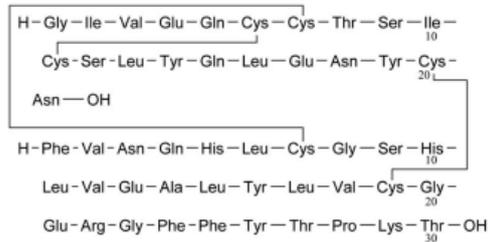


1 Actualización

2 INSULINA HUMANA 3 RECOMBINANTE



4
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. El contenido
11 de Insulina Humana más el correspondiente a
12 desamido insulina humana A-21, no debe ser
13 menor de 95,0 por ciento y no mayor de 105,0 por
14 ciento de $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ calculado sobre la
15 sustancia seca. Insulina Humana Recombinante
16 debe cumplir con las siguientes especificaciones.
17 [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina
18 equivale a 0,0347 mg de Insulina Humana].

19 PRODUCCIÓN

20 La Insulina Humana Recombinante se produce
21 por métodos basados en tecnologías de ADN
22 recombinante en sistemas de expresión procariota,
23 como *Escherichia coli* y en sistemas eucariotas
24 como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y
25 *Pichia pastoris*, bajo condiciones controladas para
26 minimizar el grado de contaminación microbiana.

27 Previo a la liberación de cada lote de materia
28 prima se deben realizar los siguientes ensayos:
29 contenido de *Proteínas derivadas de la célula*
30 *hospedadora, incluyendo el precursor*
31 *monocatenario de biosíntesis que comprende las*
32 *cadena A y B de la insulina unidas en cada caso*
33 *por un péptido conector artificial*, determinado
34 mediante un método apropiado y validado y debe
35 cumplir además con el ensayo de *ADN derivado*
36 *de la célula hospedadora y del vector*, con los
37 límites aprobados por la Autoridad Sanitaria (ver
38 1120. *Productos biotecnológicos*).

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

44 **Sustancia de referencia** - Insulina Humana
45 Recombinante SR-FA.

46 CONSERVACIÓN

47 En envases inactivos herméticos, a
48 una temperatura menor o igual a $-18^{\circ}C$.
49 Cuando se descongela, se debe conservar
50 entre 2 y $8^{\circ}C$ 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.

56 ENSAYOS

57 Identificación

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

64 **B** - Examinar mediante mapeo
65 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 \times $4,6$ mm, tamaño
70 de poro de 8 nm, con fase estacionaria
71 constituida por octadecilsilano
72 químicamente unido a partículas de sílice
73 porosas de 3 μ m de diámetro. Mantener la
74 columna a $40^{\circ}C$. El caudal debe ser
75 aproximadamente 1 mL por minuto.
76 Programar el cromatógrafo del siguiente
77 modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapas
0 - 60	90 \rightarrow 30	10 \rightarrow 70	Gradiente lineal
60 - 65	30 \rightarrow 0	70 \rightarrow 100	Gradiente lineal
65 - 70	0	100	Isocrático
70 - 75	90	10	Re-equilibrio

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

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

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

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

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

107 *Solución reguladora de HEPES* - Transferir 2,38 g de HEPES (ácido *N*-(2-hidroxietil) 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.

108 *Solución de digestión muestra* - Preparar una solución de 2 mg por mL de Insulina Humana Recombinante en ácido clorhídrico 0,01 M y transferir 500 µL de la solución resultante a un recipiente con tapa apropiada. 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*.

109 *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.

110 *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

111 *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: del cromatograma obtenido con la *Solución de digestión de la muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Solución de digestión del estándar*.

112 **Determinación del residuo de ignición** <270>

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

114 **Pérdida por secado** <680>

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

116 **Proteínas relacionadas**

117 *Solución A, Solución B, Preparación muestra, Preparación estándar, Preparación estándar diluida 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.]

118 *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
50 - 55	42	58	Re-equilibrio

119 *Fase móvil* - Emplear mezclas variables de la *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. [NOTA: si fuera necesario, ajustar la *Fase móvil* para que el tiempo de retención del pico correspondiente a insulina humana eluya entre los 18 y 22 minutos.]

120 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*) - Determinar la resolución y linealidad del sistema 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.

121 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (entre 10 µL y 20 µL según el volumen definido en *Aptitud del sistema*) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*. Registrar los cromatogramas durante aproximadamente 50 minutos y medir las respuestas de los picos. 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. 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 insulina humana y de desamido insulina humana A21, no

206 debe ser mayor del 2,0 % de la respuesta total de
207 los picos.

