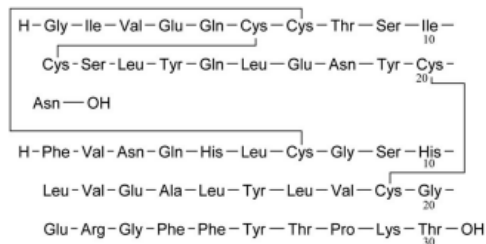


INSULINA HUMANA RECOMBINANTE



$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ 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 inactínicos 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

58 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

93 ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema* en
 94 *100. Cromatografía*).
 95 *Solución de enzima* - Preparar una solución a
 96 partir de un polvo liofilizado de *Staphylococcus*
 97 *aureus* cepa V-8 en agua grado HPLC para
 98 obtener una concentración de 1 mg por mL de
 99 proteasa la cual contiene una actividad
 100 comprendida entre 500-1.000 unidades por mg
 101 de sólido.
 102 *Solución reguladora de HEPES* - Transferir 2,38
 103 g de HEPES (ácido *N*-(2-hidroxietil) piperazina
 104 *N'*-2-etanosulfónico) a un matraz aforado de 100
 105 mL, disolver con aproximadamente 90 mL de
 106 agua. Ajustar a pH 7,5 con hidróxido de sodio 5
 107 M, completar a volumen con agua y mezclar.
 108 *Solución de digestión muestra* - Preparar una
 109 solución de 2 mg por mL de Insulina Humana en
 110 ácido clorhídrico 0,01 M y transferir 500 µL de
 111 la solución resultante a un recipiente con tapa
 112 apropiado. Agregar 2,0 mL de *Solución*
 113 *reguladora de HEPES* y 400 µL de *Solución de*
 114 *enzima*, tapar e incubar a 25 °C durante 6 horas.
 115 Inhibir el proceso de digestión agregando 2,9 mL
 116 de *Solución reguladora de sulfato*.
 117 *Solución de digestión estándar* - Preparar al
 118 mismo tiempo y de la misma manera que la
 119 *Solución de digestión de la muestra*, pero
 120 empleando Insulina Humana SR-FA.
 121 *Aptitud del sistema* (ver *100. Cromatografía*) -
 122 Cromatografiar la *Solución de digestión muestra*
 123 y la *Solución de digestión estándar* y registrar las
 124 respuestas de los picos según se indica en
 125 *Procedimiento*: en el cromatograma obtenido a
 126 partir de la *Solución de digestión estándar*
 127 identificar los picos debidos a los fragmentos de
 128 digestión I, II y III. El factor de asimetría de los
 129 picos de los fragmentos de digestión II y III no
 130 debe ser mayor de 1,5; la resolución *R* entre los
 131 mismos no debe ser menor de 3,4.
 132 *Procedimiento*- Realizar un blanco en las
 133 condiciones descritas en *Sistema cromatográfico*.
 134 Inyectar por separado en el cromatógrafo
 135 volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de
 136 la *Solución de digestión del estándar* y la
 137 *Solución de digestión de la muestra*, registrar los
 138 cromatogramas y medir las respuestas de todos
 139 los picos: el cromatograma obtenido con la
 140 *Solución de digestión de la muestra* se debe
 141 corresponder con el obtenido con la *Solución de*
 142 *digestión del estándar*. [NOTA: dejar equilibrar
 143 el sistema en las condiciones iniciales durante 15
 144 minutos entre cada inyección.]
 145 **Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>**
 146 Cuando la Insulina Humana esté destinada a la
 147 preparación de formas farmacéuticas inyectables
 148 sin posterior tratamiento de eliminación de
 149 endotoxinas bacterianas por un procedimiento
 150 apropiado, debe contener menos de 10 Unidades
 151 de Endotoxina por mg.

152 **Pérdida por secado <680>**
 153 Pesar exactamente alrededor de 200 mg
 154 de Insulina Humana y secar a 105 °C
 155 durante 24 horas: no debe perder más de
 156 10,0 % de su peso.

