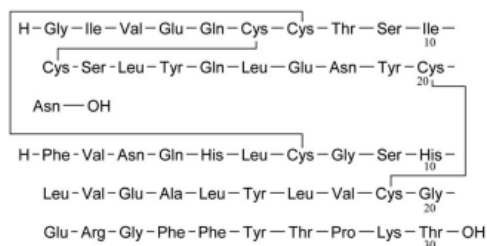


INSULINA HUMANA RECOMBINANTE



C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆ PM: 5.807,6 11061-68-0

Definición - La Insulina Humana Recombinante es una proteína bicatenaria análoga de la insulina producida por el páncreas humano. El contenido de Insulina Humana más el correspondiente a desamido insulina humana A-21, no debe ser menor de 95,0 por ciento y no mayor de 105,0 por ciento, calculado sobre la sustancia seca. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0347 mg de Insulina Humana]

PRODUCCIÓN

La Insulina Humana Recombinante se produce por métodos basados en tecnologías de ADN recombinante en *Escherichia coli* bajo condiciones controladas para minimizar el grado de contaminación microbiana.

Previo a la liberación de cada lote de materia prima se deben realizar los siguientes ensayos: contenido de *Proteínas derivadas de la célula hospedadora, incluyendo el precursor monocatenario de biosíntesis que comprende las cadenas A y B de la insulina unidas en cada caso por un péptido conector artificial*, determinado mediante un método apropiado y validado y debe cumplir además con el ensayo de *ADN derivado de la célula hospedadora y del vector*, con los límites aprobados por la Autoridad Sanitaria (ver 1120. *Productos biotecnológicos*).

Caracteres generales - Polvo blanco o casi blanco. Prácticamente insoluble en agua y en etanol. Soluble en ácidos minerales diluidos y con descomposición del producto, en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

Sustancias de referencia - Insulina Humana SR-FA, Insulina Porcina SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos herméticos, a una temperatura menor o igual a -18 °C. Cuando se

descongela, la insulina se debe conservar entre 2 y 8 °C y se debe emplear en la fabricación de preparaciones dentro de un período de tiempo corto. Para evitar la absorción de humedad durante el pesado, la insulina debe estar a temperatura ambiente.

ENSAYOS

Identificación

A - Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* debe ser similar al obtenido con la *Preparación estándar*.

B - Examinar mediante mapeo peptídico.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 10 cm × 4,6 mm, tamaño de poro de 8 nm, con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosas de 3 µm de diámetro. Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1 mL por minuto. El cromatógrafo se debe programar del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0-60	90 → 30	10 → 70	Gradiente lineal
60-65	30 → 0	70 → 100	Gradiente lineal
65-70	0	100	Isocrático

Solución reguladora de sulfato - Sulfato de amonio 2,0 M y ácido sulfúrico 0,5 M (50:50). Filtrar y ajustar a pH 2, si fuera necesario.

Solución A - Mezclar 700 mL de agua, 200 mL de *Solución reguladora de sulfato* y 100 mL de acetonitrilo para cromatografía. Filtrar y desgasificar.

Solución B - Mezclar 400 mL de acetonitrilo para cromatografía, 400 mL de agua y 200 mL de *Solución reguladora de sulfato*. Filtrar y desgasificar.

Fase móvil - Emplear mezclas de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*).

Solución de enzima - Preparar una solución a partir de un polvo liofilizado de *Staphylococcus aureus* cepa V-8 en agua grado HPLC para obtener una concentración de 1 mg por mL de proteasa la cual contiene una actividad

comprendida entre 500-1.000 unidades por mg de sólido.

Solución reguladora de HEPES - Transferir 2,38 g de HEPES (ácido *N*-(2-hidroxiethyl) piperazina *N'*-2-etanosulfónico) a un matraz aforado de 100 mL, disolver con aproximadamente 90 mL de agua. Ajustar a pH 7,5 con hidróxido de sodio 5 M, completar a volumen con agua y mezclar.

Solución de digestión muestra - Preparar una solución de 2 mg por mL de Insulina Humana en ácido clorhídrico 0,01 M y transferir 500 µL de la solución resultante a un recipiente con tapa apropiado. Agregar 2,0 mL de *Solución reguladora de HEPES* y 400 µL de *Solución de enzima*, tapar e incubar a 25 °C durante 6 horas. Inhibir el proceso de digestión agregando 2,9 mL de *Solución reguladora de sulfato*.

Solución de digestión estándar - Preparar al mismo tiempo y de la misma manera que la *Solución de digestión de la muestra*, pero empleando Insulina Humana SR-FA.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de digestión muestra* y la *Solución de digestión estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: en el cromatograma obtenido a partir de la *Solución de digestión estándar* identificar los picos debidos a los fragmentos de digestión I, II y III. El factor de asimetría de los picos de los fragmentos de digestión II y III no debe ser mayor de 1,5; la resolución *R* entre los mismos no debe ser menor de 3,4.