208 **Impurezas con peso molecular mayor que la**
209 **insulina humana recombinante**

210 *Sistema cromatográfico* - Examinar por
211 cromatografía de exclusión por tamaño molecular,
212 empleando un equipo para cromatografía de
213 líquidos con un detector ultravioleta ajustado a
214 276 nm y una columna de 30 cm × 7,5 mm con
215 fase estacionaria constituida por gel de sílice
216 hidrofílico de 5 a 10 µm de diámetro con un
217 tamaño de poro de 12 – 12,5 nm, en un grado
218 apropiado para la separación del monómero de
219 insulina de los dímeros y polímeros. El caudal
220 debe ser aproximadamente 0,5 mL por minuto.

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

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

228 [NOTA: Conservar la *Solución de resolución*
229 y la *Solución muestra*, a una temperatura de entre
230 2 °C y 8 °C y usar dentro de los 7 días. Si se
231 emplea un inyector automático mantener la
232 temperatura entre 2 y 8 °C].

233 *Solución de resolución* - Emplear una solución
234 de insulina humana recombinante de
235 aproximadamente 4 mg por mL, que contenga más
236 de 0,4 % de proteínas de alto peso molecular. Se
237 puede emplear una preparación inyectable de
238 insulina humana recombinante (solución o
239 suspensión) que ha sido aclarada con una cantidad
240 suficiente de ácido clorhídrico 6 M, para que
241 contenga el porcentaje indicado de proteínas de
242 elevada masa molecular; o se puede utilizar una
243 solución preparada a partir de insulina humana
244 recombinante disuelta en ácido clorhídrico 0,01
245 M. También puede obtenerse, dejando reposar
246 insulina en polvo a temperatura ambiente durante
247 aproximadamente 10 días.

248 *Solución muestra* - Disolver 4 mg de Insulina
249 Humana Recombinante en 1,0 mL de ácido
250 clorhídrico 0,01 M.

251 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*) -
252 Antes de emplear una columna nueva, equilibrar
253 la columna mediante al menos tres inyecciones
254 repetidas de *Solución de resolución*. La columna
255 está equilibrada cuando se obtienen resultados
256 repetitivos en dos inyecciones consecutivas.

257 Cromatografiar la *Solución de resolución* y
258 registrar las respuestas de los picos según se indica
259 en *Procedimiento*: los tiempos de retención deben
260 aproximadamente entre 13 y 17 minutos para los
261 complejos de insulina poliméricos; 17,5 minutos
262 para los dímeros de insulina covalentes; 20
263 minutos para los monómeros de insulina, y 22
264 minutos para las sales; la relación pico/valle *p/v*
265 determinada por la relación entre la altura del pico

266 del dímero *Hp* y la altura del valle de
267 separación entre los picos del monómero y
268 del dímero *Hv* debe ser mayor o igual a
269 2,0

270 *Procedimiento* - Inyectar en el
271 cromatógrafo 100 µL de la *Solución*
272 *muestra*, registrar el cromatograma
273 durante aproximadamente 35 minutos y
274 medir las respuestas de los picos. Ignorar
275 cualquier pico con un tiempo de retención
276 mayor que el pico de insulina. La suma de
277 las respuestas de los picos con un tiempo
278 de retención menor que el del pico
279 principal no debe ser mayor de 1,0 % de la
280 respuesta total de los picos.

281 **Cinc**

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

287 *Soluciones estándar* - Emplear
288 soluciones recientemente preparadas que
289 contengan 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 y 1,6 µg de
290 cinc por mL, preparadas en el momento de
291 su uso por dilución de la *Solución madre*
292 *del estándar* con ácido clorhídrico 0,01 M.

293 *Solución muestra* - Disolver 50,0 mg
294 de Insulina Humana en ácido clorhídrico
295 0,01 M y diluir a 25,0 mL con el mismo
296 ácido. Si fuera necesario, diluir con ácido
297 clorhídrico 0,01 M hasta obtener una
298 concentración de aproximadamente 0,4 a
299 1,6 µg de cinc por mL.

300 *Procedimiento* - Determinar las
301 absorbancias de las *Soluciones estándar* y
302 de la *Solución muestra* en la línea de
303 emisión del cinc a 213,9 nm; con un
304 espectrofotómetro de absorción atómica
305 (ver 440. *Espectrofotometría de absorción*
306 y *emisión atómica*) equipado con una
307 lámpara de cinc de cátodo hueco y una
308 llama de acetileno-aire (aproximadamente
309 2 litros de acetileno y 11 litros de aire por
310 minuto). Graficar las absorbancias de las
311 *Soluciones estándar* en función de la
312 concentración en µg por mL de cinc y
313 determinar la concentración de cinc en µg
314 por mL en la *Solución muestra*. No debe
315 contener más de 1,0 % de cinc, calculado
sobre la sustancia seca.

