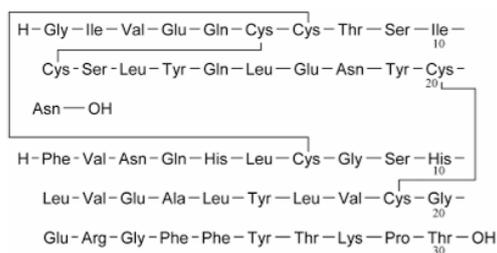


INSULINA LISPRO



$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ PM: 5.808 133107-64-9

Definición - La Insulina LisPro es 28^B-L-Lisina-29^B-L-prolina 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, sólo difiere en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 28 y 29 de la cadena B. En la insulina humana es Pro(B28) y Lys(B29), mientras que la insulina lispro es Lys(B28) y Pro(B29). Al igual que en la insulina humana, la Insulina LisPro contiene dos enlaces disulfuro entre cadenas y un enlace disulfuro intracadena. Insulina LisPro debe contener no menor de 94,0 por ciento y no más de 104,0 por ciento de $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ calculado sobre la sustancia seca. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0347 mg de insulina lispro]. Insulina LisPro debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

La Insulina LisPro 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 agua y etanol. Se disuelve en ácidos minerales diluidos y con descomposición en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

Sustancia de referencia - Insulina LisPro SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos herméticos, a una temperatura menor o igual a -18 °C. Una vez descongelada, se debe almacenar y pesar bajo las condiciones definidas por el fabricante para mantener los atributos de calidad de la sustancia farmacológica y se utiliza para preparativos de fabricación en un corto período de tiempo para evitar la absorción de humedad del aire durante el pesaje. La Insulina LisPro debe estar a temperatura ambiente antes de abrir el envase.

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, 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. 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 acetónitrilo (70:20:10). Filtrar y desgasificar.

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

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

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

112 *Solución reguladora de HEPES* - Transferir
113 2,38 g de HEPES (ácido *N*-(2-hidroxietil)
114 piperazina *N*'-2-etanosulfónico) a un matraz
115 aforado de 100 mL, disolver con
116 aproximadamente 90 mL de agua. Ajustar a pH
117 7,5 con hidróxido de sodio 5 M, completar a
118 volumen con agua y mezclar.

119 *Solución de digestión muestra* - Preparar una
120 solución de 2 mg por mL de Insulina LisPro en
121 ácido clorhídrico 0,01 M y transferir 500 µL de
122 la solución a un tubo limpio. Agregar 2 mL de
123 *Solución reguladora de HEPES* y 400 µL de
124 *Solución de enzima*, tapar e incubar a 25 °C
125 durante 6 horas. Inhibir el proceso de digestión
126 agregando 2,9 mL de *Solución reguladora de*
127 *sulfato pH 2,0*.

128 *Solución de digestión del estándar* - Preparar
129 concomitantemente y de la misma manera que la
130 *Solución de digestión de la muestra*, pero
131 empleando Insulina LisPro SR-FA.

132 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)
133 - Cromatografiar la *Solución de digestión*
134 *estándar* y registrar las respuestas de los picos
135 según se indica en *Procedimiento* e identificar
136 los picos debidos a los fragmentos de digestión I,
137 II y III [NOTA: los tiempos de retención de los
138 fragmentos I, II y IV son los mismos que para la
139 insulina humana. El tiempo de retención del
140 fragmento III se diferencia de la insulina humana
141 debido a diferencias en la posición de las
142 secuencias 28 y 29 de la cadena B.]: el factor de
143 asimetría de los picos de los fragmentos de
144 digestión II y III no debe ser mayor de 1,5; la
145 resolución *R* entre los mismos no debe ser menor
146 de 8,0.

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

158 *de digestión del estándar* deben ser
159 correspondientes.

160 **Ensayo de endotoxinas bacterianas**
161 <330>

162 Cuando Insulina LisPro esté destinada a
163 la preparación la preparación de formas
164 farmacéuticas inyectables sin posterior
165 tratamiento de eliminación de endotoxinas
166 bacterianas por un procedimiento
167 apropiado, debe contener menos de 10
168 Unidades de Endotoxina por mg.

169 **Determinación del residuo de ignición**
170 <270>

171 No más de 2,5 %, determinado sobre
172 200 mg de Insulina LisPro y calculado
173 sobre la sustancia seca.

174 **Pérdida por secado** <680>

175 Pesar exactamente 200 mg de Insulina
176 LisPro y secar a 105 °C durante 16 horas:
177 no debe perder más de 10,0 % de su peso.

