EXHIBIT 15

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES (EDQM)
EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION

EC/ep

COMMITTEE DOCUMENT
NOT FOR PUBLICATION

PA/PH/Exp. 6/T (03) 44 ANP

BILINGUE

December 2003

GROUP OF EXPERTS No. 6

(BIOLOGICAL SUBSTANCES)

Somatropin For Injection

Somatropine Pour Préparation Injectable
Somatropinum ad iniectabilium
Monograph N°: 952

Cette monographie est soumise aux Autorités nationales pour commentaires et elle sera publiée simultanément dans le prochain numéro de Pharmeuropa (16.1).
This monograph is submitted to National Authorities for comment and will be simultaneously published in the next issue of Pharmeuropa (16.1).

Distribution

For action:
National Pharmacopoeia Authorities

For information :
Members of Group of Experts 6
Praesidium

Strasbourg

This document will not be redistributed in sessions. Ce document ne sera pas redistribué lors des sessions.

NOTE ON THE MONOGRAPH

As a result of a collaborative study involving manufacturers of somatropin and OMCLs (report of collaborative study available upon request from the Secretariat), it is proposed to replace the isoelectric method for the determination of isoform distribution by a capillary zone electrophoresis method. The reader's attention is drawn to the proposed specifications.

XXXX:0952

SOMATROPIN FOR INJECTION

Somatropinum ad iniectabilium

```
FPTIPLSRLF  DNAMLRAHRL  HQLAFDTYQE  FEEAYIPKEQ
KYSFLQNPQT  SLCFSESIPT  PSNREETQQK  SNLELLRISL
LLIQSWLEPV  QFLRSVFANS  LVYGASDSNV  YDLLKDLEEG
IQTLMGRLED  GSPRTGQIFK  QTYSKFDTNS  HNDDALLKNY
GLLYCFRKDM  DKVETFLRIV  QCRSVEGSCG  F
```

$C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ M_r 22 125

DEFINITION

Freeze-dried, sterile preparation of a protein having the structure (191 amino-acid residues) of the major component of growth hormone produced by the human pituitary.

Content: 89.0 per cent to 105.0 per cent of the amount of somatropin stated on the label.

By convention, for the purpose of labelling somatropin preparations, 1 mg of anhydrous somatropin ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) is equivalent to 3.0 IU of biological activity.

Somatropin for injection complies with the requirements of the monograph on *Parenteral preparations (0520)*.

PRODUCTION

Somatropin for injection is prepared either from *Somatropin (0951)* or from *Somatropin bulk solution (0950)*, or by a method based on recombinant DNA (rDNA) technology in which the injectable preparation is produced without the isolation of an intermediate solid or liquid bulk. In the latter case, during the course of product development, it must be demonstrated that the manufacturing process produces a product having a biological activity of not less than 2.5 IU/mg, using a validated bioassay based on growth promotion and approved by the competent authority. The purified preparation, to which buffers and stabilisers may be added, is filtered through a bacteria-retentive filter, aseptically distributed in sterile containers of glass type I (*3.2.1*) and freeze-dried. The containers are immediately sealed so as to exclude microbial contamination and moisture.

Somatropin for injection complies with the following additional requirements.

Host-cell-derived proteins. The limit is approved by the competent authority.

Host-cell- and vector-derived DNA. The limit is approved by the competent authority.

Where somatropin for injection is prepared from Somatropin (0951) or from Somatropin bulk solution (0950), compliance with the requirements for host-cell-derived proteins, host-cell- and vector-derived DNA, identification test A, identification test C and charged variants distribution need not be reconfirmed by the manufacturer during subsequent production of somatropin for injection.

CHARACTERS

Appearance: white or almost white powder.

IDENTIFICATION

~~A. Examine the electropherograms obtained in the test for isoform distribution. In the electropherogram obtained with test solution (a), the principal band corresponds in position to that in the electropherogram obtained with reference solution (a).~~

A. Capillary electrophoresis (*2.2.47*) as described in the test for charged variants distribution with the following modification.

Injection: test solution (b); under pressure or vacuum, using the following sequence: sample injection (3 s) CZE buffer (1 s).

Results: in the electropherogram obtained, only 1 principal peak, corresponding to somatropin, is detected: no doubling of this peak is observed.

B. Examine the chromatograms obtained in the test for related proteins.

Results: the principal peak in the chromatogram obtained with the test solution is similar in retention time and size to the principal peak in the chromatogram obtained with the reference solution.

