|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Инсулин лизпро** |  | **ФС** |
| **Инсулин лизпро** |  |  |
| **Insulinum lisprum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| [B28-Лизин,B29-пролин]инсулин (человеческий) | |
|  | |
| C257H383N65O77S6 | М.м.5808,0 |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию инсулин лизпро. Инсулин лизпро представляет собой аналог человеческого инсулина, отличающийся заменой пролина в 28 положении В-цепи на лизин и заменой лизина в 29 положении В-цепи на пролин.

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

Содержит не менее 94,0 % и не более 104,0 % инсулина лизпро C257H383N65O77S6 в пересчете на сухое вещество.

ПРОИЗВОДСТВО

Инсулин лизпро получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК с применением генетически стабильных штаммов продуцентов. Штаммы-продуценты 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.** Белый или почти белый порошок.

**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 пик инсулина лизпро на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика инсулина лизпро на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина лизпро (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 лизпро.

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

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

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

*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 растворителе с концентрацией инсулина лизпро 2,0 мг/мл.

*Раствор стандартного образца инсулина лизпро.* Готовят раствор стандартного образца инсулина лизпро в растворителе с концентрацией инсулина лизпро 2,0 мг/мл.

*Получение гидролизатов.* Помещают по 0,5 мл испытуемого раствора и раствора стандартного образца инсулина лизпро 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. Затем к каждому полученному раствору прибавляют по 2,9 мл сульфатного буферного раствора pH 2,0.

*Контрольный раствор.* К 0,25 мл растворителя 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, затем 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 лизпро и гидролизат испытуемого раствора.

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

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

– *разрешение* (*RS*) между пиками фрагментов II и III должно быть не менее 8,0;

– *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 лизпро 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.

*\**Времена удерживания фрагментов I, II и IV совпадают с таковыми для инсулина человеческого; время удерживания фрагмента III отличаются от такового для инсулина человеческого, что связано с заменой пролина на лизин в 28 положении В-цепи и заменой лизина на пролин в 29 положении В-цепи.

**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 (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 48 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 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, 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 трехкратным введением раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Колонка считается уравновешенной, если получены воспроизводимые результаты для двух последовательных введений раствора.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин лизпро – около 20  мин; полимеры инсулина лизпро – 13-17 мин; димер инсулина лизпро – около 17,5 мин.

После пика инсулина лизпро могут наблюдаться пики солей.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками димера инсулина лизпро и инсулина лизпро должно быть не менее 2,0;

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина лизпро должен быть не более 2,0.

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

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

*Допустимое содержание примесей:*

– сумма высокомолекулярных белков не более 0,25 %.

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

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата безводного в 900 мл воды, доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,30±0,05, переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза A (ПФА).* Ацетонитрил—буферный раствор 180:820.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил—буферный раствор 500:500.

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

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают около 35 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 56 ч.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 35,0 мг субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. Полученный раствор выдерживают при комнатной температуре не менее часа. Эта процедура позволяет получить раствор с содержанием А21-дезамидоинсулина лизпро от 0,8 % до 11 %.

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

Примечание.

А21-дезамидоинсулин лизпро: [21A‑аспарагиновая кислота]инсулин лизпро.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18) с размером пор не менее 20 нм, 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-60 | 81 | 19 |
| 60-83 | 81 → 51 | 19 → 49 |
| 83-84 | 51 → 81 | 49 → 19 |
| 84-94 | 81 | 19 |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор.

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина лизпро было около 41 мин.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин аспарт – 1 (около 41 мин); А21-дезамидоинсулин лизпро – около 1,3.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

- *разрешение (RS)* между пиками инсулина лизпро и А21-дезамидоинсулина лизпро должно быть не менее 1,5;

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина лизпро должен быть не более 2,0.

Содержание любой примеси в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования.

*Допустимое содержание примесей:*

– А21-дезамидоинсулин лизпро не более 1,0 %;

– любая неидентифицированная примесь не более 0,50 %;

– сумма неидентифицированных примесей не более 2,0 %.

Не учитывают пики менее 0,05 %.

**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 3,0 % (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 лизпро (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции 1 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 лизпро 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 48 ч.

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата безводного в 900 мл воды, доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,30±0,05, переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* Ацетонитрил—буферный раствор 255:745.

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

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают около 16 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца инсулина лизпро.* Готовят раствор стандартного образца инсулина лизпро в растворителе с концентрацией инсулина лизпро в растворе около 0,8 мг/мл.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 10,0 мг субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. Полученный раствор выдерживают при комнатной температуре не менее часа. Эта процедура позволяет получить раствор с содержанием А21-дезамидоинсулина лизпро от 0,8 % до 11 %.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 100 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18) с размером пор 8 нм, 3 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 0,8 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 35 мин. |

Хроматографируют раствор для проверки разедительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца инсулина лизпро и испытуемый раствор.

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина лизпро было около 24 мин.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин лизпро – около 24 мин.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками инсулина лизпро и А21-дезамидоинсулина лизпро должно быть не менее 1,8.

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина лизпро

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина лизпро должен быть не более 1,8;

– *относительное стандартное отклонение* площади пика инсулина лизпро должно быть не более 2,0 % (6 определений).

Содержание инсулина лизпро C257H383N65O77S6 в субстанции в процентах (*Х*) в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | площадь пика инсулина лизпро на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | площадь пика инсулина лизпро на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина лизпро; |
|  | *а1* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *a0* | – | навеска стандартного образца инсулина лизпро, мг; |
|  | *V0* | – | объём растворителя, взятый для приготовления раствора стандартного образца инсулина лизпро, мл; |
|  | *W* | – | потеря в массе при высушивании, %. |

**Хранение.** В защищенном от света месте при температуре от   
-20 до -10 °С.