибавляют 1,9 мл плацебо-раствора препарата, используя автоматическую пипетку с наконечником до 1000 мкл, и перемешивают.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Примечание. Фактор разведения может быть изменен при условии, что значение оптической плотности находится в интервале 0,2 – 0,9.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца ритуксимаба. 100 мкл размороженного при 2 – 8 °С стандартного образца ритуксимаба (НД фирмы) помещают в пробирку вместимостью 5 мл, прибавляют 1,9 мл плацебо-раствора препарата, используя автоматическую пипетку с наконечником до 1000 мкл, и перемешивают.

Примечание. Фактор разведения может быть изменен при условии, что значение оптической плотности находится в интервале 0,2 – 0,9.

Раствор используют свежеприготовленным.

Условия анализа. Измерение оптической плотности проводят на УФ-спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 280 нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм.

Измеряют оптическую плотность трех проб раствора стандартного образца ритуксимаба, используя в качестве раствора сравнения плацебо-раствор препарата. Оптическая плотность раствора стандартного образца ритуксимаба должна лежать в интервале 0,2 – 0,9.

Примечание. При несоответствии оптической плотности указанному интервалу раствор стандартного образца ритуксимаба готовят заново.

Система считается пригодной, если для раствора стандартного образца ритуксимаба выполняются следующие условия:

относительное стандартное отклонение оптической плотности для трех проб составляет не более 5 %;

концентрация ритуксимаба, рассчитанная по средней оптической плотности трех проб, составляет 90 % – 110 % от значения содержания белка в стандартном образце ритуксимаба в соответствии с сертификатом его анализа.

Измеряют оптическую плотность трех проб испытуемого раствора, используя в качестве раствора сравнения плацебо-раствор препарата.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Оптическая плотность испытуемого раствора должна лежать в интервале 0,2 – 0,9.

Примечание. При несоответствии оптической плотности указанному интервалу испытуемый раствор готовят заново.

Результаты анализа считаются достоверными, если относительное стандартное отклонение оптической плотности для трех проб испытуемого раствора составляет не более 5 %.

Учет результатов

Концентрацию ритуксимаба в мг/мл (*C*) в испытуемом препарате и в стандартном образце ритуксимаба вычисляют по формуле:

$$C = \frac{A \times 50}{1{,}62},$$

где: *A* – средняя оптическая плотность трех проб испытуемого раствора;

50 – коэффициент, учитывающий разведение;

1,62 – коэффициент экстинкции ритуксимаба.

Количественное определение полисорбата 80. Испытание проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Норма. 0,049 – 0,091 %.

Реактивы:

Ацетонитрил (для ВЭЖХ, J.T. Baker, кат. № 9829 или аналогичного качества)

Трифторуксусная кислота (Molecular biology grade, Sigma Aldrich, кат. № 299537 или аналогичного качества)

Полисорбат 80 (Emprove grade, Merck, кат. № 817061 или аналогичного качества)

Смола MabSelect (GE Healthcare Life Sciences, кат. № 17-5199-01)

Изопропанол (для ВЭЖХ, Merck кат. № 1010401000 или аналогичного качества)

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Вода, прошедшая через систему высокой очистки Milli-Q Merck, или аналогичного качества

Плацебо-раствор препарата (НД фирмы), производитель «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», Индия или АО «Р-Фарм», Россия.

Оборудование. Шейкер (Gel Rocker (Bangalore Genei) или аналогичный).

Подвижная фаза (ПФ). 800 мл ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 1 мл трифторуксусной кислоты, перемешивают и доводят объем раствора в колбе водой до метки. Переносят раствор в колбу из дюранового стекла вместимостью 1 л, перемешивают и дегазируют в ультразвуковой водяной бане в течение 10 мин.

Срок годности подвижной фазы 7 сут при хранении при комнатной температуре.

80 % раствор ацетонитрила. 800 мл ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора в колбе водой до метки. Переносят раствор в колбу из дюранового стекла вместимостью 1 л, перемешивают и дегазируют в ультразвуковой водяной бане в течение 10 мин.

Срок годности раствора 7 сут при хранении при комнатной температуре.