C. Peptide mapping (*2.2.55*).

SELECTIVE CLEAVAGE OF THE PEPTIDE BONDS

Test solution. Prepare a solution of the substance to be examined in *0.05 M tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R* to obtain a solution containing 2.0 mg/ml of somatropin and transfer about 1.0 ml to a tube made from suitable material such as polypropylene. Prepare a 1 mg/ml solution of *trypsin for peptide mapping R* in *0.05 M tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R* and add 30 µl to the solution of the substance to be examined. Cap the tube and place in a water-bath at 37 °C for 4 h. Remove from the water-bath and stop the reaction immediately, for example by freezing. If analysed immediately using an automatic injector, maintain at 2-8 °C.

Reference solution. Prepare at the same time and in the same manner as for the test solution but using *somatropin CRS* instead of the substance to be examined.

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION. Liquid chromatography (*2.2.29*).

Column:

- *size*: l = 0.25 m, Ø = 4.6 mm,
- *stationary phase*: *octylsilyl silica gel for chromatography R* (5-10 µm),
- *temperature*: 30 °C.

Mobile phase:

- *mobile phase A*: dilute 1 ml of *trifluoroacetic acid R* to 1000 ml with *water R*,
- *mobile phase B*: to 100 ml of *water R* add 1 ml of *trifluoroacetic acid R* and dilute to 1000 ml with *acetonitrile for chromatography R*,

Time (min)	Mobile phase A (per cent *V/V*)	Mobile phase B (per cent *V/V*)
0 - 20	100 → 80	0 → 20
20 - 40	80 → 75	20 → 25
40 - 65	75 → 50	25 → 50
65 - 70	50 → 20	50 → 80
70 - 71	20 → 100	80 → 0
71 - 85	100	0

Flow rate: 1 ml/min.

Detection: spectrophotometer at 214 nm.

Injection: 100 µl.

System suitability: the chromatograms obtained with the test solution and the reference solution are qualitatively similar to the *Ph. Eur. reference chromatogram of somatropin digest.*

Results: the profile of the chromatogram obtained with the test solution corresponds to that of the chromatogram obtained with the reference solution.

D. Examine the chromatograms obtained in the assay.

Results: the principal peak in the chromatogram obtained with the test solution is similar in retention time and size to the principal peak in the chromatogram obtained with the reference solution.

TESTS

Related proteins. Liquid chromatography (*2.2.29*): use the normalisation procedure.

Test solution. Prepare a solution of the substance to be examined in *0.05 M tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R*, containing 2.0 mg/ml of somatropin.

Reference solution. Prepare a solution of *somatropin CRS* in *0.05 M tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R*, containing 2.0 mg/ml of somatropin.

Resolution solution (somatropin/desamidosomatropin resolution mixture). Prepare a solution of *somatropin CRS* in *0.05 M tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R* to obtain a 2.0 mg/ml solution of somatropin. Either filter through a sterile filter or add *sodium azide R* to a concentration of 0.1 mg/ml and allow to stand at room temperature for 24 h.

Maintain the solutions at 2-8 °C and use within 24 h. If an automatic injector is used, maintain at 2-8 °C.

Column:

- *size*: l = 0.25 m, Ø = 4.6 mm;
- *stationary phase*: a suitable singly end-capped butylsilyl silica gel, with a granulometry of 5 µm and a porosity of 30 nm; a silica saturation column is placed between the pump and the injector valve;

– *temperature*: 45 °C.

Mobile phase: *propanol R, 0.05 M tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R* (29:71 *V/V*).

Flow rate: 0.5 ml/min.

Detection: spectrophotometer at 220 nm.

Preconditioning of the column: rinse with 200-500 ml of a 0.1 per cent *V/V* solution of *trifluoroacetic acid R* in a 50 per cent *V/V* solution of *acetonitrile R*. Repeat as necessary, to improve column performance.

Injection: 20 µl.

Relative retention with reference to somatropin: desamidosomatropin = about 0.85.

System suitability: resolution solution:

– *retention time*: somatropin = about 33 min; if necessary, adjust the concentration of *propanol R* in the mobile phase;

– *resolution*: minimum 1.0 between the peaks due to desamidosomatropin and somatropin;

– *symmetry factor*: 0.9 to 1.8 for the peak due to somatropin.

Limits:

– *total*: maximum 13.0 per cent.

Dimer and related substances of higher molecular mass. Size-exclusion chromatography (*2.2.30*): use the normalisation procedure.

