

INSULINA GLARGINA



$C_{267}H_{404}N_{72}O_{78}S_6$ PM: 6.063 160337-95-1

Definición - La Insulina Glargina es 21^A-Glicina-30^{Ba}-L-Arginina-30^{Bb}-L-Arginina-insulina (humana). Es un péptido de dos cadenas que contiene 53 aminoácidos. La cadena A está compuesta por 21 aminoácidos y la cadena B por 32 aminoácidos. Su estructura primaria es idéntica a la de la insulina humana, sólo difiere en la secuencia del aminoácido de la posición 21 de la cadena A y en el extremo C-terminal de la cadena B que contiene dos aminoácidos adicionales. En la insulina humana es Asn(21A), mientras que la insulina Glargina es Gly(21A), Arg(B31) y Arg(B32). Al igual que en la insulina humana, la Insulina Glargina contiene dos enlaces disulfuro entre cadenas y un enlace disulfuro intracadena. Insulina Glargina debe contener no menos de 94,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de $C_{267}H_{404}N_{72}O_{78}S_6$ calculado sobre la sustancia anhidra. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0364 mg de insulina glargina]. Insulina Glargina debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

La Insulina Glargina 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 higroscópico blanco o casi blanco. Prácticamente insoluble en agua y etanol anhidro. Se disuelve en ácidos minerales diluidos.

Sustancias de referencia - Insulina Glargina SR-FA. Insulina Glargina para la identificación de picos SR-FA (contiene insulina glargina y 0^A-Arg-insulina glargina).

CONSERVACIÓN

En envases inactivos herméticos, a una temperatura entre - 15 °C y - 25 °C.

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* se 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 125 cm × 3,0 mm, con fase estacionaria totalmente encapada constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas esféricas de sílice de 4 µm de diámetro. Mantener la temperatura de la columna a 35 °C. El caudal debe ser aproximadamente 0,6 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0 - 30	90 → 20	10 → 80	Gradiente lineal
30 - 35	20	80	Isocrático
35 - 40	90	10	Re-equilibrio

Solución reguladora - Disolver 11,6 g de ácido fosfórico y 42,1 g de perclorato de sodio en 1.600 mL de agua, ajustar el pH a 2,3 con trietilamina y diluir a 2.000 mL con agua.

Solución A - *Solución reguladora* y acetonitrilo (93:7). Filtrar y desgasificar.

Solución B - Acetonitrilo y *Solución reguladora* (57:43). 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*).

Solución reguladora de tris-clorhidrato 1 M, pH 7,5 - Disolver 12,11 g de tris(hidroximetil) aminometano en 90 mL

95 de agua, ajustar a pH 7,5 con ácido clorhídrico y
96 diluir a 100,0 mL con agua.

97 *Solución de enzima* - Preparar una solución a
98 partir de un polvo liofilizado de proteasa V8 de
99 *Staphylococcus aureus cepa V-8, tipo XVII-B* en
100 *Solución reguladora de tris-clorhidrato 1 M, pH*
101 7,5 para obtener una solución de
102 aproximadamente 20 unidades de proteasa por
103 mL.

104 *Solución muestra* - Preparar una solución de
105 aproximadamente 10,0 mg de Insulina Glargina
106 por mL en una solución de 1 g de ácido
107 clorhídrico por litro. Transferir 5 µL de la
108 solución a un tubo limpio y agregar 1,0 mL de
109 *Solución reguladora de tris-clorhidrato 1 M, pH*
110 7,5 y 100 µL de *Solución de enzima*. Mezclar e
111 incubar a 45 °C durante aproximadamente 2
112 horas. Detener la reacción añadiendo 2 µL de
113 ácido fosfórico.

114 *Solución estándar* - Preparar
115 concomitantemente y de la misma manera que la
116 *Solución muestra*, una solución que contenga
117 Insulina Glargina SR-FA en lugar de la sustancia
118 en ensayo.

119 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)
120 - Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar
121 las respuestas de los picos según se indica en
122 *Procedimiento*: los tiempos de retención del
123 fragmento de digestión II de insulina glargina y
124 el fragmento de digestión III de insulina glargina
125 deben ser aproximadamente 14 minutos y 15
126 minutos, respectivamente. [NOTA: los tiempos
127 de retención de los fragmentos I y IV son los
128 mismos que para insulina humana. Los tiempos
129 de retención de los fragmentos II y III difieren
130 los de insulina humana debido a la diferencia en
131 la secuencia de la posición 21 de la cadena A y a
132 los 2 aminoácidos adicionales de la cadena B.]
133 En el cromatograma obtenido a partir de la
134 *Solución estándar* el factor de asimetría para los
135 picos correspondientes a los fragmentos de
136 digestión II y III no debe ser mayor a 1,5; la
137 resolución *R* entre los picos correspondientes a
138 los fragmentos de digestión II y III no debe ser
139 menor a 3,4.