Исходный стандартный раствор. 2,0 г полисорбата 80 помещают при помощи пипетки с широким носиком в мерную колбу вместимостью 100 мл, избегая попадания раствора на стенки колбы, растворяют в 90 мл воды, добавляя ее по каплям по стенке колбы и осторожно перемешивая до растворения. Оставляют на ночь для оседания пены. После оседания пены доводят объем раствора в колбе водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартные растворы. Исходный стандартный раствор с концентрацией 20 мг/мл подвергают серии последовательных разведений с целью получения стандартных растворов в соответствии с таблицей 5.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Таблица 5. Приготовление стандартных растворов.

№ стандартного раствора	Объем стандартного раствора, мкл	Объем растворителя (вода), мкл	Конечный объем, мкл	Конечная концентрация, мг/мл	Объем пробы, мкл	Количество полисорбата 80 в пробе, мкг
Исходный	н/п*	н/п	н/п	20	н/п	н/п
Раствор 1	500 (исходного)	9500	10000	1	100	100
Раствор 2	900 (раствора 1)	100	1000	0,9	100	90
Раствор 3	4000 (раствора 1)	1000	5000	0,8	100	80
Раствор 4	700 (раствора 1)	300	1000	0,7	100	70
Раствор 5	750 (раствора 3)	250	1000	0,6	100	60
Раствор 6	1000 (раствора 3)	1000	2000	0,4	100	40
Раствор 7	500 (раствора 6)	500	1000	0,2	100	20

*н/п – не применимо

Испытуемый раствор. 500 мкл селективной к моноклональным антителам смолы MabSelect помещают в микроцентрифужную пробирку вместимостью 2 мл, центрифугируют при 20000 × g в течение 5 мин, супернатант отбрасывают.

Прибавляют 1,5 мл плацебо-раствора препарата, перемешивают содержимое на шейкере при 8 – 10 об/мин в течение 3 – 4 мин, центрифугируют при 20000 × g в течение 5 мин. Супернатант отбрасывают.

Прибавляют 500 мкл препарата, перемешивают содержимое на шейкере при 8 – 10 об/мин в течение 15 мин, центрифугируют при 20000 × g в течение 5 мин, супернатант отбирают и используют для ВЭЖХ-анализа.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Хроматографические условия

Прибор	Waters Alliance HPLC system или аналогичный, оборудованный диодно-матричным спектрофотометрическим детектором (PDA-детектор) или спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны (УФ-детектор)
Программное обеспечение	Empower или аналогичное
Колонка	250 мм × 4,6 мм, 5 мкм, 130 Å, XBridge C18, (Waters, кат. № 186003117)
ПФ	80 % раствор ацетонитрила, содержащий 0,1 % трифторуксусной кислоты
Скорость потока	1,0 мл/мин
Градиент	Изократический
Температура колонки	(25 ± 2) °С
Температура образцов	(5 ± 3) °С
Детектор	PDA или УФ, 235 нм
Объем пробы	100 мкл
Размер петли	100 мкл
Время хроматографирования	30 мин

<u>При использовании новой колонки</u> проводят ее инициализацию подвижной фазой в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл/мин.

Уравновешивают колонку подвижной фазой в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл/мин.

В хроматограф вводят 100 мкл воды.

Примечания

<u>При использовании новой колонки:</u>

1. В хроматограф вводят 100 мкл воды. Если базовая линия не стабильна, процедуру повторяют до ее стабилизации.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

2. В хроматограф вводят 100 мкл стандартного раствора 4 до получения трех последовательных инжекций, соответствующих критериям пригодности системы.

В хроматограф вводят 3 раза по 100 мкл стандартного раствора 4, регистрируют хроматограммы и определяют время удерживания и площадь пика 1 полисорбата 80. Пики интегрируют по базовой линии от начала пика 1 до конца пика 3, опуская перпендикуляры к базовой линии для разделения пиков 1, 2 и 3. Данный тип интегрирования применяют при проверке пригодности хроматографической системы в начале и конце анализа. При несоответствии критериям пригодности колонку промывают 80 % раствором ацетонитрила в течение 42 мин при скорости потока 1,0 мл/мин и повторяют процедуру.