Test solution. Prepare a solution of the substance to be examined in *0.025 M phosphate buffer solution pH 7.0 R*, containing 1.0 mg/ml of somatropin.

Reference solution. Dissolve the contents of a vial of *somatropin CRS* in *0.025 M phosphate buffer solution pH 7.0 R* and dilute with the same solvent to obtain a concentration of 1.0 mg/ml.

Resolution solution. Place 1 vial of *somatropin CRS* in an oven at 50 °C for a period sufficient to generate 1-2 per cent of dimer (typically 12-24 h). Dissolve its contents in *0.025 M phosphate buffer solution pH 7.0 R* and dilute with the same solvent to obtain a concentration of 1.0 mg/ml.

Column:

– *size*: l = 0.30 m, Ø = 7.8 mm,

– *stationary phase*: *hydrophilic silica gel for chromatography R* of a grade suitable for fractionation of globular proteins in the molecular mass range of 5000 to 150 000.

Mobile phase: *2-propanol R, 0.063 M phosphate buffer solution pH 7.0 R* (3:97 *V/V*); filter and degas.

Flow rate: 0.6 ml/min.

Detection: spectrophotometer at 214 nm.

Injection: 20 µl.

Relative retention with reference to somatropin monomer: related substances of higher molecular mass = about 0.65; somatropin dimer = about 0.9.

System suitability: resolution solution:

– *retention time*: somatropin = 12 min to 17 min,

– *peak-to-valley ratio*: minimum 2.5, where H_p = height above the baseline of the peak due to the dimer and H_v = height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to the monomer.

Limits:

– *total of the peaks with retention times less than that of the principal peak*: maximum 6.0 per cent.

~~**Isoform distribution**. Examine by isoelectric focusing.~~

~~*Test solution (a).* Prepare a solution of the substance to be examined in *0.025 M phosphate buffer solution pH 7.0 R*, containing 2.0 mg/ml of somatropin.~~

~~*Test solution (b).* Add 0.1 ml of test solution (a) to 1.5 ml of *0.025 M phosphate buffer solution pH 7.0 R*.~~

~~*Reference solution (a).* Prepare a solution of *somatropin CRS* in *0.025 M phosphate buffer solution pH 7.0 R*, containing 2.0 mg/ml of somatropin.~~

~~*Reference solution (b).* Use an isoelectric point calibration solution in the pH range of 2.5 to 6.5, prepared and used according to the manufacturer's instructions.~~

~~Operate the apparatus in accordance with the manufacturer's instructions. The isoelectric focusing procedure may be carried out using a pre-cast gel 245 mm × 110 mm × 1 mm, with a pH in the range 4.0 to 6.5. Apply to the gel 15 µl of each solution. Use as the anode solution a 14.7 g/l solution of *glutamic acid R* in phosphoric acid (50 g/l H_3PO_4) and as the cathode solution an 89.1 g/l solution of *βalanine R*. Adjust the operating conditions to 2000 V and 25 mA. Allow focusing to take place for 2.5 h at a constant voltage and at a power of not more than 25 W. Immerse the gel for 30 min in a solution containing 115 g/l of *trichloroacetic acid R* and 34.5 g/l of *sulphosalicylic acid R*, and then for 5 min in a mixture of 8 volumes of *acetic acid R*, 25 volumes of *ethanol R* and 67 volumes of deionised *water R* (de-stain solution). Stain the gel by immersion in a 1.15 g/l solution of *acid blue 83 R* in de-stain solution at 60 °C for 10 min, and then place the gel in de-stain solution until excess stain is removed.~~

~~The test is not valid unless the distribution of bands in the electropherogram obtained with reference solution (b) corresponds to the manufacturer's indications. The electropherogram obtained with reference solution (a) contains a major band with an isoelectric point of approximately five, and a slightly more acidic minor band at approximately 4.8. In the electropherogram obtained with test solution (a), no band apart from the major band is more intense than the major band in the electropherogram obtained with test solution (b) (6.25 per cent).~~

Charged variants distribution. Capillary zone electrophoresis (*2.2.47*).

The following chromatogram is shown for information but will not be published in the European Pharmacopoeia.