Procedimiento- Realizar un blanco en las condiciones descritas en *Sistema cromatográfico*. Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución de digestión del estándar* y la *Solución de digestión de la muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de todos los picos: el cromatograma obtenido con la *Solución de digestión de la muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Solución de digestión del estándar*. [NOTA: dejar equilibrar el sistema en las condiciones iniciales durante 15 minutos entre cada inyección.]

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando la Insulina Humana esté destinada a la preparación de formas farmacéuticas inyectables sin posterior tratamiento de eliminación de endotoxinas bacterianas por un procedimiento apropiado, debe contener menos de 10 Unidades de Endotoxina por mg.

Pérdida por secado <680>

Pesar exactamente alrededor de 200 mg de Insulina Humana y secar a 105 °C durante 24 horas: no debe perder más de 10,0 % de su peso.

Residuo de ignición <270>

No más de 2,5 %, determinado a partir de 200 mg de Insulina Humana y calculado sobre la sustancia seca.

Ensayos de esterilidad <370>

Cuando la Insulina Humana esté destinada a la preparación de formas farmacéuticas inyectables sin posterior tratamiento de esterilización, debe cumplir con los requisitos.

Proteínas relacionadas

Solución A, Solución B, Preparación muestra Preparación estándar, Preparación estándar diluída para linealidad y Solución de resolución.

- Proceder según se indica en *Valoración*.

[NOTA: mantener las soluciones entre 2 y 10 °C y emplear dentro de las 24 horas siguientes.]

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Valoración*, programando el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0 - 30	42	58	Isocrático
30 - 44	42→11	58→89	Gradiente lineal
44 - 50	11	89	Isocrático

Fase móvil - Emplear mezclas variables de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Determinar la resolución y linealidad procediendo según se indica en *Aptitud del sistema* en *Valoración*. El perfil del gradiente puede ajustarse para asegurar la elución completa de todas las impurezas relacionadas de la insulina.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación muestra* y de la *Preparación estándar*. Registrar los cromatogramas aproximadamente durante 50 minutos y medir las respuestas de los picos. Si fuese necesario, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µL según los resultados obtenidos en la linealidad. En el cromatograma obtenido con la *Preparación estándar*, la desamido insulina humana A-21 aparece como un pequeño pico

después del pico principal y tiene un tiempo de retención de aproximadamente 1,3 con respecto al pico principal. En el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra*, la respuesta del pico correspondiente a desamido insulina humana A-21 no debe ser mayor que 2,0 % de la respuesta total de los picos. La suma de áreas de todos los picos, a excepción de los picos de la insulina humana y de la desamido insulina humana A21, no debe ser mayor del 2 % de la respuesta total de los picos.

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina

Sistema cromatográfico - Examinar la Insulina Humana por cromatografía de exclusión por tamaño molecular, empleando un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de 30 cm × 7,5 mm con fase estacionaria constituida por gel de sílice hidrofílico de 5 a 10 µm de diámetro con un tamaño de poro de 12 – 12,5 nm, en un grado apropiado para la separación del monómero de Insulina de los dímeros y polímeros. El caudal debe ser aproximadamente 0,5 mL por minuto.

Solución de arginina - Preparar una solución de L-arginina en agua de aproximadamente 1 mg por mL.

Fase móvil - Solución de arginina, acetonitrilo y ácido acético glacial (65:20:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver Aptitud del sistema en 100. *Cromatografía*).

Solución de resolución - Emplear una solución de insulina de aproximadamente 4 mg por mL, que contenga más de 0,4 % de proteínas de alto peso molecular. Se puede emplear una preparación inyectable de insulina, tanto si es una solución como una suspensión, que ha sido aclarada con una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 M, que contenga el porcentaje indicado de proteínas de elevada masa molecular o una solución preparada a partir de insulina en polvo, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 M. Esta última se puede preparar dejando en reposo la insulina en polvo a temperatura ambiente durante 10 días aproximadamente. [NOTA: mantener la temperatura de las soluciones entre 2 y 10 °C y emplearlas en un lapso de 7 días].

Solución muestra - Disolver 4 mg de insulina en 1,0 mL de ácido clorhídrico 0,01 M. [NOTA: si se emplea un inyector automático, mantener la temperatura entre 2 y 10 °C.]