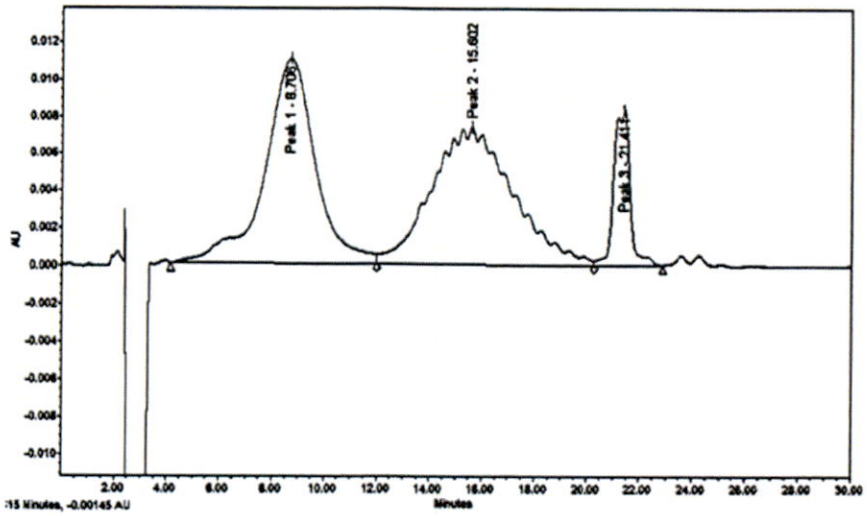

Рис 34. Типичная хроматограмма стандартного раствора 4 (в масштабе полной шкалы) при проверке пригодности хроматографической системы в начале и в конце анализа с указанием разметки пиков при интегрировании

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

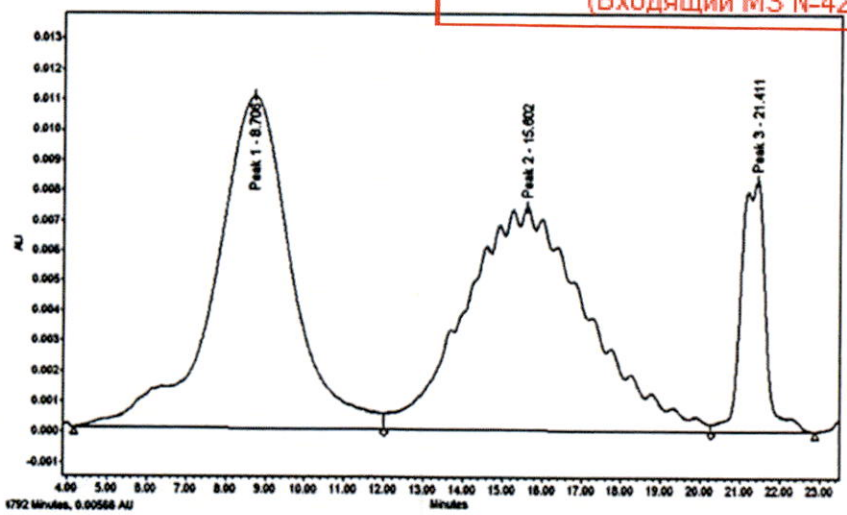

Рис 35. Типичная хроматограмма стандартного раствора 4 (в увеличенном масштабе) при проверке пригодности хроматографической системы в начале и в конце анализа с указанием разметки пиков при интегрировании

Хроматографическая система считается пригодной, если:

относительное стандартное отклонение времени удерживания пика 1 полисорбата 80 для 3-х повторных инжекций на хроматограммах стандартного раствора 4 не более 2 %;

относительное стандартное отклонение площади пика 1 полисорбата 80 для 3-х повторных инжекций на хроматограммах стандартного раствора 4 не более 10 %;

эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику 1 полисорбата 80, не менее 100 теоретических тарелок;

фактор асимметрии пика 1 полисорбата 80 не более 1,3.

В хроматограф вводят 3 раза по 100 мкл стандартных растворов 1 – 7. Регистрируют хроматограммы и определяют суммарную площадь пиков 1 – 3 полисорбата 80. Пики интегрируют суммарно: по базовой линии от начала пика 1 до конца пика 3.

Примечание. При невозможности суммарного интегрирования всех трех пиков пики интегрируют по отдельности от начала к концу пика и для вычислений используют суммарную площадь пиков.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Строят график зависимости суммарной площади пиков от введенного в хроматограф количества полисорбата 80 (20 – 100 мкг). Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99.