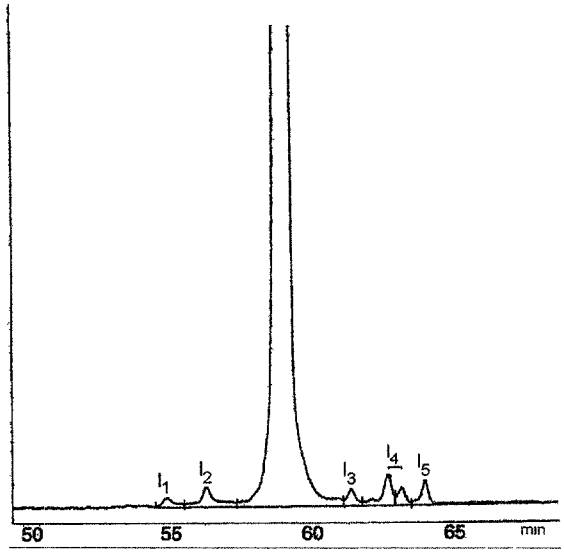

Figure 0952.-1. – *Representative electropherogram of somatropin*

Test solution (a). Prepare a solution of the substance to be examined containing 1 mg/ml of somatropin.

Test solution (b). Mix equal volumes of test solution (a) and the reference solution.

Reference solution. Dissolve the contents of a vial of *somatropin CRS* in *water R* and dilute with the same solvent to obtain a concentration of 1 mg/ml.

Capillary:

– *material*: uncoated fused silica,

– *size*: effective length = about 70 cm, Ø = 50 µm.

Temperature: 30 °C.

CZE buffer: 13.2 g/l solution of *ammonium phosphate R* adjusted to pH 6.0 with *phosphorous acid R* and filtered.

Detection: spectrophotometer at 195 nm.

Set the autosampler to store the samples at 4 °C during analysis.

Preconditioning of the capillary: rinse with *1 M sodium hydroxide* for 20 min, with *water R* for 10 min and with CZE buffer for 20 min.

Between-run rinsing: rinse with *0.1 M sodium hydroxide* for 2 min and with CZE buffer for 6 min.

Injection: test solution (a) and the reference solution; under pressure or vacuum, using the following sequence: sample injection (3 s) CZE buffer (1 s).

Migration: apply a field strength of 217 V/cm (20 kV for capillaries of 92 cm total length) for 80 min, using CZE buffer as the electrolyte in both buffer reservoirs.

Relative migration with reference to somatropin: cleaved form = 0.94-0.98; Gln-18 somatropin = 1.02-1.06; deamidated forms = 1.06-1.11.

System suitability[1]: reference solution:

- the electropherogram obtained is similar to the *Ph. Eur. reference electropherogram of somatropin.* 2 peaks (I_1, I_2) eluting prior to the principal peak and 3 peaks (I_3, I_4, I_5) eluting after the principal peak are clearly visible. *Note: Peak I_2 corresponds to the cleaved form; peak I_3 corresponds to Gln-18 somatropin and peak I_4 corresponds to the deamidated forms, eluting as a doublet.*

Limits:

- *deamidated forms*: maximum 6.5 per cent,
- *any other impurity*: for each impurity, maximum 2.0 per cent,
- *total*: maximum 11.5 per cent.

Water (*2.5.32*): maximum 3.0 per cent, unless otherwise justified and authorised.

Bacterial endotoxins (*2.6.14*): less than 5 IU/mg.

ASSAY

Size-exclusion chromatography (*2.2.30*) as described in the test for dimer and related substances of higher molecular mass.

Calculate the content of somatropin ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) from the peak areas in the chromatograms obtained with the test solution and the reference solution and the declared content of $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ in *somatropin CRS*.

STORAGE

In a sterile, airtight, tamper-proof container, at a temperature of 2 °C to 8 °C.

LABELLING

The label states:

- the content of somatropin in the container, in milligrams,
- the composition and volume of the liquid to be added for reconstitution,
- the time within which the reconstituted solution shall be used and the storage conditions during this period,
- the name and quantity of any added substance,
- the storage temperature,
- that the preparation shall not be shaken during reconstitution.

(1) Readers are kindly requested to give a proposal on an acceptance criterion for repeatability of peak area.

NOTE RELATIVE À LA MONOGRAPHIE

Suite à une étude collaborative à laquelle ont participé des fabricants de somatropine et des OMCL (le rapport de l'étude est disponible sur demande auprès du Secrétariat), il est proposé de remplacer la méthode isoélectrique utilisée pour déterminer la distribution des isoformes par une électrophorèse capillaire de zone. L'attention des lecteurs est appelée sur les spécifications proposées.