140 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el
141 cromatógrafo volúmenes iguales
142 (aproximadamente 50 µL) de la *Solución*
143 *estándar* y la *Solución de muestra*. Registrar los
144 cromatogramas: los cromatogramas obtenidos
145 con la *Solución muestra* y la *Solución estándar*
146 deben ser correspondientes.

147 **Determinación de agua** <120>

148 *Titulación coulombimétrica*. No debe contener
149 más de 8,0 %, determinado sobre una porción de
150 30,0 mg.

151 **Proteínas relacionadas**

152 *Sistema cromatográfico, Solución*
153 *reguladora, Solución A, Solución B, Fase móvil,*

154 *Diluyente, Solución de resolución y Aptitud*
155 *del sistema*- Proceder según se indica en
156 *Valoración*.

157 *Solución muestra* - Emplear la
158 *Preparación muestra de Valoración*.

159 *Procedimiento* - Inyectar en el
160 cromatógrafo aproximadamente 5 µL de la
161 *Solución muestra* y registrar las respuestas
162 de todos los picos: la respuesta de ningún
163 pico secundario debe ser mayor a 0,4 % y la
164 suma de las respuestas de todos los picos
165 secundarios no debe ser mayor a 1,0 %.

166 **Impurezas con peso molecular mayor**
167 **que la insulina glargina**

168 *Sistema cromatográfico* - Examinar por
169 cromatografía de exclusión por tamaño
170 molecular empleando un detector
171 ultravioleta ajustado a 276 nm y una
172 columna de 30 cm × 7,8 mm con fase
173 estacionaria constituida por gel de sílice
174 hidrofílico de 10 µm de diámetro con un
175 tamaño de poro de 12,5 nm, en un grado
176 adecuado para el fraccionamiento de
177 proteínas globulares de molecular relativo
178 en un rango de peso de 5.000 a 150.000. El
179 caudal debe ser aproximadamente 0,5 mL
180 por minuto.

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

184 *Fase móvil* - *Solución de arginina*,
185 acetoniitrilo y ácido acético glacial
186 (65:20:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los
187 ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema*
188 en 100. *Cromatografía*).

189 [NOTA: Conservar la *Solución de*
190 *resolución* a una temperatura de entre 2 °C
191 y 8 °C y usar dentro de los 7 días].

192 *Solución de resolución* - Secar
193 aproximadamente 200 mg de Insulina
194 Glargina en una estufa a 100 °C durante 1,5
195 a 3 horas. Disolver 15,0 mg de la sustancia
196 seca en 1,5 mL de una solución de ácido
197 clorhídrico de 1 g por litro y diluir a 10,0
198 mL con agua.

199 *Solución muestra* - Preparar una solución
200 de aproximadamente 4 mg de Insulina
201 Glargina por mL de una solución de ácido
202 clorhídrico de 1 g por litro.

203 *Solución estándar* - Diluir 1,0 mL de
204 *Solución muestra* a 100,0 mL con agua.
205 Diluir 3,0 mL de la solución anterior a 20,0
206 mL con agua.

207 *Aptitud del sistema* (ver 100.
208 *Cromatografía*) - Cromatografiar la
209 *Solución estándar* y registrar las respuestas
210 de los picos según se indica en
211 *Procedimiento*: el tiempo de retención para
212 insulina glargina debe ser de
213 aproximadamente 18 minutos; la relación

214 señal-ruido debe ser mayor o igual a 10.
 215 Cromatografiar la *Solución de resolución* y
 216 registrar las respuestas de los picos según se
 217 indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría
 218 debe ser menor o igual a 2,0 para el pico
 219 correspondiente a insulina glargina; la relación
 220 pico/valle p/v determinada por la relación entre
 221 la altura del pico debido a las proteínas de alto
 222 peso molecular H_p y la altura del valle de
 223 separación entre este pico y el pico
 224 correspondiente a insulina glargina H_v debe ser
 225 mayor o igual a 2,0.
 226 *Procedimiento* - Inyectar en el cromatógrafo
 227 100 μL de la *Solución muestra*, registrar el
 228 cromatograma durante aproximadamente 35
 229 minutos y medir las respuestas de los picos: el
 230 total de impurezas con un tiempo de retención
 231 menor que el de insulina glargina debe ser menor
 232 o igual al 0,3 % del área total de los picos;
 233 descartar cualquier pico con un tiempo de
 234 retención mayor que el del pico debido a la
 235 insulina glargina.

236 Cinc

237 *Diluyente* - Preparar una solución de ácido
 238 clorhídrico de 1 g por litro.

239 *Soluciones estándar* - Preparar soluciones
 240 que contengan 0,2 μg ; 0,4 μg y 0,6 μg de cinc por
 241 mL mediante la dilución de una solución
 242 estándar de zinc (10 ppm Zn) con *Diluyente*.

