**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Терипаратид** |  | **ФС** |
| **Терипаратид** |  |  |
| **Teriparatidum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
| L-Серил-L-валил-L-серил-L-глутамил-L-изолейцил-L-глутаминил-L-лейцил-L-метионил-L-гистидил-L-аспарагил-L-лейцил-глицил-L-лизил-L-гистидил-L-лейцил-L-аспарагил-L-серил-L-метионил-L-глутамил-L-аргинил-L-валил-L-глутамил-L-триптофил-L-лейцил-L-аргинил-L-лизил-L-лизил-L-лейцил-L-глутаминил-L-аспартил-L-валил-L-гистидил-L-аспарагил-L-фенилаланин |
|  |
| C181H291N55O51S2 | М.м. 4117,8  |

Субстанция представляет собой пептид с аминокислотной последовательностью, соответствующей (1-34) *N*-концевой части эндогенного человеческого паратиреоидного гормона. Субстанцию получают с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

Cодержит не менее 95,0 % и не более 105,0 % терипаратида C181H291N55O51S2 в пересчёте на безводное, свободное от остаточных органических растворителей, ацетатов и хлоридов вещество.

**Описание.** Белый или почти белый порошок. \*Очень гигроскопичен.

**Растворимость.** Легко растворим в воде и метаноле, практически нерастворим в ацетонитриле.

**Подлинность**

*1. Пептидное картирование* (ОФС «Пептидное картирование»)*.* Определение проводят в сочетании с методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение не более 72 ч.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Трифторуксусная кислота—вода 1:1000.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Трифторуксусная кислота—вода—ацетонитрил 1:400:600.

*Раствор фермента.* Готовят раствор эндопротеиназы Glu-C из *S. aureus* V8, тип XVII-B в растворителе с концентрацией около 0,25 мг/мл.

*Растворитель.* Растворяют 0,23 г динатрия гидрофосфата безводного и 60 мг натрия дигидрофосфата моногидрата в 100 мл воды и доводят значение pH до 7,80±0,05 фосфорной кислоты раствором 1 М.

Примечание. Допускается использование иных концентраций терипаратида с сохранением реакционного отношения эндопротеиназа—терипаратид 1:10 (м/м).

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в растворителе с концентрацией терипаратида около 1,5 мг/мл.

*Раствор стандартного образца терипаратида*. Готовят раствор стандартного образца терипаратида в растворителе с концентрацией терипаратида около 1,5 мг/мл.

*Контрольный раствор.* Растворитель.

*Проведение анализа*

К 0,15 мл полученных растворов прибавляют по 90 мкл раствора фермента, перемешивают и термостатируют при 37 °С в течение 18-24 ч. Останавливают реакцию, прибавляя по 0,66 мл ПФА; концентрация расщепленного белка составляет около 0,25 мг/мл.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 300 Å, 3,5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Температура образца | 2-8 °С |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 – 6 | 96 | 4 |
| 6 – 20 | 96 → 45 | 4 → 55 |
| 20 – 25 | 45 → 0 | 55 → 100 |

Хроматографируют контрольный раствор, раствор стандартного образца терипаратида и испытуемый раствор.

*Идентификация пиков.* Для идентификации пиков, соответствующих фрагментам I, II, III, IV и V, используют хроматограмму раствора стандартного образца терипаратида и хроматограмму, прилагаемую к стандартному образцу терипаратида.

*Пригодность хроматографической системы*

Хроматограмма раствора стандартного образца терипаратида должна быть качественно схожа с хроматограммой, прилагаемой к стандартному образцу терипаратида.

На хроматограмме раствора стандартного образца терипаратида:

– *разрешение (RS)* между пиками фрагментов III и I должно быть не менее 1,5;

– *фактор асимметрии пика* *(AS)* фрагмента IV должен быть не более 2,3.

Хроматографический профиль испытуемого раствора должен соответствовать хроматографическому профилю раствора стандартного образца терипаратида.

*2. ВЭЖХ*. Время удерживания пика терипаратида на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика терипаратида на хроматограмме раствора стандартного образца терипаратида (раздел «Количественное определение»).

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

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

**Родственные примеси**

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

Все растворы хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение не более 72 ч.

*Подвижная фаза (ПФ).* Трифторуксусная кислота—ацетонитрил— вода 1:250:750.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в воде с концентрацией терипаратида около 1 мг/мл.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* Содержимое флакона стандартного образца терипаратида термостатируют при 75 °С в течение 16-24 ч и растворяют в воде так, чтобы концентрация расщепленного терипаратида в полученном растворе составляла около 1 мг/мл.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 × 7,8 мм, силикагель гидрофильный для хроматографии с размером пор 125 Å, пригодный для разделения глобулярных белков со схожими молекулярными массами до 150000 Да, 5-10 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Температура образца | 2-8 °С |
| Скорость потока | 0,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 1,5-кратное от времени удерживания пика мономера терипаратида.  |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца терипаратида и испытуемый раствор.