XXXX:0952

SOMATROPINE POUR PRÉPARATION INJECTABLE

Somatropinum ad iniectabilium

```
FPTIPLSRLF  DNAMLRAHRL  HQLAFDTYQE  FEEAYIPKEQ
KYSFLQNPQT  SLCFSESIPT  PSNREETQQK  SNLELLRISL
LLIQSWLEPV  QFLRSVFANS  LVYGASDSNV  YDLLKDLEEG
IQTLMGRLED  GSPRTGQIFK  QTYSKFDTNS  HNDDALLKNY
GLLYCFRKDM  DKVETFLRIV  QCRSVEGSCG  F
```

$C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ M_r 22 125

DÉFINITION

Préparation cryodesséchée, stérile, contenant une protéine de même structure (191 résidus acides aminés) que le principal constituant de l'hormone de croissance produite par l'hypophyse humaine.

Teneur : 89,0 pour cent à 105,0 pour cent de la quantité de somatropine indiquée sur l'étiquette.

Par convention, pour l'étiquetage des préparations de somatropine, 1 mg de somatropine anhydre ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) correspond à 3,0 UI d'activité biologique.

La somatropine pour préparation injectable satisfait aux exigences de la monographie *Préparations parentérales (0520)*.

PRODUCTION

La somatropine pour préparation injectable est préparée soit à partir de *Somatropine (0951)* ou de *Solution en vrac de somatropine (0950)*, soit par la méthode dite de l'ADN recombinant (ADNr) sans passage par le stade de vrac solide ou liquide. Dans ce dernier cas, il doit être démontré pendant la phase de développement du produit, par une méthode de titrage biologique validée, fondée sur la stimulation de la croissance et ayant été approuvée par l'Autorité compétente, que le procédé de fabrication employé donne un produit dont l'activité biologique n'est pas inférieure à 2,5 UI/mg. La préparation purifiée, à laquelle peuvent être ajoutés des tampons et des stabilisants, est filtrée à travers un filtre anti-bactérien, répartie dans des conditions aseptiques en récipients stériles de verre de type I (*3.2.1*), puis cryodesséchée. Les récipients sont immédiatement scellés par mesure de protection contre les contaminations microbiennes et l'humidité.

La somatropine pour préparation injectable satisfait également aux exigences suivantes.

Protéines issues de la cellule hôte. La limite est approuvée par l'Autorité compétente.

ADN issu de la cellule hôte et du vecteur. La limite est approuvée par l'Autorité compétente.

Lorsque la somatropine pour préparation injectable est préparée à partir de Somatropine (0951) ou de Solution en vrac de somatropine (0950), le fabricant peut être dispensé de reconfirmer la conformité à l'essai des protéines issues de la cellule hôte, à l'essai de l'ADN issu de la cellule hôte et du vecteur, à l'identification A, à l'identification C et à l'essai de distribution des variants chargés lors de la production ultérieure de la somatropine pour préparation injectable.

CARACTÈRES

Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche.

IDENTIFICATION

~~A. Examinez les électrophorégrammes obtenus dans l'essai de distribution des isoformes. La bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner (a) est semblable quant à sa position à la bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin (a).~~

A. Electrophorèse capillaire (*2.2.47*) selon les indications de l'essai de distribution des variants chargés avec la modification suivante.

Injection : solution à examiner (b) ; sous pression ou sous vide, selon la séquence suivante : injection de l'échantillon (3 s), puis du tampon ECZ (1 s).

Résultats : dans l'électrophorégramme obtenu, 1 seul pic principal correspondant à la somatropine est détecté : il n'est pas observé de dédoublement de ce pic.

B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des protéines apparentées.

Résultats : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention et ses dimensions au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

C. Cartographie peptidique (*2.2.55*).

CLIVAGE SÉLECTIF DES LIAISONS PEPTIDIQUES

Solution à examiner. Préparez une solution de substance à examiner, dans de la *solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R*, contenant 2,0 mg/ml de somatropine. Transvasez environ 1,0 ml de cette solution dans un tube constitué d'un matériau approprié, par exemple du polypropylène. Préparez une solution de *trypsine pour cartographie peptidique R* à 1 mg/ml dans de la *solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R*, puis ajoutez 30 µl de cette solution à la solution de substance à examiner. Fermez le tube et placez-le dans un bain-marie à 37 °C pendant 4 h, puis sortez-le du bain-marie et stoppez immédiatement la réaction, par exemple par congélation. Si l'analyse est effectuée immédiatement au moyen d'un injecteur automatique, maintenez à 2-8 °C.