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Equilibrar la columna mediante al menos tres inyecciones repetidas de *Solución de resolución*. La columna está equilibrada cuando se obtienen resultados repetitivos en dos inyecciones consecutivas. Cromatografiar la *Solución de*

resolución y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención deben ser de 13 a 17 minutos para los complejos de insulina poliméricos; aproximadamente 17,5 minutos para los dímeros de insulina covalentes; aproximadamente 20 minutos para los monómeros de insulina, y aproximadamente 22 minutos para las sales; la resolución *R* definida por la relación entre la altura del pico del dímero y la altura del valle de separación entre los picos del monómero y del dímero debe ser mayor o igual de 2,0.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo 100 µL de la *Solución muestra*, registrar el cromatograma aproximadamente durante 35 minutos y medir las respuestas de los picos, ignorando cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el del pico de la insulina. La suma de las respuestas de los picos con un tiempo de retención menor que el del pico principal no debe ser mayor de 1,0 % de la respuesta total de los picos.

Cinc

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad apropiada de cinc en ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una solución de aproximadamente 5 mg por mL.

Soluciones estándar - Emplear soluciones recientemente preparadas que contengan 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 y 1,6 µg de cinc por mL, preparadas en el momento de su uso por dilución de la *Solución madre del estándar* con ácido clorhídrico 0,01 M. *Solución muestra* - Disolver 50,0 mg de Insulina Humana en ácido clorhídrico 0,01 M y diluir a 25,0 mL con el mismo ácido. Si fuera necesario, diluir con ácido clorhídrico 0,01 M hasta obtener una concentración de aproximadamente 0,4 a 1,6 µg de cinc por mL.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de las *Soluciones estándar* y de la *Solución muestra* en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm; con un espectrofotómetro de absorción atómica (ver 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*) equipado con una lámpara de cinc de cátodo hueco y una llama de acetileno-aire (aproximadamente 2 litros de acetileno y 11 litros de aire por minuto). Graficar las absorbancias de las *Soluciones estándar* en función de la concentración en µg por mL de cinc y determinar la concentración de cinc en µg por mL en la *Solución muestra*. No debe contener más de 1 % de cinc, calculado sobre la sustancia seca.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida

por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1 mL por minuto.

Solución A - Disolver 28,4 g de sulfato de sodio anhidro en 1 litro de agua, agregar 2,7 mL de ácido fosfórico y ajustar a pH 2,3 con etanolamina, si fuera necesario. Filtrar y desgasificar.

Solución B - Mezclar 550 mL de *Solución A* con 450 mL de acetonitrilo. Calentar la solución a una temperatura no inferior a 20 °C con el fin de evitar la precipitación (la mezcla es endotérmica). Filtrar y desgasificar.

Fase móvil - Emplear una mezcla de *Solución B* y *Solución A* (58:42). Filtrar y desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

Preparación estándar - Disolver el contenido de un vial de estándar de Insulina Humana SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una solución de aproximadamente 4 mg por mL.

Preparación estándar diluida para linealidad - Transferir 1,0 mL de la *Preparación estándar* a un matraz aforado de 10 mL, completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 M y mezclar.

Preparación estándar de insulina porcina - Disolver el contenido de un vial de estándar de Insulina Porcina SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una concentración de 4 mg por mL.

Solución de resolución - Emplear una mezcla de 1,0 mL de *Preparación estándar* y 1,0 mL de *Preparación estándar de insulina porcina*.

Preparación muestra - Pesar exactamente alrededor de 40 mg de Insulina Humana, disolver en ácido clorhídrico 0,01 M y diluir a 10,0 mL con el mismo solvente.

[NOTA: mantener las soluciones a una temperatura entre 2 y 8 °C y emplearlas dentro de las 48 horas siguientes. Si se emplea un inyector automático, mantener la temperatura entre 2 y 8°C.]

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* y la *Preparación estándar de insulina porcina*, registrar las respuestas de los picos de la *Solución de resolución* hasta que la respuesta correspondiente al pico de insulina porcina se registre. En el cromatograma obtenido con la *Solución de resolución*, identificar los picos correspondientes a insulina porcina e insulina humana: la resolución R entre los picos no debe ser menor de 1,2. Si fuera necesario, ajustar la concentración de acetonitrilo en la *Fase móvil* hasta lograr la resolución requerida. Cromatografiar la *Preparación estándar* y la *Preparación estándar diluida para linealidad*, registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el ensayo sólo es válido si la respuesta del pico principal en el cromatograma

obtenido a partir la *Preparación estándar* es $10 \pm 0,5$ veces la respuesta del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Preparación estándar diluida para linealidad*. Si el ensayo no es válido, ajustar el volumen de inyección entre 10 y 20 µL, con el fin de que la respuesta esté comprendida en el intervalo de linealidad del detector.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el contenido en Insulina Humana, más el correspondiente a la desamido insulina humana A-21, a partir de la respuesta del pico principal y de la respuesta del pico debido a la desamido insulina humana A-21 en los cromatogramas obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar A*, y el contenido declarado de Insulina Humana más el de la desamido insulina humana A-21 en la Insulina Humana SR-FA.