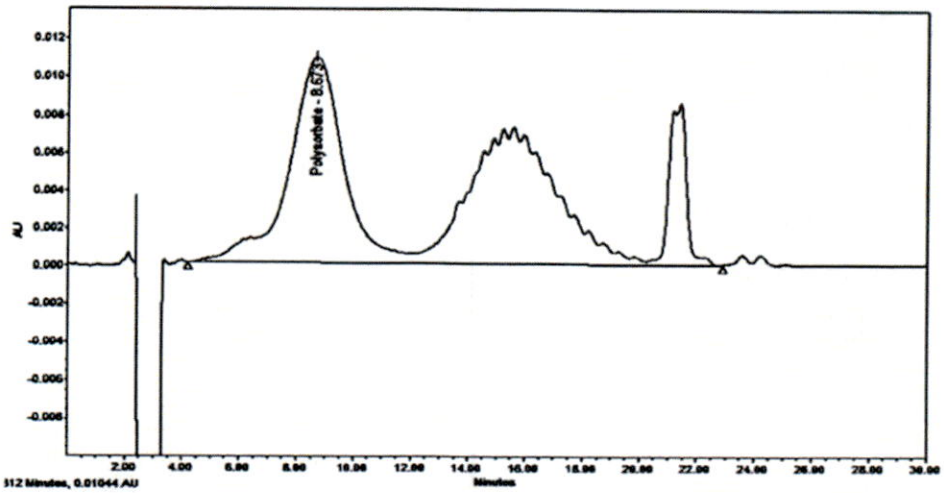

Рис 36. Типичная хроматограмма калибровочного раствора (стандартный раствор 4) (в масштабе полной шкалы) с указанием разметки пиков при интегрировании

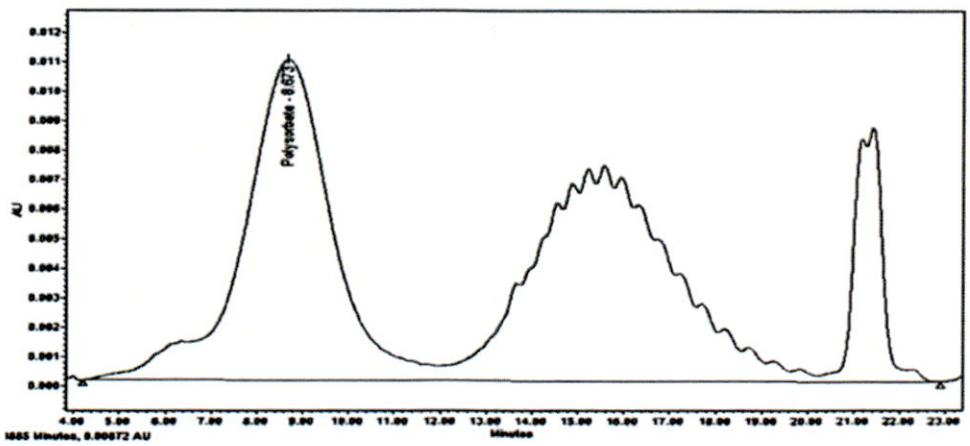

Рис 37. Типичная хроматограмма калибровочного раствора (стандартный раствор 4) (в увеличенном масштабе) с указанием разметки пиков при интегрировании

В хроматограф вводят 2 раза по 100 мкл испытуемого раствора, регистрируют хроматограммы и определяют суммарную площадь пиков 1 – 3

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

полисорбата 80. Пики интегрируют суммарно: по базовой линии от начала пика 1 до конца пика 3.

Примечание. При невозможности суммарного интегрирования всех трех пиков пики интегрируют по отдельности от начала к концу пика и для вычислений используют суммарную площадь пиков.