Solution témoin. Préparez la solution témoin au même moment et de la même manière que la solution à examiner, mais en utilisant de la *somatropine SCR* au lieu de la substance à examiner.

SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE. Chromatographie liquide (*2.2.29*).

Colonne :

– *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm,

– *phase stationnaire* : *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5-10 µm),

– *température* : 30 °C.

Phase mobile :

– *phase mobile A* : prélevez 1 ml d'*acide trifluoracétique R* et complétez à 1000 ml avec de l'*eau R*,

– *phase mobile B* : à 100 ml d'*eau R*, ajoutez 1 ml d'*acide trifluoracétique R*, puis complétez à 1000 ml avec de l'*acétonitrile pour chromatographie R*,

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent *V/V*)	Phase mobile B (pour cent *V/V*)
0 - 20	100 → 80	0 → 20
20 - 40	80 → 75	20 → 25
40 - 65	75 → 50	25 → 50
65 - 70	50 → 20	50 → 80
70 - 71	20 → 100	80 → 0
71 - 85	100	0

Débit : 1 ml/min.

Détection : spectrophotomètre à 214 nm.

Injection : 100 µl.

Conformité du système : les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin sont qualitativement semblables au *chromatogramme de référence de l'hydrolysat de somatropine de la Ph. Eur.*

Résultats : le profil du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner correspond à celui du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage.

Résultats : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention et ses dimensions au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

ESSAI

Protéines apparentées. Chromatographie liquide (*2.2.29*) : utilisez le procédé de normalisation.

Solution à examiner. Préparez une solution de la substance à examiner dans de la *solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R*, contenant 2,0 mg/ml de somatropine.

Solution témoin. Préparez une solution de *somatropine SCR* dans de la *solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R*, contenant 2,0 mg/ml de somatropine.

Solution pour essai de résolution (mélange somatropine/désamidosomatropine). Préparez une solution de *somatropine SCR* dans de la *solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R*, contenant 2,0 mg/ml de somatropine. Filtrez sur un filtre stérile ou ajoutez de l'*azide de sodium R* jusqu'à une concentration de 0,1 mg/ml, puis laissez reposer à température ambiante pendant 24 h.

Conservez les solutions à 2-8 °C et utilisez-les dans les 24 h. Si un injecteur automatique est utilisé, maintenez-le à 2-8 °C.

Colonne :

- *dimensions* : *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm ;
- *phase stationnaire* : gel de silice butylsilylé approprié, ayant subi un cycle de post-greffage, d'une granulométrie de 5 µm et d'une porosité de 30 nm ; une colonne de saturation remplie de gel de silice est placée entre la pompe et l'injecteur ;
- *température* : 45 °C.

Phase mobile : *propanol R, solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R* (29:71 *V/V*).

Débit : 0,5 ml/min.

Détection : spectrophotomètre à 220 nm.

Préconditionnement de la colonne : rincez la colonne avec 200-500 ml d'une solution d'*acide trifluoracétique R* à 0,1 pour cent *V/V* dans une solution d'*acétonitrile R* à 50 pour cent *V/V*. Répétez cette opération, autant que nécessaire, afin d'optimiser les performances de la colonne.

Injection : 20 µl.

Rétention relative par rapport à la somatropine : désamidosomatropine = environ 0,85.

Conformité du système : solution pour essai de résolution :

- *temps de rétention* : somatropine = environ 33 min ; ajustez si nécessaire la teneur en *propanol R* de la phase mobile ;
- *résolution* : au minimum 1,0 entre les pics dus à la désamidosomatropine et à la somatropine ;
- *facteur de symétrie* : 0,9 à 1,8 pour le pic dû à la somatropine.

Limites :

- *total* : au maximum 13,0 pour cent.

Dimère et substances apparentées de masse moléculaire supérieure. Chromatographie d'exclusion (*2.2.30*) : utilisez le procédé de normalisation.

Solution à examiner. Préparez une solution de substance à examiner dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R*, contenant 1,0 mg/ml de somatropine.

Solution témoin. Dissolvez le contenu d'une ampoule de *somatropine SCR* dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R*, puis complétez avec le même solvant de façon à obtenir une concentration de 1,0 mg/ml.

Solution pour essai de résolution. Placez 1 ampoule de *somatropine SCR* à l'étuve à 50 °C pendant une durée suffisante (généralement 12-24 h) pour obtenir 1-2 pour cent de dimère. Dissolvez son contenu dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R*, puis complétez avec le même solvant de façon à obtenir une concentration de 1,0 mg/ml.