157 **Residuo de ignición <270>**
 158 No más de 2,5 %, determinado a partir de
 159 200 mg de Insulina Humana y calculado
 160 sobre la sustancia seca.

161 **Ensayos de esterilidad <370>**
 162 Cuando la Insulina Humana esté
 163 destinada a la preparación de formas
 164 farmacéuticas inyectables sin posterior
 165 tratamiento de esterilización, debe
 166 cumplir con los requisitos.

167 **Proteínas relacionadas**
 168 *Solución A, Solución B, Preparación*
 169 *muestra Preparación estándar,*
 170 *Preparación estándar diluida para*
 171 *linealidad y Solución de resolución.* -
 172 Proceder según se indica en *Valoración*.
 173 [NOTA: mantener las soluciones entre 2 y
 174 10 °C y emplear dentro de las 24 horas
 175 siguientes.]
 176 *Sistema cromatográfico* - Proceder según
 177 se indica en *Valoración*, programando el
 178 cromatógrafo del siguiente modo:
 179

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

180 *Fase móvil* - Emplear mezclas variables
 181 de *Solución A* y *Solución B* según se
 182 indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer
 183 los ajustes necesarios (ver *Aptitud del*
 184 *sistema* en *100. Cromatografía*).
 185 *Aptitud del sistema* (ver *100.*
 186 *Cromatografía*) - Determinar la
 187 resolución y linealidad procediendo según
 188 se indica en *Aptitud del sistema* en
 189 *Valoración*. El perfil del gradiente puede
 190 ajustarse para asegurar la elución
 191 completa de todas las impurezas
 192 relacionadas de la insulina.

193 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el
 194 cromatógrafo volúmenes iguales
 195 (aproximadamente 20 µL) de la *Preparación*
 196 *muestra* y de la *Preparación estándar*. Registrar
 197 los cromatogramas aproximadamente durante 50
 198 minutos y medir las respuestas de los picos. Si
 199 fuese necesario, ajustar el volumen de inyección
 200 entre 10 y 20 µL según los resultados obtenidos
 201 en la linealidad. En el cromatograma obtenido
 202 con la *Preparación estándar*, la desamido
 203 insulina humana A-21 aparece como un pequeño
 204 pico después del pico principal y tiene un tiempo
 205 de retención de aproximadamente 1,3 con
 206 respecto al pico principal. En el cromatograma
 207 obtenido a partir de la *Preparación muestra*, la
 208 respuesta del pico correspondiente a desamido
 209 insulina humana A-21 no debe ser mayor que 2,0
 210 % de la respuesta total de los picos. La suma de
 211 áreas de todos los picos, a excepción de los picos
 212 de la insulina humana y de la desamido insulina
 213 humana A21, no debe ser mayor del 2 % de la
 214 respuesta total de los picos.

215 **Impurezas con peso molecular mayor que la insulina**

216 *Sistema cromatográfico* - Examinar la Insulina
 217 Humana por cromatografía de exclusión por
 218 tamaño molecular, empleando un equipo para
 219 cromatografía de líquidos con un detector
 220 ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de
 221 ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de
 222 30 cm × 7,5 mm con fase estacionaria constituida
 223 por gel de sílice hidrofílico de 5 a 10 µm de
 224 diámetro con un tamaño de poro de 12 – 12,5
 225 nm, en un grado apropiado para la separación del
 226 monómero de Insulina de los dímeros y
 227 polímeros. El caudal debe ser aproximadamente
 228 0,5 mL por minuto.

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

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

236 *Solución de resolución* - Emplear una solución
 237 de insulina de aproximadamente 4 mg por mL,
 238 que contenga más de 0,4 % de proteínas de alto
 239 peso molecular. Se puede emplear una
 240 preparación inyectable de insulina, tanto si es una
 241 solución como una suspensión, que ha sido
 242 aclarada con una cantidad suficiente de ácido
 243 clorhídrico 6 M, que contenga el porcentaje
 244 indicado de proteínas de elevada masa molecular
 245 o una solución preparada a partir de insulina en
 246 polvo, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 M. Esta
 247 última se puede preparar dejando en reposo la
 248 insulina en polvo a temperatura ambiente durante

249 10 días aproximadamente. [NOTA:
 250 mantener la temperatura de las soluciones
 251 entre 2 y 10 °C y emplearlas en un lapso
 252 de 7 días].

