**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Инсулин гларгин** |  | **ФС** |
| **Инсулин гларгин** |  |  |
| **Insulinum glarginum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

[A21-Глицин]инсулин-B30-ил-L-аргинил-L-аргинин (человеческий)



|  |  |
| --- | --- |
| C267H404N72O78S6 | М.м. 6063,0 |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию инсулин гларгин. Инсулин гларгин представляет собой аналог человеческого инсулина, отличающийся наличием двух дополнительных остатков аргинина с С-конца В-цепи (положения B31 и В32), а также заменой аспарагина на глицин в 21 положении А-цепи.

За 1 единицу действия (ЕД) инсулина гларгина принимают биологическую активность 0,0364 мг инсулина гларгина.

Содержит не менее 94,0 % и не более 105,0 % инсулина гларгина C267H404N72O78S6 в пересчете на сухое вещество.

ПРОИЗВОДСТВО

Инсулин гларгин получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК с применением генетически стабильных штаммов продуцентов.

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».

Если в ходе производства применяются фенол или *м*-крезол их остаточное содержание должно нормироваться.

**Описание.** Белый или почти белый кристаллический порошок.

\*Гигроскопичен.

**Растворимость.** Практически нерастворим в воде и спирте 96 %, легко растворим или растворим в натрия гидроксида растворе 0,1 М и хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М.

**Подлинность**

*1. ВЭЖХ.* Время удерживания пика инсулина гларгина на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика инсулина гларгина на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина гларгина (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 гларгина.

*Буферный раствор.* В мерный колбу вместимостью 2 л помещают 42,1 г натрия перхлората моногидрата, растворяют в 1600 мл воды, прибавляют 11,6 г фосфорной кислоты концентрированной, доводятpH полученного раствора триэтиламином до 2,30±0,05 и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза A (ПФА).* Ацетонитрил—буферный раствор 70:930.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Буферный раствор—ацетонитрил 430:570.

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

*Раствор фермента.* Содержимое флакона эндопротеиназы Glu-C из *S. aureus* V8, тип XVII-B растворяют в 1 М трис—гидрохлорида буферном растворе рН 7,5 до получения концентрации фермента 20 ЕД/мл. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в растворителе с концентрацией инсулина гларгина 10,0 мг/мл.

*Раствор стандартного образца инсулина гларгина*. Готовят раствор стандартного образца инсулина гларгина в растворителе с концентрацией инсулина гларгина 10,0 мг/мл.

*Получение гидролизатов.* Помещают по 5 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца инсулина гларгина в две чистые пробирки по отдельности, прибавляют по 1,0 мл 1 М трис—гидрохлорида буферного раствора рН 7,5 и по 0,1 мл раствора фермента. Закрывают пробирки и термостатируют при температуре 45 °C в течение 2 ч. Затем к каждому полученному раствору прибавляют по 2 мкл фосфорной кислоты концентрированной.

*Контрольный раствор.* К 5 мкл растворителя прибавляют 1,0 мл 1 М трис—гидрохлорида буферного раствора рН 7,5 и 0,1 мл раствора фермента. Полученный раствор термостатируют при температуре 45 °C в течение 2 ч, затем прибавляют по 2 мкл фосфорной кислоты концентрированной.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 125×3,0 мм, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии (С18), 4 мкм; |
| Температура колонки | 35 °С; |
| Скорость потока | 0,6 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 50 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-30 | 90 → 20 | 10 → 80 |
| 30-35 | 20 | 80 |
| 35-36 | 20 → 80 | 80 → 10 |
| 36-51 | 80 | 10 |

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

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

*Времена удерживания соединений.* Фрагмент II – около 14 мин; фрагмент III – около 15 мин.

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

– *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.

Полученная хроматограмма гидролизата раствора стандартного образца инсулина гларгина должна качественно соответствовать хроматограмме, прилагаемой к стандартному образцу инсулина гларгина.

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.

*\**Времена удерживания фрагментов I и IV совпадают с таковыми для инсулина человеческого; времена удерживания фрагментов II и III отличаются от таковых для инсулина человеческого из-за изменения последовательности в положении 21 А-цепи и двух дополнительных аминокислот 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 или выдерживать сравнение с эталоном Y7 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

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

*Примечание*. Определение может не проводиться, если в ходе очистки субстанции установлено содержание данной примеси в количестве не превышающем 0,05 %.

**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».

*Подвижная фаза (ПФ).* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают уксусной кислоты ледяной 200 мл, прибавляют 300 мл ацетонитрила, 400 мл воды, доводят pH полученного раствора аммиака раствором концентрированным до 3,00±0,05 и доводят объём раствора водой до метки.