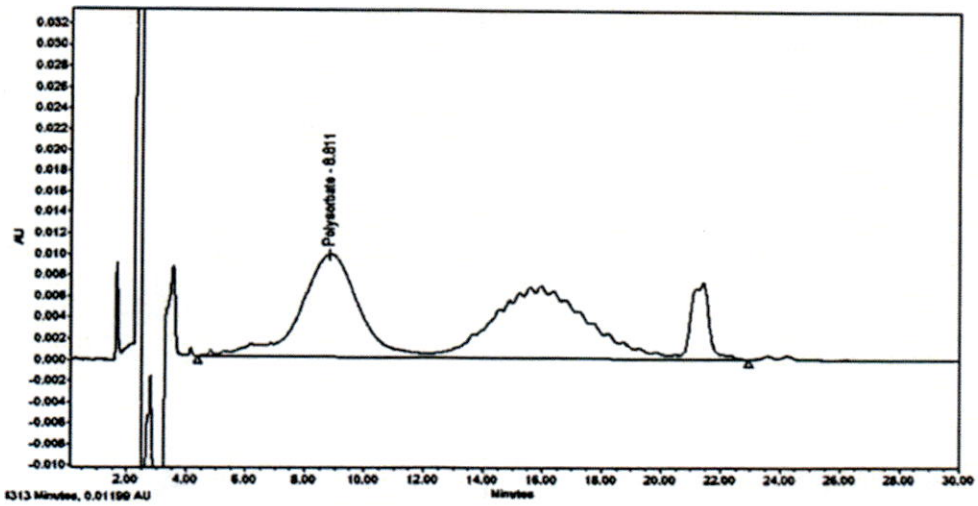

Рис. 38. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в масштабе полной шкалы) с указанием разметки пиков при интегрировании

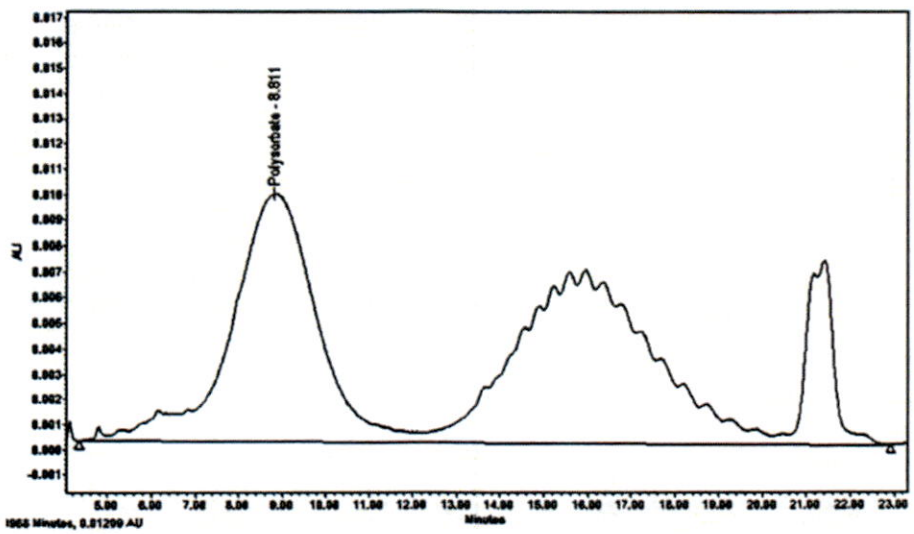

Рис. 39. Типичная хроматограмма испытуемого раствора (в увеличенном масштабе) с указанием разметки пиков при интегрировании

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

После окончания измерений в хроматограф вводят 2 раза по 100 мкл стандартного раствора 4, регистрируют хроматограммы и определяют площадь и время удерживания пика 1 полисорбата 80.

Примечание. Стандартный раствор 4 вводят 2 раза в конце цикла измерений и, при необходимости анализа нескольких образцов подряд, после каждых шести образцов.

Результаты анализа считаются достоверными, если соблюдаются следующие критерии:

относительное стандартное отклонение времени удерживания пика 1 полисорбата 80 на хроматограммах стандартного раствора 4 при проверке пригодности хроматографической системы, рассчитанное по всей последовательности, должно быть не более 5 %;

относительное стандартное отклонение площади пика 1 полисорбата 80 на хроматограммах стандартного раствора 4 при проверке пригодности хроматографической системы, рассчитанное по всей последовательности, должно быть не более 10 %.

Промывают колонку ацетонитрилом в течение 20 – 25 мин при скорости потока 1,0 мл/мин.

Колонку заполняют подвижной фазой или 80 % раствором ацетонитрила и хранят плотно закрытой с обоих концов.

Учет результатов

Используют программное обеспечение Empower или аналогичное.

Содержание полисорбата 80 в процентах (Y) вычисляют по формуле:

$$Y = \frac{(S - b)}{k \times 1000},$$

где: S – суммарная площадь пиков полисорбата 80 на хроматограмме испытуемого раствора;

k – тангенс угла наклона;

b – отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат.

За результат анализа принимают среднее значение из двух вычислений.

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

Упаковка

По 10 мл или 50 мл препарата во флаконы из бесцветного стекла класса 1 (USP), укупоренные резиновыми пробками, обжатые алюминиевыми колпачками с предохранительными пластиковыми крышечками. По 1 флакону вместе с инструкцией по применению в пачку картонную. В случае упаковки фирмой «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.» пачку картонную упаковывают в прозрачный пакет из полиэтилена низкой плотности.