253 *Solución muestra* - Disolver 4 mg de
 254 insulina en 1,0 mL de ácido clorhídrico
 255 0,01 M. [NOTA: si se emplea un inyector
 256 automático, mantener la temperatura entre
 257 2 y 10 °C.]

258 *Aptitud del sistema* (ver 100.
 259 *Cromatografía*) - Equilibrar la columna
 260 mediante al menos tres inyecciones
 261 repetidas de *Solución de resolución*. La
 262 columna está equilibrada cuando se
 263 obtienen resultados repetitivos en dos
 264 inyecciones consecutivas. Cromatografiar
 265 la *Solución de resolución* y registrar las
 266 respuestas de los picos según se indica en
 267 *Procedimiento*: los tiempos de retención
 268 deben ser de 13 a 17 minutos para los
 269 complejos de insulina poliméricos;
 270 aproximadamente 17,5 minutos para los
 271 dímeros de insulina covalentes;
 272 aproximadamente 20 minutos para los
 273 monómeros de insulina, y
 274 aproximadamente 22 minutos para las
 275 sales; la resolución *R* definida por la
 276 relación entre la altura del pico del dímero
 277 y la altura del valle de separación entre
 278 los picos del monómero y del dímero
 279 debe ser mayor o igual de 2,0.

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

292 **Cinc**

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

298 *Soluciones estándar* - Emplear soluciones
 299 recientemente preparadas que contengan
 300 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 y 1,6 µg de cinc por mL,
 301 preparadas en el momento de su uso por
 302 dilución de la *Solución madre del*
 303 *estándar* con ácido clorhídrico 0,01 M.

304 *Solución muestra* - Disolver 50,0 mg de
 305 Insulina Humana en ácido clorhídrico
 306 0,01 M y diluir a 25,0 mL con el mismo
 307 ácido. Si fuera necesario, diluir con ácido

308 clorhídrico 0,01 M hasta obtener una
 309 concentración de aproximadamente 0,4 a 1,6 µg
 310 de cinc por mL.
 311 *Procedimiento* - Determinar las absorbancias de
 312 las *Soluciones estándar* y de la *Solución muestra*
 313 en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm; con
 314 un espectrofotómetro de absorción atómica (ver
 315 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión*
 316 *atómica*) equipado con una lámpara de cinc de
 317 cátodo hueco y una llama de acetileno-aire
 318 (aproximadamente 2 litros de acetileno y 11
 319 litros de aire por minuto). Graficar las
 320 absorbancias de las *Soluciones estándar* en
 321 función de la concentración en µg por mL de
 322 cinc y determinar la concentración de cinc en µg
 323 por mL en la *Solución muestra*. No debe
 324 contener más de 1 % de cinc, calculado sobre la
 325 sustancia seca.

