|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Инсулин растворимый[человеческий генно-инженерный]** |  | **ФС** |
| **Инсулин растворимый[человеческий генно-инженерный]** |  |  |
| **Insulinum humanum** |  | **Взамен ВФС 42-2128-92** |

|  |
| --- |
| Инсулин (человеческий) |



|  |  |
| --- | --- |
| C257H383N65O77S6 | М.м. 5808 |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию инсулина растворимого [человеческого генно-инженерного], представляющую собой рекомбинантный инсулин, идентичный природному гормону, вырабатываемому в поджелудочной железе человека β-клетками островков Лангерганса.

Инсулин человеческий представляет собой полипептид, состоящий из 51 аминокислоты, которые образуют две полипептидные цепи, соединённые дисульфидными мостиками, необходимыми для проявления гормональной активности.

За 1 международную единицу (МЕ) инсулина принимают биологическую активность 0,0347 мг стандартного образца инсулина человека.

Содержит не менее 95,0 % и не более 105,0 % инсулина человеческого C257H383N65O77S6 и A21-дезамидоинсулина (человеческого) в пересчете на сухое вещество.

ПРОИЗВОДСТВО

Инсулин растворимый [человеческий генно-инженерный] получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК с применением генетически стабильных штаммов продуцентов.

Технологический процесс производства субстанции рекомбинантного инсулина осуществляют путем культивирования генно-инженерных штаммов, отделения биомассы, выделения и очистки рекомбинантного белка. Из полученного биотехнологическим способом промежуточного продукта реконструируют активную форму инсулина человека с последующей его хроматографической очисткой и сушкой.

Штаммы-продуценты. Производственные генно-инженерные штаммы должны быть депонированы в официальных коллекциях.

Производство субстанции должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК» и ОФС «Генно-инженерные препараты инсулина человека».

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Порошок белого или почти белого цвета.

**Растворимость.** Практически нерастворим в воде и спирте 96 %, мало растворим в натрия гидроксида растворе 0,01 М и хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М.

**Подлинность**

*1. ВЭЖХ.* Время удерживания пика инсулина человеческого на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика инсулина человеческого на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) (раздел «Количественное определение»).

*2. Метод пептидного картирования* (ОФС «Пептидное картирование») в сочетании с методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Определение проводят методом пептидного картирования продуктов ферментативного гидролиза испытуемого раствора эндопротеиназой Glu-C из *S. aureus* V8, тип XVII-B в сравнении с раствором стандартного образца инсулина человеческого.

Срок годности растворов 48 ч при температуре от 2 до 8 °С.

*Подвижная фаза A (ПФА).* Ацетонитрил—сульфатный буферный раствор рН 2,0—вода 100:200:700.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Сульфатный буферный раствор рН 2,0—вода—ацетонитрил 200:400:400.

*Раствор фермента.* Содержимое флакона эндопротеиназы Glu-C из *S. aureus* V8, тип XVII-B растворяют в воде до получения концентрации фермента 500 МЕ/мл. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М с концентрацией инсулина человеческого 2,0 мг/мл.

*Раствор стандартного образца инсулина человеческого*. Готовят раствор стандартного образца инсулина человеческого в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М с концентрацией инсулина человеческого 2,0 мг/мл.

*Получение гидролизатов.* Помещают по 0,5 мл испытуемого раствора и раствора стандартного образца инсулина человеческого в две чистые пробирки по отдельности, прибавляют по 2,0 мл буферного (HEPES) раствора рН 7,5 и по 0,4 мл раствора фермента. Закрывают пробирки и термостатируют при температуре 25 °C в течение 6 ч. К каждому полученному раствору прибавляют по 2,9 мл сульфатного буферного раствора pH 2,0.

*Контрольный раствор.* К 0,25 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М прибавляют 1,0 мл буферного (HEPES) раствора рН 7,5 и 0,2 мл раствора фермента. Полученный раствор термостатируют при температуре 25 °C в течение 6 ч и прибавляют 1,45 мл сульфатного буферного раствора pH 2,0.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 100×4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии с размером пор 8 нм, 3 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 50 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-60 | 90 → 30 | 10 → 70 |
| 60-65 | 30 → 0 | 70 → 100 |
| 65-70 | 0 | 100 |

Приводят колонку в состояние равновесия при исходных условиях в течение не менее 15 мин.

Хроматографируют контрольный раствор, гидролизат раствора стандартного образца инсулина человеческого и гидролизат испытуемого раствора.