317 **Ensayo de endotoxinas bacterianas**
318 <330>

319 Cuando la Insulina Humana
320 Recombinante esté destinada a la
321 preparación de formas farmacéuticas
322 inyectables sin posterior tratamiento de
323 eliminación de endotoxinas bacterianas
324 por un procedimiento apropiado, debe

325 contener menos de 10 Unidades de Endotoxina
326 por mg.

327 VALORACIÓN

328 *Sistema cromatográfico* - Emplear un equipo
329 para cromatografía de líquidos con un detector por
330 arreglo de diodos o un detector ultravioleta
331 ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 4,6
332 mm con fase estacionaria constituida por
333 octadecilsilano químicamente unido a partículas
334 porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener
335 temperatura de la columna a 40 °C. El caudal debe
336 ser 1 mL por minuto.

337 [NOTA: preparar y mantener a la *Solución A* y
338 la *Solución B* a una temperatura no inferior a
339 20°C].

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

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

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

354 *Preparación estándar* - Disolver el contenido
355 de un vial Insulina Humana Recombinante SR-FA
356 en ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una
357 solución que contenga aproximadamente 4 mg por
358 mL de Insulina Humana Recombinante SR-FA

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

363 *Solución de resolución* - Preparar una
364 solución de 1,5 mg por mL Insulina Humana SR-
365 FA en ácido clorhídrico 0,01 M. Dejar reposar a
366 temperatura ambiente, protegida de la luz de 3 a
367 6 días para obtener una solución que contenga no
368 menos de 5 % de desamido insulina humana A21
369 con respecto al área total obtenida como suma del
370 pico correspondiente a insulina humana más el
371 pico correspondiente a desamido insulina humana
372 A21. [NOTA: la solución puede emplearse dentro
373 del mes de su preparación si se conserva en
374 heladera y protegida de la luz].

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

379 [NOTA: mantener las soluciones a una
380 temperatura entre 2 y 8 °C y emplearlas dentro de

381 las 48 horas siguientes. Si se emplea un
382 inyector automático, mantener la
383 temperatura entre 2 y 8°C.]

384 *Aptitud del sistema* (ver 100.

385 *Cromatografía*) - Cromatografiar la

386 *Preparación estándar* y registrar las

387 respuestas de los picos según se indica en

388 *Procedimiento*: ajustar la *Fase móvil* para

389 que el tiempo de retención de la Insulina

390 Humana se encuentre entre 18 y 22

391 minutos; la desviación estándar relativa

392 para cinco inyecciones repetidas no debe

393 ser mayor a 1,6 %. Cromatografiar la

394 *Solución de resolución* y registrar las

395 respuestas de los picos según se indica en

396 *Procedimiento*: la resolución *R* entre el

397 pico correspondiente a insulina humana y

398 el pico correspondiente a desamido

399 insulina humana A21, debe ser mayor o

400 igual a 2,0; el factor de asimetría para el

401 pico correspondiente a insulina humana

402 no debe ser mayor de 1,8. Cromatografiar

403 20 µL de la *Preparación estándar* y 20 µL

404 de la *Preparación estándar diluida para*

405 *linealidad*, registrar las respuestas de los

406 picos según se indica en *Procedimiento*: el

407 ensayo sólo es válido si la respuesta del

408 pico principal en el cromatograma

409 obtenido a partir la *Preparación estándar*

410 es $10 \pm 0,5$ veces la respuesta del pico

411 principal en el cromatograma obtenido con

412 la *Preparación estándar diluida para*

413 *linealidad*. Si fuera necesario, ajustar el

414 volumen de inyección entre 10 µL y 20

415 µL, con el fin de que la respuesta esté

416 comprendida en el intervalo de linealidad

417 del detector.

418 *Procedimiento* -Inyectar por separado

419 volúmenes iguales (entre 10 µL y 20 µL

420 según el volumen definido en *Aptitud del*

421 *sistema*) de la *Preparación muestra* y la

422 *Preparación estándar*, registrar los

423 cromatogramas y medir las respuestas de

424 los picos. Calcular el contenido en insulina

425 humana más el correspondiente a la

426 desamido insulina A-21, a partir de la

427 respuesta del pico principal y de la

428 respuesta del pico correspondiente a la

429 desamido insulina A-21 en los

430 cromatogramas obtenidos a partir de la

431 *Preparación muestra* y la *Preparación*

432 *estándar*, usando el contenido declarado

433 en el envase de Insulina Humana SR-FA

434 empleado.

435 .

436

437