Упаковка «in bulk»: По 63 флакона с препаратом (по 10 мл) или по 30 флаконов с препаратом (по 50 мл) помещают в картонную коробку с картонными решетками. Картонные коробки упаковывают в прозрачные пакеты из полиэтилена низкой плотности и помещают в картонный короб.

Картонные короба помещают в транспортную упаковку с хладоэлементами.

Маркировка

На первичной упаковке (на этикетке флакона) на русском языке указывают: торговое наименование препарата с предупредительной маркировкой ®, дозировку, международное непатентованное наименование, лекарственную форму, концентрацию, объем содержимого флакона, надпись «Рекомбинантные моноклональные антитела», состав препарата, условия хранения, предупредительные надписи («Хранить в недоступном для детей месте.», «Перед использованием препарата ознакомьтесь с прилагаемой инструкцией по применению.», «Препарат предназначен для применения в стационаре специалистом»), надпись «Стерильно.», номер производственной лицензии («M.L. №»), номер серии, дату производства, «Годен до (вкл)», наименование и адрес фирмы-производителя, ее товарный знак (латиницей), технологические или производственные отметки (при необходимости).

В случае производства препарата АО «Р-Фарм»

На первичной упаковке (на этикетке флакона) на русском языке указывают: торговое наименование препарата с предупредительной маркировкой ®, дозировку, международное непатентованное наименование,

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

лекарственную форму, концентрацию, объем содержимого флакона, надпись «Рекомбинантные моноклональные антитела», состав препарата, условия хранения, предупредительные надписи («Хранить в недоступном для детей месте.», «Перед использованием препарата ознакомьтесь с прилагаемой инструкцией по применению.», «Препарат предназначен для применения в стационаре специалистом»), надпись «Стерильно.», номер серии, дату производства, «Годен до (вкл)», наименование и страну фирмы-владельца РУ, ее товарный знак (латиницей), наименование и страну компании, осуществляющей производство препарата, ее товарный знак.

На вторичной упаковке (на картонной пачке) на русском языке указывают: торговое наименование препарата с предупредительной маркировкой ®, дозировку, международное непатентованное наименование, лекарственную форму, концентрацию, объем содержимого флакона, надпись «Рекомбинантные моноклональные антитела», состав препарата, условия хранения, предупредительные надписи («Хранить в недоступном для детей месте.», «Перед использованием препарата ознакомьтесь с прилагаемой инструкцией по применению.», «Применять по назначению врача.», «Препарат предназначен для применения в стационаре специалистом»), условия отпуска из аптек, способ введения, надпись «Стерильно.», надпись «® - зарегистрированный товарный знак.», номер свидетельства о регистрации товарного знака, регистрационный номер, номер производственной лицензии («M.L. №»), глобальный идентификационный номер торговой единицы («GTIN №»), наименование и адрес фирмы-производителя, ее товарный знак (латиницей), штрих-код, номер серии, дату производства, «Годен до (вкл)», штрих-код в формате DataMatrix и его расшифровку.

Дополнительно *на вторичной упаковке (на картонной пачке) на английском языке* указывают: торговое наименование препарата, дозировку, международное непатентованное наименование, лекарственную форму,

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

концентрацию, объем содержимого флакона, микротекст «REDDITUX100» / «REDDITUX500».

<u>В случае упаковки / выпускающего контроля качества АО «Р-Фарм»</u>

На вторичной упаковке (на картонной пачке) на русском языке указывают: торговое наименование препарата с предупредительной маркировкой ®, дозировку, международное непатентованное наименование, лекарственную форму, концентрацию, объем содержимого флакона, надпись «Рекомбинантные моноклональные антитела», состав препарата, условия хранения, предупредительные надписи («Хранить в недоступном для детей месте.», «Перед использованием препарата ознакомьтесь с прилагаемой инструкцией по применению.», «Применять по назначению врача.», «Препарат предназначен для применения в стационаре специалистом»), условия отпуска из аптек, способ введения, надпись «Стерильно.», надпись «® - зарегистрированный товарный знак.», номер свидетельства о регистрации товарного знака, регистрационный номер, наименование и страну фирмы производителя, ее товарный знак (латиницей), наименование и страну компании, осуществляющей упаковку и выпускающий контроль качества препарата, ее товарный знак, штрих-код, внутренний заводской код, штрих-код в формате DataMatrix, глобальный идентификационный номер торговой единицы («Код продукта»), номер серии, дату производства, «Годен до (вкл)», индивидуальный серийный номер вторичной (потребительской) упаковки («Уникальный код»).