*Время удерживания соединений.* Мономер терипаратида – 1 (около 17 мин).

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками димера и мономера терипаратида должно быть не менее 2,0.

*Допустимое содержание примесей.* Содержание каждой примеси в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования:

– сумма примесей, элюирующихся до основного пика - не более 0,3 %.

Не учитывают пики, элюирующиеся после пика мономера терипаратида.

***2. Другие примеси.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение не более 48 ч.

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

Примечание. Во время анализа ПФА и ПФБ необходимо нагревать при температуре 20-25 °С и непрерывно перемешивать во избежание осаждения натрия сульфата.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Ацетонитрил—буферный раствор 100:900.

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

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в ПФА с концентрацией терипаратида около 0,7 мг/мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Готовят раствор стандартного образца терипаратида в воде с концентрацией терипаратида около 2 мг/мл, доводят значение pH до 3,0±0,1 хлористоводородной кислотойконцентрированной и термостатируют при 50 °С в течение 9 сут. Непосредственно перед введением смешивают равные объемы полученного раствора и ПФА. Раствор содержит продукт деструкции, элюирующийся сразу после основного пика.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 30 Å, 3,5 мкм; |
| 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 | 45 мин. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 – 5 | 100 → 65 | 0 → 35 |
| 5 – 35 | 65 → 60 | 35 → 40 |
| 35 – 45 | 60 → 0 | 40 → 100 |
| 45 – 45,1 | 0 → 100 | 100 → 0 |
| 45,1 – 55 | 100 | 0 |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Терипаратид – 1 (20-25 мин); [Met8(O), Met18(O)]терипаратид – около 0,40; [Met8(O)]терипаратид – около 0,49; [Met18(O)]терипаратид – около 0,57.

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

– *разрешение (RS)* посчитанное как отношение пик/долина между пиками терипаратида и примеси, элюирующейся сразу после пика терипаратида (с относительным временем удерживания около 1,05) должно быть не менее 1,5;

– *фактор асимметрии пика* *(AS)* терипаратида должен быть от 0,8 до 2,0.

*Допустимое содержание примесей.* Содержание каждой примеси в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования:

– сумма [Met8(O), Met18(O)]терипаратида, [Met8(O)]терипаратида и [Met18(O)]терипаратида- не более 0,5 %;

− любая другая примесь - не более 0,5 %;

– сумма примесей - не более 2,0 %.

Не учитывают пики менее 0,05 %.

**Вода.** Не более 10,0 % (ОФС «Определение воды», метод 2). Для определения используют около 10 мг (точная навеска) субстанции.

**Ацетаты.** Не более 5,0 %. Определение проводят методом ионообменной хроматографии (ОФС «Ионообменная хроматография»).

Все растворы хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение не более 72 ч.

*Подвижная фаза (ПФ).* Серной кислоты раствор 0,005 М.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в ПФ с концентрацией терипаратида около 5 мг/мл.

*Калибровочные растворы.* В отдельные мерные колбы вместимостью 100 мл помещают около 0,1 г, 0,2 г и 0,3 г (точная навеска) натрия ацетата безводного, растворяют в ПФ и доводят объём растворов ПФ до метки. В отдельные мерные колбы вместимостью 10 мл помещают по 1,0 мл полученных растворов и доводят объём растворов ПФ до метки (концентрация ацетатов: 0,072; 0,144 и 0,216 мг/мл соответственно).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 9 мм, катионообменная смола; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Температура образца | 2-8 °С |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 210 нм; |
| Объём пробы | 100 мкл; |
| Время хроматографирования | 1,5-кратное от времени удерживания пика ацетат-аниона. |

Хроматографируют калибровочные и испытуемый растворы.

*Время удерживания соединений.* Ацетат – около 10 мин.

*Пригодность хроматографической системы*

Коэффициент корреляции (*r*) калибровочной кривой должен быть не менее 0,999.

На хроматограмме калибровочного раствора с концентрацией 0,144 мг/мл:

− *фактор асимметрии* *пика* *(AS)* ацетат-аниона должен быть не более 1,5;

− *относительное стандартное отклонение* площади пика ацетат-аниона не должно превышать 1,25 % (3 определения).

Строят калибровочную кривую, откладывая по оси ординат значения площадей пиков, а по оси абсцисс − концентрацию (мг/мл). Определяют концентрацию ацетат-аниона в испытуемом растворе по калибровочной кривой.

