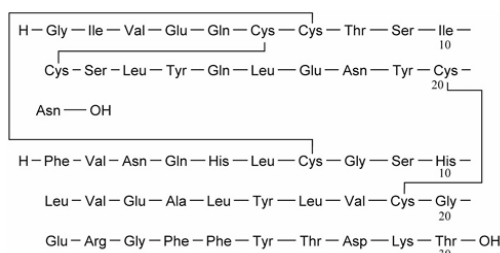


INSULINA ASPÁRTICA



$C_{256}H_{381}N_{65}O_{79}S_6$ PM: 5.826 116094-23-6

Definición - La Insulina Aspartica es 28^B-L-aspartato insulina (humana). Es un péptido de dos cadenas que contiene 51 aminoácidos. La cadena A está compuesta por 21 aminoácidos y la cadena B por 30 aminoácidos. Su estructura primaria es idéntica a la de la insulina humana, excepto que contiene un ácido aspártico en lugar de prolina en la posición 28 de la cadena B. Al igual que en la insulina humana, Insulina Aspartica contiene dos enlaces disulfuro entre cadenas y un enlace disulfuro dentro de la cadena. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 104,0 por ciento de la sumatoria de insulina aspartica $C_{256}H_{381}N_{65}O_{79}S_6$, insulina aspartica A21Asp, insulina aspartica B3Asp, insulina aspartica B3isoAsp e insulina aspartica B28isoAsp, calculado sobre la sustancia seca. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0350 mg de insulina aspartica]. Insulina Aspartica debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

La Insulina Aspartica se produce mediante un método basado en la tecnología del ADN recombinante (ADNr) en condiciones diseñadas para minimizar el grado de contaminación microbiana. Previo a la liberación de cada lote de materia prima se deben realizar los siguientes ensayos, a menos que la autoridad competente haya concedido una exención: *Proteínas derivadas de células huésped* y *Precursor monocatenario*; con los límites aprobados por la Autoridad Sanitaria (ver 1120. *Productos biotecnológicos*).

Caracteres generales - Polvo blanco o casi blanco. Prácticamente insoluble en etanol, en metanol y en soluciones acuosas con un pH de aproximadamente 5,1. En soluciones acuosas con un pH inferior a 3,5 o superior a 6,5 la solubilidad es mayor o igual a 25 mg por mL.

Sustancia de referencia - Insulina Aspartica SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos herméticos, a una temperatura menor o igual a -18 °C. Una vez que se descongela, se debe conservar entre 2 y 8 °C y se debe emplear en la fabricación de preparaciones dentro de un período de tiempo corto. La Insulina Aspartica debe estar a temperatura ambiente antes de abrir el envase para evitar la absorción de humedad durante la pesada.

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 corresponder con el 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, con un tamaño de poro de 8 nm, con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 µm de diámetro. Mantener la temperatura de la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo 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
70 - 75	90	10	Re-equilibrio

Solución reguladora de sulfato pH 2,0 -

Disolver 132,1 g de sulfato de amonio en agua y diluir 500,0 mL con el mismo solvente (Solución 1). Por otro lado, mezclar 14 mL de ácido sulfúrico en aproximadamente 400 mL de agua con enfriamiento constante; dejar enfriar y diluir a 500,0 mL con agua (Solución 2). Mezclar volúmenes iguales de ambas soluciones y ajustar a pH 2,0 si fuera necesario.

Solución A - Agua, *Solución reguladora de sulfato pH 2,0* y acetonitrilo (70:20:10). Filtrar y desgasificar.

Solución B - Acetonitrilo, agua y *Solución reguladora de sulfato pH 2,0* (40:40:20). Filtrar y desgasificar.

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

104 *Solución de enzima* - Preparar una solución a
105 partir de un polvo liofilizado de proteasa V8 de
106 *Staphylococcus aureus cepa V8, tipo XVII-B* en
107 agua para obtener una concentración de 1 mg por
108 mL de proteasa.

109 *Solución reguladora de HEPES* - Transferir
110 2,38 g de HEPES (ácido *N*-(2-hidroxietil)
111 piperazina *N'*-2-etanosulfónico) a un matraz
112 aforado de 100 mL, disolver con
113 aproximadamente 90 mL de agua. Ajustar a pH
114 7,5 con hidróxido de sodio 5 M, completar a
115 volumen con agua y mezclar.