326 VALORACIÓN

327 *Sistema cromatográfico* - Emplear un equipo
 328 para cromatografía de líquidos con un detector
 329 ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de
 330 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida
 331 por octadecilsilano químicamente unido a
 332 partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro.
 333 Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser
 334 aproximadamente 1 mL por minuto.
 335 *Solución A* - Disolver 28,4 g de sulfato de sodio
 336 anhidro en 1 litro de agua, agregar 2,7 mL de
 337 ácido fosfórico y ajustar a pH 2,3 con
 338 etanolamina, si fuera necesario. Filtrar y
 339 desgasificar.
 340 *Solución B* - Mezclar 550 mL de *Solución A* con
 341 450 mL de acetonitrilo. Calentar la solución a
 342 una temperatura no inferior a 20 °C con el fin de
 343 evitar la precipitación (la mezcla es
 344 endotérmica). Filtrar y desgasificar.
 345 *Fase móvil* - Emplear una mezcla de *Solución B*
 346 y *Solución A* (58:42). Filtrar y desgasificar.
 347 Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del*
 348 *sistema* en 100. *Cromatografía*).
 349 *Preparación estándar* - Disolver el contenido de
 350 un vial de estándar de Insulina Humana SR-FA
 351 en ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una
 352 solución de aproximadamente 4 mg por mL.
 353 *Preparación estándar diluida para linealidad* -
 354 Transferir 1,0 mL de la *Preparación estándar* a
 355 un matraz aforado de 10 mL, completar a
 356 volumen con ácido clorhídrico 0,01 M y mezclar.
 357 *Preparación estándar de insulina porcina* -
 358 Disolver el contenido de un vial de estándar de
 359 Insulina Porcina SR-FA en ácido clorhídrico 0,01
 360 M para obtener una concentración de 4 mg por
 361 mL.
 362 *Solución de resolución* - Emplear una mezcla de
 363 1,0 mL de *Preparación estándar* y 1,0 mL de
 364 *Preparación estándar de insulina porcina*.

365 *Preparación muestra* - Pesar exactamente
 366 alrededor de 40 mg de Insulina Humana,
 367 disolver en ácido clorhídrico 0,01 M y
 368 diluir a 10,0 mL con el mismo solvente.
 369 [NOTA: mantener las soluciones a una
 370 temperatura entre 2 y 8 °C y emplearlas
 371 dentro de las 48 horas siguientes. Si se
 372 emplea un inyector automático, mantener
 373 la temperatura entre 2 y 8°C.]
 374 *Aptitud del sistema* (ver 100.
 375 *Cromatografía*) - Cromatografiar la
 376 *Solución de resolución* y la *Preparación*
 377 *estándar de insulina porcina*, registrar las
 378 respuestas de los picos de la *Solución de*
 379 *resolución* hasta que la respuesta
 380 correspondiente al pico de insulina
 381 porcina se registre. En el cromatograma
 382 obtenido con la *Solución de resolución*,
 383 identificar los picos correspondientes a
 384 insulina porcina e insulina humana: la
 385 resolución R entre los picos no debe ser
 386 menor de 1,2. Si fuera necesario, ajustar
 387 la concentración de acetonitrilo en la
 388 *Fase móvil* hasta lograr la resolución
 389 requerida. Cromatografiar la *Preparación*
 390 *estándar* y la *Preparación estándar*
 391 *diluida para linealidad*, registrar las
 392 respuestas de los picos según se indica en
 393 *Procedimiento*: el ensayo sólo es válido si
 394 la respuesta del pico principal en el
 395 cromatograma obtenido a partir la
 396 *Preparación estándar* es $10 \pm 0,5$ veces la
 397 respuesta del pico principal en el
 398 cromatograma obtenido con la
 399 *Preparación estándar diluida para*
 400 *linealidad*. Si el ensayo no es válido,
 401 ajustar el volumen de inyección entre 10 y
 402 20 µL, con el fin de que la respuesta esté
 403 comprendida en el intervalo de linealidad
 404 del detector.
 405 *Procedimiento* - Inyectar por separado en
 406 el cromatógrafo volúmenes iguales
 407 (aproximadamente 20 µL) de la
 408 *Preparación muestra* y la *Preparación*
 409 *estándar*, registrar los cromatogramas y
 410 medir las respuestas de los picos. Calcular
 411 el contenido en Insulina Humana, más el
 412 correspondiente a la desamido insulina
 413 humana A-21, a partir de la respuesta del
 414 pico principal y de la respuesta del pico
 415 debido a la desamido insulina humana A-
 416 21 en los cromatogramas obtenidos a
 417 partir de la *Preparación muestra* y la
 418 *Preparación estándar A*, y el contenido
 419 declarado de Insulina Humana más el de
 420 la desamido insulina humana A-21 en la
 421 Insulina Humana SR-FA.
 422
 423
 424