Colonne :

- *dimensions* : *l* = 0,30 m, Ø = 7,8 mm,
- *phase stationnaire* : *gel de silice hydrophile pour chromatographie R* de qualité appropriée pour le fractionnement des protéines globulaires de masse moléculaire comprise entre 5000 et 150 000.

Phase mobile : *2-propanol R, solution tampon phosphate pH 7,0 (0,063 M) R* (3:97 *V/V*) ; filtrez et dégazez.

Débit : 0,6 ml/min.

Détection : spectrophotomètre à 214 nm.

Injection : 20 µl.

Rétention relative par rapport au monomère de somatropine : substances apparentées de masse moléculaire supérieure = environ 0,65 ; dimère de somatropine = environ 0,9.

Conformité du système : solution pour essai de résolution :

- *temps de rétention* : somatropine = 12 min à 17 min,
- *rapport pic/vallée* : au minimum 2,5 avec H_p = hauteur au-dessus de la ligne de base du pic dû au dimère et H_v = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas du tracé entre ce pic et celui dû au monomère.

Limites :

- *total des pics de temps de rétention inférieur à celui du pic principal* : au maximum 6,0 pour cent.

~~**Distribution des isoformes**. Examinez par focalisation isoélectrique.~~

~~*Solution à examiner (a).* Dissolvez la substance à examiner dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M)* R de façon à obtenir une solution contenant 2,0 mg/ml de somatropine.~~

~~*Solution à examiner (b).* A 1,5 ml de *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R*, ajoutez 0,1 ml de solution à examiner (a).~~

~~*Solution témoin (a).* Dissolvez de la *somatropine SCR* dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R* de façon à obtenir une solution contenant 2,0 mg/ml de somatropine.~~

~~*Solution témoin (b).* Utilisez une solution d'étalonnage des points isoélectriques couvrant un intervalle de pH de 2,5 à 6,5, préparée suivant les instructions du fabricant.~~

~~Utilisez l'appareil suivant les instructions du fabricant. La focalisation isoélectrique peut être réalisée à l'aide de plaques de gel prêtes à l'emploi de 245 mm x 110 mm x 1 mm, couvrant un intervalle de pH de 4,0 à 6,5. Déposez sur la plaque 15 µl de chaque solution. Utilisez comme solution anodique une solution d'*acide glutamique* R à 14,7 g/l dans de l'acide phosphorique (50 g/l H_3PO_4), et comme solution cathodique une solution de *β-alanine R* à 89,1 g/l. Ajustez les conditions opératoires à 2000 V et 25 mA.~~

~~Laissez la focalisation se dérouler pendant 2,5 h sous tension constante et à une puissance ne dépassant pas 25 W. Immergez la plaque pendant 30 min dans une solution contenant 115 g/l d'*acide trichloracétique R* et 34,5 g/l d'*acide sulfosalicylique R*, puis pendant 5 min dans un mélange de 8 volumes d'*acide acétique R*, de 25 volumes d'*éthanol R* et de 67 volumes d'*eau R* désionisée (solution de décoloration). Placez la plaque pendant 10 min dans une solution de *bleu acide 83 R* à 1,15 g/l dans la solution de décoloration, chauffée à 60 °C, puis replongez-la dans la solution de décoloration jusqu'à élimination de l'excès de colorant.~~

~~L'essai n'est valable que si la distribution des bandes de l'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin (b) est conforme aux indications du fabricant. L'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin (a) présente une bande principale au point isoélectrique 5 environ, et une bande secondaire légèrement plus acide au point isoélectrique 4,8~~

~~environ. Dans l'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner (a), aucune des bandes, à l'exception de la bande principale, n'est plus intense que la bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner (b) (6,25 pour cent).~~

Distribution des variants chargés. Electrophorèse capillaire de zone (*2.2.47*).

Le chromatogramme suivant est présenté pour information mais ne sera pas publié dans la Pharmacopée Européenne.