*Идентификация пиков.* Для идентификации пиков, соответствующих фрагментам I, II и III используют хроматограммы гидролизата раствора стандартного образца инсулина человеческого и прилагаемую к стандартному образцу инсулина человеческого.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме гидролизата раствора стандартного образца инсулина человеческого:

– *разрешение* (*RS*) между пиками фрагментов II и III должно быть не менее 3,4;

– *фактор асимметрии пиков* (*AS*) фрагментов II и III должен быть не более 1,5.

Хроматографический профиль гидролизата испытуемого раствора должен соответствовать хроматографическому профилю гидролизата раствора стандартного образца инсулина гларгина по временам удерживания пиков фрагментов I, II и III и отношениям высот пиков фрагментов III, II к высоте пика фрагмента I.

Не учитывают пики контрольного раствора.

**Прозрачность раствора.** Раствор 50 мг субстанции в 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном Y7 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**Проинсулиноподобная иммунореактивность.** Определение проводят методом иммуноферментного анализа в соответствии с ОФС «Метод иммуноферментного анализа», используют готовые наборы реагентов.

**Одноцепочечный предшественник.** Контроль содержания одноцепочечного предшественника проводят подходящим валидированным методом.

**Остаточные белки клетки-хозяина.** В соответствии с ОФС «Определение остаточных белков клетки-хозяина».

**Остаточная ДНК штамма-продуцента и плазмидная ДНК.** В соответствии с ОФС «Определение остаточной ДНК».

**Примеси с молекулярной массой, превышающей молекулярную массу инсулина.** Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии в соответствии с ОФС «Эксклюзионная хроматография».

Срок годности растворов 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

*Подвижная фаза (ПФ).* Растворяют 0,65 г L-аргинина в 650 мл воды, прибавляют 150 мл уксусной кислоты ледяной, 200 мл ацетонитрила, перемешивают и фильтруют.

*Растворитель.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 40,0 мг субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Образец субстанции инсулина человеческого хранят не менее 10 дней при комнатной температуре. Эта процедура позволяет получить образец, содержащий не менее 0,4 % высокомолекулярных белков. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 40,0 мг полученного образца инсулина человеческого, содержащего не менее 0,4 % высокомолекулярных белков, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 0,1 мл раствора для проверки пригодности хроматографической системы и доводят объём раствора растворителем.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 × 8,0 мм, силикагель гидрофильный для хроматографии (1) с размером пор 12 нм, пригодная для разделения белковых соединений с молекулярными массами от 5000 до 150000 Да, 5-10 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 0,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 276 нм; |
| Объём пробы | 100 мкл; |
| Время хроматографирования | 35 мин. |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы и испытуемый раствор.

Перед использованием новую хроматографическую колонку уравновешивают неоднократным введением раствора инсулина, содержащего высокомолекулярные белки. Для этого должно быть выполнено не менее трех введений раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Колонка считается уравновешенной, если получены повторяемые результаты для двух последовательных введений раствора.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин человеческий – около 20  мин; инсулин-полимерный комплекс – 13-17 мин; ковалентно связанный инсулин-димер – около 17,5 мин.

После пика инсулина человеческого могут наблюдаться пики солей.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками ковалентно связанного инсулин-димера и инсулина человеческого должно быть не менее 2,0;

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина человеческого должен быть от 0,6 до 1,2.

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика инсулина человеческого должно быть не менее 10.

Содержание высокомолекулярных белков в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования.

*Допустимое содержание примесей:*

– сумма высокомолекулярных белков не более 1,0 %.

Не учитывают пики со временем удерживания, превышающим время удерживания пика инсулина человеческого.

**А21-Дезамидоинсулин (человеческий)** **и другие родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Количественное определение» со следующими изменениями.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 0,1 мл раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-30 | 42 | 58 |
| 30-44 | 42 → 11 | 58 → 89 |
| 44-50 | 11 | 89 |

Хроматографируют раствор для идентификации пиков, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор стандартного образца инсулина человеческого (А), раствор стандартного образца инсулина человеческого (Б) и испытуемый раствор.

Приводят колонку в состояние равновесия при исходных условиях в течение не менее 15 мин. Параллельно проводят холостой опыт, выполняя условия приведенного градиента.

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина человеческого было в интервале 17-23 мин.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин человеческий– 1; А21-дезамидоинсулин (человеческий) – около 1,3.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для идентификации пиков *разрешение (RS)* между пиками инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) должно быть не менее 2,0.

