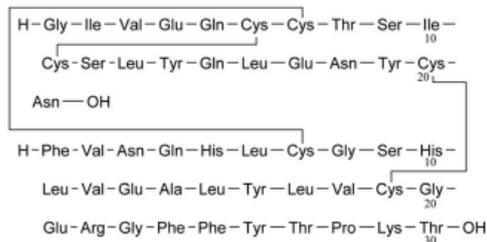


# INSULINA HUMANA RECOMBINANTE



5  
6  $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$  PM: 5.807,6 11061-68-0

7  
8 **Definición** - La Insulina Humana Recombinante  
9 es una proteína bicatenaria análoga de la insulina  
10 producida por el páncreas humano.

11 El contenido de Insulina Humana más el  
12 correspondiente a desamido insulina humana A-  
13 21, no debe ser menor de 95,0 por ciento y no  
14 mayor de 105,0 por ciento, calculado sobre la  
15 sustancia seca. [NOTA: una Unidad  
16 Internacional de Insulina equivale a 0,0347 mg  
17 de Insulina Humana]

## PRODUCCIÓN

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

25 Previo a la liberación de cada lote de materia  
26 prima se deben realizar los siguientes ensayos:  
27 contenido de *Proteínas derivadas de la célula*  
28 *hospedadora, incluyendo el precursor*  
29 *monocatenario de biosíntesis que comprende las*  
30 *cadena A y B de la insulina unidas en cada caso*  
31 *por un péptido conector artificial*, determinado  
32 mediante un método apropiado y validado y debe  
33 cumplir además con el ensayo de *ADN derivado*  
34 *de la célula hospedadora y del vector*, con los  
35 límites aprobados por la Autoridad Sanitaria (ver  
36 1120. *Productos biotecnológicos*).

37  
38 **Caracteres generales** - Polvo blanco o casi  
39 blanco. Prácticamente insoluble en agua y en  
40 etanol. Soluble en ácidos minerales diluidos y  
41 con descomposición del producto, en soluciones  
42 diluidas de hidróxidos alcalinos.

43 **Sustancias de referencia** - Insulina Humana SR-  
44 FA, Insulina Porcina SR-FA.

## CONSERVACIÓN

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

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

## ENSAYOS

### 58 Identificación

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

65 **B** - Examinar mediante mapeo peptídico.  
66 *Sistema cromatográfico* - Emplear un  
67 equipo para cromatografía de líquidos con  
68 un detector ultravioleta ajustado a 214 nm  
69 y una columna de 10 cm × 4,6 mm,  
70 tamaño de poro de 8 nm, con fase  
71 estacionaria constituida por  
72 octadecilsilano químicamente unido a  
73 partículas de sílice porosas de 3 µm de  
74 diámetro. Mantener la columna a 40 °C.  
75 El caudal debe ser aproximadamente 1  
76 mL por minuto. El cromatógrafo se debe  
77 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

78 *Solución reguladora de sulfato* - Sulfato  
79 de amonio 2,0 M y ácido sulfúrico 0,5 M  
80 (50:50). Filtrar y ajustar a pH 2, si fuera  
81 necesario.

82 *Solución A* - Mezclar 700 mL de agua,  
83 200 mL de *Solución reguladora de*  
84 *sulfato* y 100 mL de acetonitrilo para  
85 cromatografía. Filtrar y desgasificar.

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

90 *Fase móvil* - Emplear mezclas de  
91 *Solución A* y *Solución B* según se indica  
92 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 ± 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