116 *Solución de digestión muestra* - Preparar una
117 solución de 2 mg por mL de Insulina Aspártica
118 en ácido clorhídrico 0,01 M y transferir 25 µL de
119 la solución a un recipiente apropiado con tapa.
120 Agregar 100 µL de *Solución reguladora de*
121 *HEPES* y 20 µL de *Solución de enzima*, tapar e
122 incubar a 25 °C durante 6 horas. Inhibir el
123 proceso de digestión agregando 145 µL de
124 *Solución reguladora de sulfato pH 2,0*.

125 *Solución de digestión del estándar* - Preparar
126 concomitantemente y de la misma manera que la
127 *Solución de digestión de la muestra*, pero
128 empleando Insulina Aspártica SR-FA.

129 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)
130 - Cromatografiar la *Solución de digestión*
131 *estándar* y registrar las respuestas de los picos
132 según se indica en *Procedimiento* e identificar
133 los picos debidos a los fragmentos de digestión I,
134 II y III [NOTA: los tiempos de retención de los
135 fragmentos I, II y IV son los mismos que para
136 insulina humana. El tiempo de retención del
137 fragmento III se diferencia de la insulina humana
138 debido a la sustitución de prolina por ácido
139 aspártico]; el factor de asimetría para los picos de
140 los fragmentos de digestión II y III no debe ser
141 mayor de 1,5; la resolución *R* entre los mismos
142 no debe ser menor de 8,0.

143 *Procedimiento* - Equilibrar el sistema en las
144 condiciones iniciales durante al menos 15
145 minutos y realizar un blanco en las condiciones
146 descritas en *Sistema cromatográfico*. Inyectar
147 por separado en el cromatógrafo volúmenes
148 iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución*
149 *de digestión del estándar* y la *Solución de*
150 *digestión de la muestra*. Registrar los
151 cromatogramas y medir las respuestas de todos
152 los picos: los cromatogramas obtenidos con la
153 *Solución de digestión de la muestra* y la *Solución*
154 *de digestión del estándar* deben ser
155 correspondientes.

156 **Determinación del residuo de ignición**
157 <270>

158 No más de 6,0 %; determinado a partir
159 de 200 mg de Insulina Aspártica y calculado
160 sobre la sustancia seca.

161 **Pérdida por secado** <680>

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

165 **Proteínas relacionadas**

166 *Sistema cromatográfico, Solución de*
167 *hidróxido fuerte, Solución A, Solución B,*
168 *Fase móvil, Solución de resolución y*
169 *Aptitud del sistema* - Proceder según se
170 indica en *Valoración*.

171 *Solución muestra* - Emplear la
172 *Preparación muestra de Valoración*.

173 *Procedimiento* - Inyectar en el
174 cromatógrafo aproximadamente 10 µL de la
175 *Solución muestra*. Calcular el porcentaje de
176 cada proteína relacionada con relación al
177 pico principal: la respuesta del pico
178 correspondiente a insulina aspártica
179 B28isoAsp no debe ser mayor al 1,0 %; la
180 sumatoria de las respuestas debidas a
181 insulina aspártica A21Asp, insulina
182 aspártica B3Asp y insulina aspártica
183 B3isoAsp, no debe ser mayor a 2,0 %; y, la
184 suma de las respuestas de todas las
185 impurezas restantes no debe ser mayor a 1,5
186 %.

187 **Impurezas con peso molecular mayor**
188 **que la insulina aspártica**

189 *Sistema cromatográfico* - Examinar por
190 cromatografía de exclusión por tamaño
191 molecular, empleando un equipo para
192 cromatografía de líquidos con un detector
193 ultravioleta ajustado a 276 nm y una
194 columna de 30 cm × 7,8 mm con fase
195 estacionaria constituida por gel de sílice
196 hidrofílico de 5 a 10 µm de diámetro con un
197 tamaño de poro de 12 – 12,5 nm, en un
198 grado apropiado para la separación del
199 monómero de insulina de los dímeros y
200 polímeros. El caudal debe ser
201 aproximadamente 0,5 mL por minuto.

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

205 *Fase móvil - Solución de arginina,*
206 *acetonitrilo y ácido acético glacial*
207 *(65:20:15)*. Filtrar y desgasificar. Hacer los
208 ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema*
209 *en 100. Cromatografía*).