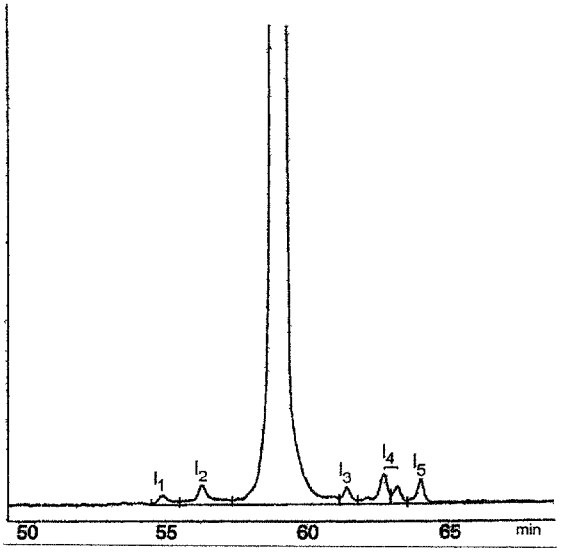

Figure 0952.-1. – *Electrophorégramme représentatif de la somatropine*

Solution à examiner (a). Préparez une solution de la substance à examiner contenant 1 mg/ml de somatropine.

Solution à examiner (b). Mélangez des volumes égaux de solution à examiner (a) et de solution témoin.

Solution témoin. Dissolvez le contenu d'une ampoule de *somatropine SCR* dans de l'*eau R* et complétez avec le même solvant de façon à obtenir une concentration de 1 mg/ml.

Capillaire :

– *matériau* : silice fondue non recouverte,

– *dimensions* : longueur utile = environ 70 cm, Ø = 50 µm.

Température : 30 °C.

Tampon ECZ : solution filtrée de *phosphate d'ammonium R* à 13.2 g/l ajustée à pH 6.0 avec de l'*acide phosphoreux R*.

Détection : spectrophotomètre à 195 nm.

Programmez l'auto-échantillonneur pour conserver les échantillons à 4 °C au cours de l'analyse.

Préconditionnement du capillaire : rincez le capillaire pendant 20 min avec de l'*hydroxyde de sodium 1 M*, puis pendant 10 min avec de l'*eau R* et pendant 20 min avec le tampon ECZ.

Rinçage avant chaque analyse : rincez le capillaire pendant 2 min avec de l'*hydroxyde de sodium 0,1 M*, puis pendant 6 min avec le tampon ECZ.

Injection : solution à examiner (a) et solution témoin ; sous pression ou sous vide, selon la séquence suivante : injection de l'échantillon (3 s), puis du tampon ECZ (1 s).

Migration : appliquez pendant 80 min un champ électrique de 217 V/cm (soit 20 kV pour les capillaires d'une longueur totale de 92 cm), en utilisant le tampon ECZ comme solution électrolytique dans les 2 réservoirs de tampon.

Migration relative par rapport à la somatropine : forme clivée = 0,94-0,98 ; Gln-18 somatropine = 1,02-1,06 ; formes désamidées = 1,06-1,11.

Conformité du système[1] : solution témoin :

– l'électrophorégramme obtenu est semblable à l'*électrophorégramme de référence de la somatropine de la Ph. Eur.* ; 2 pics (I_1, I_2) élués avant le pic principal et 3 pics (I_3, I_4, I_5) élués après le pic principal sont nettement visibles. *Note : le pic I_2 correspond à la forme clivée, le pic I_3 à la Gln-18 somatropine et le pic I_4 aux formes désamidées, qui sont éluées sous forme de doublet.*

Limites :

– *formes désamidées* : au maximum 6,5 pour cent,

– *toute autre impureté* : pour chaque impureté, au maximum 2,0 pour cent,

– *total* : au maximum 11,5 pour cent.

Eau (*2.5.32*) : au maximum 3,0 pour cent, sauf exception justifiée et autorisée.

Endotoxines bactériennes (*2.6.14*) : moins de 5 UI/mg.

DOSAGE

Chromatographie d'exclusion (*2.2.30*) selon les indications de l'essai du dimère et des substances apparentées de masse moléculaire supérieure.

Calculez la teneur en somatropine ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) à partir de la surface des pics des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin et de la teneur déclarée en $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ de la *somatropine SCR.*

CONSERVATION

En récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable, à une température de 2 °C à 8 °C.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

– la quantité de somatropine contenue dans le récipient, en milligrammes,
– la nature et le volume du solvant à utiliser pour reconstituer la préparation,
– la durée et les conditions de conservation de la préparation reconstituée,
– le nom et la quantité de toute substance ajoutée,
– la température de conservation,
– que la préparation ne doit pas être agitée pendant la reconstitution.

(1) Il est demandé aux lecteurs de proposer un critère d'acceptation pour la répétabilité de la surface des pics.