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

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 15 мг субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Стандартный образец инсулина гларгина выдерживают при 100 °С в течение 1,5-3,0 ч. Эта процедура позволяет получить образец, содержащий не менее 0,4 % высокомолекулярных белков. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 15,0 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 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 × 8,0 мм, силикагель модифицированный дигидроксипропильными группами, с размером пор 15 нм, пригодные для разделения белковых соединений с молекулярными массами от 2000 до 800000, 5 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.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин гларгин – около 17  мин. Пики высокомолекулярных белков наблюдаются до пика инсулина гларгина.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

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

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина гларгина должен быть не менее 0,6 и не более 2,0;

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

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

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

*Допустимое содержание примесей:*

– сумма высокомолекулярных белков не более 0,3 %.

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

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

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата в 1000 мл воды и доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,30±0,04.

*Подвижная фаза A (ПФА).* Буферный раствор—ацетонитрил 820:180.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Буферный раствор—ацетонитрил 500:500. Растворы смешивают медленно, предотвращая выпадение осадка.

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

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают около 18,2 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Содержимое флакона стандартного образца инсулина гларгина для идентификации пиков, содержащий 0A-Arg-инсулина гларгина, растворяют в 1,0 мл растворителя.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* Готовят раствор стандартного образца инсулина гларгина в растворителе с концентрацией инсулина гларгина около 0,036 мг/мл.

Примечание.

0A-Arg-инсулин гларгина: *N*A1-аргинил-[A21-глицин]инсулин-B30-ил-L-аргинил-L-аргинин (человеческий).

B-цепь[Asu3]: B-цепь[аспартилсукцинимид3].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 3 мкм, с размером пор 30 нм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Температура образца | 2-8 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время регистрации хроматограммы | 84 мин. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА | ПФБ |
| 0-60 | 80 | 20 |
| 60-83 | 80 → 50 | 20 → 50 |
| 83-84 | 50→ 0 | 50→ 100 |
| 84-94 | 0 | 100 |
| 94,0-94,1 | 0→ 80 | 100→ 20 |
| 94,1-104 | 80 | 20 |

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

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ в начальных условиях градиентного элюирования таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина гларгина было в интервале 36,7- 45,0 мин.

*Относительное время удерживания соединений.* Инсулин гларгин – 1 (около 44  мин); B-цепь[Asu3] – около 0,92; 0A-Arg-инсулин гларгина – около 1,3.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *разрешение* (*RS*) между пиками инсулина гларгина и 0A-Arg-инсулина гларгина должно быть не менее 5,0.

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

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

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

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

Интегрирование площади пика любой примеси, пик которой не полностью разделяется, проводят путём проведения перпендикуляра из точки минимума между двумя неразделёнными пиками к основанию базовой линии.

*Допустимое содержание примесей:*

– B-цепь[Asu3] – не более 0,5 %;

– любая примесь – не более 0,4 %;

– сумма примесей – не более 2,0 %.

Не учитывают пики менее 0,1 %.

**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 0,8 % 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 гларгина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М с концентрацией 10 мг/мл.

**Биологическая активность.** Не менее 25,8 ЕД/мг в пересчете на сухое вещество. Определяют по гипогликемическому действию субстанции в сравнении со стандартным образцом инсулина гларгина в соответствии с ОФС «Биологические испытания инсулина».

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

*Буферный раствор.* Растворяют 28,4 г натрия сульфата в 1000 мл воды и доводят pH полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,30±0,04.

*Подвижная фаза (ПФ).* Буферный раствор—ацетонитрил 750:250.

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

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают около 18 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца инсулина гларгина.* Готовят раствор стандартного образца инсулина гларгина в растворителе с концентрацией инсулина гларгина около 3,6 мг/мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Содержимое флакона стандартного образца инсулина гларгина для идентификации пиков, содержащий 0A-Arg-инсулина гларгина, растворяют в 1,0 мл растворителя.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 100 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 3 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Температура образца | 2-8 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл; |
| Время хроматографирования | 2-кратное от времени удерживания пика инсулина гларгина. |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор стандартного образца инсулина гларгина и испытуемый раствор.

*Времена удерживания соединений.* Инсулин гларгин – от 10,0 до 17,0 мин.

При необходимости допускается изменять соотношение ПФ таким образом, чтобы время удерживания пика инсулина гларгина было в интервале от 10,0 до 17,0 мин.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *разрешение* (*RS*) между пиками инсулина гларгина и 0A-Arg-инсулина гларгина должно быть не менее 1,2;

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) инсулина гларгина должен быть не более 1,5.

На хроматограмме раствора стандартного образца инсулина гларгина:

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

– *относительное стандартное отклонение* времени удерживания пика инсулина гларгина должно быть не более 3,0 % (6 определений).

Содержание инсулина гларгина C267H404N72O78S6 в субстанции в процентах (*Х*) в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | площадь пика инсулина гларгина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | площадь пика инсулина гларгина на хроматограмме раствора стандартного образца инсулина гларгина; |
|  | *а1* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *С0* | – | концентрация инсулина гларгина в растворе стандартного образца инсулина гларгина, мг/мл; |
|  | *W* | – | потеря в массе при высушивании, %. |

**Хранение.** В плотно укупоренной упаковке в сухом защищенном от света месте, при температуре от -25 до -15 °С.

\*Приводится для информации.