210 *Solución de resolución* - Emplear una
211 solución de insulina de aproximadamente 4
212 mg por mL, que contenga más de 0,4 % de
213 proteínas de alto peso molecular. Se puede
214 emplear una preparación inyectable de
215 insulina aspártica, tanto si es una solución

como una suspensión, que ha sido aclarada con una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 M, para que contenga el porcentaje indicado de proteínas de elevada masa molecular o se puede utilizar una solución preparada a partir de insulina aspártica, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 M. También puede obtenerse, dejando reposar insulina aspártica en polvo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 días. [NOTA: conservar entre 2 y 8 °C y usar dentro de los 7 días].

Solución muestra - Disolver 4 mg de Insulina Aspártica en 1,0 mL de ácido clorhídrico 0,01 M. [NOTA: conservar entre 2 y 8 °C y usar dentro de las 48 hs].

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución de resolución* al menos tres veces según se indica en *Procedimiento*: se deben obtener resultados repetitivos en dos inyecciones consecutivas para verificar que la columna esté equilibrada. Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención deben estar entre 13 y 17 minutos para los complejos de insulina aspártica poliméricos; aproximadamente 17,5 minutos para los dímeros de insulina aspártica; aproximadamente 20 minutos para el monómero de insulina aspártica y aproximadamente 22 minutos para las sales; la relación pico/valle *p/v* determinada por la relación entre la altura del pico del dímero *H_p* y la altura del valle de separación entre los picos del monómero y del dímero *H_v* debe ser mayor o igual a 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. Ignorar cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el pico de insulina aspártica monómero. La suma de las respuestas de los picos con un tiempo de retención menor que el pico principal no debe ser mayor de 0,5 % de la respuesta total de los picos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando Insulina Aspártica 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.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 4,0 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a

partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener la temperatura de la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0 - 35	58	42	Isocrático
35 - 40	58→20	42→80	Gradiente lineal
40 - 45	20	80	Isocrático
45 - 46	20→58	80→42	Gradiente lineal
46 - 60	58	42	Re-equilibrio

Solución de hidróxido de sodio fuerte - Disolver 42 g de hidróxido de sodio en agua y diluir a 100 mL con el mismo solvente.

Solución A - Disolver 142,0 g de sulfato de sodio anhidro en agua, agregar 13,5 mL de ácido fosfórico, diluir en 5.000 mL de agua y ajustar a pH 3,6 con *Solución de hidróxido de sodio fuerte*, si fuera necesario. Mezclar 9 volúmenes de la solución anterior con 1 volumen de acetonitrilo. Filtrar y desgasificar.

Solución B - Agua y acetonitrilo (50:50). Filtrar y desgasificar.

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*).

Preparación estándar - Disolver el contenido de un vial de Insulina Aspártica SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una solución que contenga aproximadamente 4 mg por mL de Insulina Aspártica SR-FA. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C y usar dentro de las 48 horas].

Preparación muestra - Preparar una solución que contenga aproximadamente 4 mg por mL de Insulina Aspártica en ácido clorhídrico 0,01 M. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C y usar dentro de las 24 horas].

Solución de resolución - Emplear una solución apropiada que contenga no menos de 1 % de insulina aspártica B3Asp y de insulina aspártica A21Asp. Esto se puede lograr manteniendo *Preparación estándar* a temperatura ambiente de uno a tres días. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C y usar dentro de las 72 horas].

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Cromatografiar la

Preparación estándar según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención del pico correspondiente a insulina aspártica debe encontrarse entre 20 y 24 minutos.

Cromatografiar la *Solución de resolución* según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos al pico de insulina aspártica deben ser aproximadamente 0,9 para B28isoAsp insulina aspártica; 1,3 para B3Asp insulina aspártica más A21 Asp insulina aspártica (generalmente coeluyen); 1,5 para B3isoAsp insulina aspártica; la resolución *R* entre el pico correspondiente a insulina aspártica y el pico correspondiente a insulina aspártica A21Asp e insulina aspártica B3Asp debe ser mayor o igual a 2,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $C_{256}H_{381}N_{65}O_{79}S_6$ más insulina aspártica B28isoAsp, insulina aspártica A21Asp, e insulina aspártica B3Asp e insulina aspártica B3isoAsp, en la porción de Insulina Aspártica en ensayo.