Содержание ацетатов в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{C\_{0}∙100}{C\_{1}}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *C0* | **–** | концентрация ацетат-аниона, определенное по калибровочному графику, мг/мл; |
|  | *С1* | **–** | концентрация терипаратида в испытуемом растворе, мг/мл. |

**Хлориды.** Не более 4,0 %. Определение проводят методом ионообменной хроматографии (ОФС «Ионообменная хроматография»).

Все растворы используют в течение не более 72 ч, если хранят при комнатной температуре.

*Подвижная фаза (ПФ).* В мерную колбу вместимостью 2 л помещают 0,2857 г натрия гидрокарбоната и 0,3816 г натрия карбоната безводного, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в воде с концентрацией терипаратида около 1 мг/мл.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 0,1659 г (точная навеска) натрия хлорида, предварительно высушенного при температуре 105 °С в течение 30 мин, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Калибровочные растворы.* В отдельные мерные колбы вместимостью 100 мл помещают по 1,0, 2,0, 3,0 и 4,0 мл стандартного раствора и доводят объём растворов водой до метки (концентрация хлорид-иона: 10, 20, 30 и 40 мкг/мл соответственно).

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,15 г натрия нитрита растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора, 2,5 мл стандартного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | 50 × 4 мм, анионообменная смола сильноосновная для хроматографии; |
| Колонка | 250 × 4 мм, анионообменная смола сильноосновная для хроматографии, 15 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 2,0 мл/мин; |
| Подавитель | анионный, 100 мА; |
| Детектор | кондуктометрический; |
| Объём пробы | 50 мкл; |
| Время хроматографирования |  6-кратное от времени удерживания пика хлорида. |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, калибровочные и испытуемый растворы.

*Время удерживания соединений.* Хлорид – около 1,6 мин, нитрит – около 1,8 мин.

*Пригодность хроматографической системы*

Коэффициент корреляции (*r*) калибровочной кривой должен быть не менее 0,999.

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

– *разрешение (RS)* между пиками хлорид-аниона и нитрит-аниона должно быть не менее 1,5;

− *фактор асимметрии* *пика* *(AS)* хлорид-аниона и нитрит-аниона должен быть не более 2,0;

− *относительное стандартное отклонение* площади пика хлорид-аниона и нитрит-аниона не должно превышать 2,0 % (5 определений).

Строят калибровочную кривую, откладывая по оси ординат значения площадей пиков, а по оси абсцисс − концентрацию (мкг/мл). Определяют концентрацию (С0) хлорид-иона в испытуемом растворе по калибровочной кривой.

Содержание хлоридов в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{C\_{0}∙100}{C\_{1}}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *C0* | **–** | концентрация хлорид-аниона, определенное по калибровочному графику, мкг/мл; |
|  | *С1* | **–** | концентрация терипаратида в испытуемом растворе, мкг/мл. |

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

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 50 ЕЭ на 1 мг терипаратида (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

**Количественное определение.** Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси. Другие примеси» со следующими изменениями.

*Подвижная фаза (ПФ).* ПФБ—ПФА 370:630.

*Растворитель.* Ацетонитрил—буферный раствор 25:75.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в растворителе с концентрацией терипаратида около 0,25 мг/мл.

*Раствор стандартного образца терипаратида*. Готовят раствор стандартного образца терипаратида в растворителе с концентрацией терипаратида около 0,25 мг/мл.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Время хроматографирования | 1,5-кратное от времени удерживания пика терипаратида. |

Хроматографируют раствор стандартного терипаратида и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца терипаратида:

– *фактор асимметрии* *пика* *(AS)* терипаратида должен быть от 0,8 до 1,5;

‒ *относительное стандартное отклонение* площади пика терипаратида должно быть не более 1,25 % (3 определения).

Процентное содержание (%) терипаратида C181H291N55O51S2 в пересчёте на безводное, свободное от остаточных органических растворителей, ацетатов и хлоридов вещество (*X*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙C\_{0}∙100}{S\_{0}∙C\_{1}∙(100-W-A-C)}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика терипаратида на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика терипаратида на хроматограмме раствора стандартного образца терипаратида; |
|  | *C*1 | – | концентрация терипаратида в испытуемом растворе, мг/мл; |
|  | *C*0 | – | концентрация терипаратида в растворе стандартного образца терипаратида, мг/мл; |
|  | *W* | – | содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %; |
|  | *A* | – | содержание ацетатов в субстанции, %; |
|  | *С* | – | содержание хлоридов в субстанции, %; |
|  |

**Хранение.** В сухом, защищённом от света месте при температуре не выше -10 °С.

\*Приводится для информации.