243 *Solución muestra* - Disolver al menos 45,0
 244 mg de Insulina Glargina con *Diluyente* y diluir a
 245 50,0 mL del mismo solvente. Diluir 10,0 mL de
 246 la solución anterior a 100,0 mL con *Diluyente*.

247 *Procedimiento* - Determinar las absorbancias
 248 de las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra*
 249 en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm, con
 250 un espectrofotómetro de absorción atómica (ver
 251 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión*
 252 *atómica*) equipado con una lámpara de cinc de
 253 cátodo hueco y una llama de acetileno-aire
 254 (aproximadamente 2 litros de acetileno y 11
 255 litros de aire por minuto). No debe contener más
 256 de 0,80 %.

257 Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

258 Cuando Insulina Glargina esté destinada a la
 259 preparación la preparación de formas
 260 farmacéuticas inyectables sin posterior
 261 tratamiento de eliminación de endotoxinas
 262 bacterianas por un procedimiento apropiado,
 263 debe contener menos de 10 Unidades de
 264 Endotoxina por mg.

265 VALORACIÓN

266 *Sistema cromatográfico* - Emplear un equipo
 267 para cromatografía de líquidos con un detector
 268 ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm \times 3,0
 269 mm con fase estacionaria totalmente encapada
 270 constituida por octadecilsilano químicamente

271 unido a partículas esféricas de sílice de 4
 272 μm de diámetro. Mantener la temperatura
 273 de la columna a 35 °C. El caudal debe ser
 274 aproximadamente 0,6 mL por minuto.
 275 Programar el cromatógrafo del siguiente
 276 modo:
 277

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Etapas
0-20	96→83	4→17	Gradiente lineal
20-30	83→63	17→37	Gradiente lineal
30-33	63→96	37→4	Gradiente lineal
33-40	96	4	Re-equilibrio

278 *Solución reguladora* - Disolver 20,7 g
 279 de fosfato dihidrógeno de sodio anhidro en
 280 900 mL de agua, ajustar a pH 2,5 con ácido
 281 fosfórico y diluir a 1.000 mL con agua.

282 *Solución A* - Disolver 18,4 g de cloruro
 283 de sodio en 250 mL de *Solución*
 284 *reguladora*, agregar 250 mL de acetonitrilo
 285 y mezclar. Diluir a 1.000 mL con agua.
 286 Filtrar y desgasificar.

287 *Solución B* - Disolver 3,2 g de cloruro
 288 de sodio en 250 mL de *Solución*
 289 *reguladora*, agregar 650 mL de acetonitrilo
 290 y mezclar. Diluir a 1.000 mL con agua.
 291 Filtrar y desgasificar.

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

297 *Diluyente* - Preparar una solución de
 298 ácido clorhídrico de 1 g por litro.

299 *Preparación estándar* - Disolver el
 300 contenido de un vial de Insulina Glargina
 301 SR-FA en 1,5 mL de *Diluyente* y diluir a
 302 10,0 mL con agua. [NOTA: mantener la
 303 temperatura de la solución entre 2 °C y 8
 304 °C].

305 *Preparación muestra* - Disolver 15,0
 306 mg de Insulina Glargina en 1,5 mL de
 307 *Diluyente* y diluir a 10,0 mL con agua.
 308 [NOTA: mantener la temperatura de la
 309 solución entre 2 °C y 8 °C].

310 *Solución de resolución* - Disolver el
 311 contenido del vial de Insulina Glargina para
 312 la identificación de picos SR-FA en 0,3 mL
 313 de *Diluyente* y agregar 1,7 mL de agua.
 314 [NOTA: mantener la temperatura de la
 315 solución entre 2 °C y 8 °C].

316 *Aptitud del sistema* (ver 100.
 317 *Cromatografía*) - Cromatografiar la
 318 *Preparación estándar* y registrar las
 319 respuestas de los picos según se indica en

320 *Procedimiento*: el tiempo de retención de
321 insulina glargina debe ser aproximadamente 20
322 minutos. Cromatografiar la *Solución de*
323 *resolución* y registrar las respuestas de los picos
324 según se indica en *Procedimiento*: la relación
325 pico/valle p/v determinada por la relación entre
326 la altura del pico debido a 0^A-Arg-insulina
327 glargina H_p y la altura del valle de separación
328 entre este pico y el pico correspondiente a
329 insulina glargina H_v debe ser mayor o igual a 2,0.
330 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el
331 cromatógrafo volúmenes iguales
332 (aproximadamente 5 μ L) de la *Preparación*
333 *muestra* y la *Preparación estándar* y registrar las
334 respuestas de los picos principales. Calcular la
335 cantidad de $C_{267}H_{404}N_{72}O_{78}S_6$ en la porción de
336 Insulina Glargina en ensayo.

337
338
339