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика инсулина человеческого должно быть не менее 10.

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) площадь пика инсулина человеческого должна быть в 10±0,5 раз больше, чем площадь пика инсулина человеческогона хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (Б).

Содержание А21-дезамидоинсулина (человеческого) и любой другой примеси в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования.

*Допустимое содержание примесей:*

– А21-дезамидоинсулин (человеческий) не более 2,0 %;

– сумма другихпримесей не более 2,0 %.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 10 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Около 0,2 г (точная навеска) субстанции высушивают при температуре 105 °С в течение 24 ч.

**Цинк.** Не более 1,0 % в пересчете на сухое вещество (ОФС «Определение цинка в препаратах инсулина»).

**Сульфатная зола.** Не более 2,5 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,2 г (точная навеска) субстанции.

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители**»**.

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 10 ЕЭ на 1 мг инсулина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 10 мг/мл в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М.

**Биологическая активность.** Не менее 27,5 МЕ/мг в пересчете на сухое вещество. Определяют по гипогликемическому действию субстанции в сравнении со стандартным образцом инсулина человеческого с указанной величиной биологической активности, в соответствии с ОФС «Биологические испытания инсулина».

**Количественное определение.** Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Все растворы хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 24 ч.

*Подвижная фаза А (ПФА). Подвижная фаза А (ПФА).* Растворяют28,4 г натрия сульфата безводного в воде, прибавляют 2,7 мл фосфорной кислоты концентрированной, при необходимости доводят значение рН раствора до 2,30±0,05 этаноламином или триэтиламином, полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил—ПФА 450:550. Нагревают до 20 °С, фильтруют и дегазируют.

*Подвижная фаза (ПФ).* ПФА—ПФБ 420:580.

*Растворитель.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают около 40 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца инсулина человеческого (А).* Готовят раствор стандартного образца инсулина человеческого в растворителе с концентрацией инсулина человеческого в растворе около 4,0 мг/мл.

*Раствор стандартного образца инсулина человеческого (Б).* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Стандартный раствор.* Готовят раствор стандартного образца инсулина свиного для проверки пригодности хроматографической системы в растворителе с концентрацией инсулина свиного в растворе 4,0 мг/мл.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* Смешивают 1,0 мл раствора стандартного образца инсулина человеческого (А) и 1,0 мл стандартного раствора.

*Раствор для идентификации пиков.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 40 мг субстанции, растворяют в растворителе, доводят объём раствора растворителем до метки и термостатируют при температуре 37 °С в течение 1 ч. Полученный раствор содержит А21-дезамидоинсулин (человеческий) в количестве не менее 0,5 %.

Примечание.

A21-Дезамидоинсулин (человеческий): [A21‑аспарагиновая кислота]инсулин (человеческий).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл. |

Хроматографируют раствор для идентификации пиков, стандартный раствор, раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца инсулина человеческого (А), раствор стандартного образца инсулина человеческого (Б) и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин человеческий – 1; А21-дезамидоинсулин (человеческий) – около 1,3.

*Идентификация пиков.* Хроматограмма стандартного раствора используется для идентификации пика свиного инсулина. Относительное время удерживания и хроматограмма раствора для идентификации пиков используется для идентификации пика А21-дезамидоинсулина (человеческого).

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками инсулина свиного и инсулина человеческого должно быть не менее 1,2.

На хроматограмме раствора для идентификации пиков *разрешение (RS)* между пиками инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) должно быть не менее 2,0.

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (А):

– *относительное стандартное отклонение* суммы площадей пиков инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) должно составлять не более чем 2,0 % (6 определений);

– площадь пика инсулина человеческого должна быть в 10±0,5 раз больше, чем площадь пика инсулина человеческого на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (Б).

Суммарное содержание инсулина человеческого C257H383N65O77S6 и А21-дезамидоинсулина (человеческого) в субстанции в процентах (*Х*) в пересчёте на сухое вещество вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | сумма площадей пиков инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | сумма площадей пиков инсулина человеческого и А21-дезамидоинсулина (человеческого) на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина человеческого (А); |
|  | *a0* | – | навеска стандартного образца инсулина человеческого, мг; |
|  | *V0* | – | объём растворителя, взятый для приготовления раствора стандартного образца инсулина человеческого (А), мл; |
|  | *а1* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *W* | – | потеря в массе при высушивании, %. |

**Хранение.** В защищенном от света месте при температуре от –25 до   
–10 °С.