Дополнительно *на вторичной упаковке (на картонной пачке) на английском языке* указывают: торговое наименование препарата, дозировку, международное непатентованное наименование, лекарственную форму, концентрацию, объем содержимого флакона, микротекст «REDDITUX100» / «REDDITUX500».

<u>В случае производства препарата АО «Р-Фарм»</u>

На вторичной упаковке (на картонной пачке) на русском языке указывают: торговое наименование препарата с предупредительной

СООТВЕТСТВУЕТ ЭКСПЕРТНОМУ ОТЧЕТУ
от 04.05.2023 № 8509
(Входящий МЗ №4239698)

маркировкой ®, дозировку, международное непатентованное наименование, лекарственную форму, концентрацию, объем содержимого флакона, надпись «Рекомбинантные моноклональные антитела», состав препарата, условия хранения, предупредительные надписи («Хранить в недоступном для детей месте.», «Перед использованием препарата ознакомьтесь с прилагаемой инструкцией по применению.», «Применять по назначению врача.», «Препарат предназначен для применения в стационаре специалистом»), условия отпуска из аптек, способ введения, надпись «Стерильно.», надпись «® - зарегистрированный товарный знак.», номер свидетельства о регистрации товарного знака, регистрационный номер, наименование и страну фирмы владельца РУ, ее товарный знак (латиницей), наименование и страну компании, осуществляющей производство препарата, ее товарный знак, штрих-код, внутренний заводской код, штрих-код в формате DataMatrix, глобальный идентификационный номер торговой единицы («Код продукта»), номер серии, дату производства, «Годен до (вкл)», индивидуальный серийный номер вторичной (потребительской) упаковки («Уникальный код»).

Дополнительно *на вторичной упаковке (на картонной пачке) на английском языке* указывают: торговое наименование препарата, дозировку, международное непатентованное наименование, лекарственную форму, концентрацию, объем содержимого флакона, микротекст «REDDITUX100» / «REDDITUX500».

Транспортирование. При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать.

Хранение. При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать.

Срок годности. 3 года.

Руководитель отдела регистрации
Представительства

Представительство фирмы «Др Редди'с Лабораторис Лтд.» (Индия) * г.Москва * Dr.Reddy's

Г.А. Титова

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Рахмановский пер., 3, г. Москва, ГСП-4, 127994
тел.: 628-44-53, факс: 628-50-58

Представительство фирмы "Д-р Редди'с Лабораторис Лтд"

115035, г. Москва,
наб. Овчинниковская, д. 20, стр. 1

10.05.2023 № 25-6-4239698/ИД/ИЗМ

Решение о внесении изменений в документы, содержащиеся в регистрационном досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения

Министерством здравоохранения Российской Федерации в соответствии со статьей 30 Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и на основании представленного заявления № 159181 (вх. № 4239698 от 17.01.2023) и документов по результатам проведенных экспертиз принято решение о внесении изменений в документы, содержащиеся в регистрационном досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения:

Реддитукс®

(торговое наименование лекарственного средства)

Ритуксимаб

(международное непатентованное, или группировочное, или химическое наименование лекарственного средства)

концентрат для приготовления раствора для инфузий, 10 мг/мл

(лекарственная форма, дозировка)

Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия
Survey No. 47, Bachupally Village, Bachupally Mandal,
Medchal-Malkajgiri District, Telangana - 500 090, India
Акционерное общество "Р-Фарм" (АО "Р-Фарм"), Россия
Ярославская обл., г.о. г. Ярославль, г. Ярославль, ул. Громова, д. 15

(наименование и адрес места осуществления производства)

ЛП-003584 от 25.04.2016

(номер регистрационного удостоверения, дата регистрации)

Д-р Редди'с Лабораторис Лтд., Индия
8-2-337, Road № 3, Banjara Hills, Hyderabad, Telangana - 500034, India

(наименование держателя или владельца регистрационного удостоверения лекарственного препарата)

ЛП-003584-100523

(нормативная документация)

В соответствии с принятым решением в регистрационное досье вносятся изменения.

Директор Департамента
регулирования обращения
лекарственных средств и
медицинских изделий

Е.М. Астапенко

А.С. Рябкова
(495) 627-24-00 (2037)