178 **Proteínas relacionadas**

179 *Sistema cromatográfico* - Emplear un
180 equipo para cromatografía de líquidos con
181 un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y
182 una columna de 25 cm × 4,6 mm, con un
183 tamaño de poro de 30 nm, con fase
184 estacionaria constituida por octadecilsilano
185 químicamente unido a partículas de sílice
186 porosas de 5 µm de diámetro. Mantener la
187 temperatura de la columna a 40 °C. El
188 caudal debe ser aproximadamente 1 mL por
189 minuto. Programar el cromatógrafo del
190 siguiente modo:

| Tiempo (minutos) | <i>Solución A</i> (%) | <i>Solución B</i> (%) | Etapas |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| 0-60 | 81 | 19 | Isocrático |
| 60-83 | 81→51 | 19→49 | Gradiente lineal |
| 83-84 | 51→11 | 49→19 | Gradiente lineal |
| 84-94 | 81 | 19 | Isocrático |

191 *Solución de sulfato de sodio pH 2,3* -
192 Preparar una solución que contenga 28,4 g
193 de sulfato de sodio anhidro por litro.
194 Ajustar a pH 2,3 con ácido fosfórico.

195 *Solución A* - *Solución de sulfato de*
196 *sodio pH 2,3* y acetonitrilo (82:18). Filtrar y
197 desgasificar.

198 *Solución B*- *Solución de sulfato de*
199 *sodio pH 2,3* y acetonitrilo (50:50). Filtrar
200 y desgasificar.

201 *Fase móvil* - Emplear mezclas variables de
202 *Solución A* y *Solución B* según se indica en
203 *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes
204 necesarios (ver *Aptitud del sistema* en 100.
205 *Cromatografía*).

206 *Solución muestra* - Disolver 3,5 mg de
207 Insulina LisPro en 1,0 mL de ácido clorhídrico
208 0,01 M. Mantener la solución entre 2 °C y 8 °C y
209 emplearla dentro de las 56 horas.

210 *Solución de resolución* - Disolver 3,5 mg de
211 Insulina LisPro en 1,0 mL de ácido clorhídrico
212 0,01 M. Dejar a temperatura ambiente para
213 obtener una solución que contenga entre 0,8 y 11
214 por ciento de la desamido insulina lispro A21.

215 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)
216 - Cromatografiar la *Solución de resolución* y
217 registrar las respuestas de los picos según se
218 indica en *Procedimiento*: ajustar la composición
219 de la fase móvil para que el tiempo de retención
220 de insulina lispro sea aproximadamente 41
221 minutos [NOTA: la desamido insulina lispro
222 A21 eluye cerca del inicio del gradiente de
223 elución]; la resolución *R* entre el pico
224 correspondiente a insulina lispro y el pico
225 correspondiente a desamido insulina lispro A21
226 debe ser mayor o igual de 1,5 entre el primer pico
227 (insulina lispro) y el segundo pico (A21
228 desamido insulina lispro); el factor de asimetría
229 para el pico correspondiente a insulina lispro
230 debe ser menor o igual a 2,0.

231 *Procedimiento* - Inyectar en el cromatógrafo
232 20 µL de la *Solución muestra* y registrar los
233 cromatogramas. Calcular el porcentaje de cada
234 proteína relacionada con relación al pico
235 principal: la respuesta del pico correspondiente a
236 desamido insulina lispro A21 no debe ser mayor
237 al 1,0 %; la respuesta de cualquier otra proteína
238 relacionada no debe ser mayor 0,50 %; y, la suma
239 de todas las respuestas de los picos secundarios,
240 a excepción del pico correspondiente a desamido
241 insulina lispro A21, no debe ser mayor a 2,0 %.

243 **Impurezas con peso molecular mayor que** 244 **la insulina lispro**

245 *Sistema cromatográfico* - Examinar por
246 cromatografía de exclusión por tamaño
247 molecular, empleando un equipo para
248 cromatografía de líquidos con un detector
249 ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de
250 30 cm × 7,8 mm con fase estacionaria constituida
251 por gel de sílice hidrofílico de 5 a 10 µm de
252 diámetro con un tamaño de poro de 12 a 12,5 nm,
253 en un grado apropiado para la separación del
254 monómero de insulina de los dímeros y
255 polímeros. El caudal debe ser aproximadamente
256 0,5 mL por minuto.

257 *Solución de arginina* - Preparar una solución
258 de *L*-arginina en agua de aproximadamente 1 mg
259 por mL.

260 *Fase móvil* - *Solución de arginina*,
261 acetonitrilo y ácido acético glacial
262 (65:20:15). Filtrar y desgasificar. Hacer los
263 ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema*
264 en 100. *Cromatografía*).

265 *Solución de resolución* - Emplear una
266 solución de Insulina LisPro de
267 aproximadamente 4 mg por mL, que
268 contenga más de 0,4 % de proteínas de alto
269 peso molecular. Se puede emplear una
270 preparación inyectable de insulina lispro
271 (solución o suspensión), que ha sido
272 aclarada con una cantidad suficiente de
273 ácido clorhídrico 6 M, para que contenga el
274 porcentaje indicado de proteínas de elevada
275 masa molecular o se puede utilizar una
276 solución preparada a partir de insulina
277 lispro, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 M.
278 También puede obtenerse, dejando reposar
279 insulina en polvo a temperatura ambiente
280 durante aproximadamente 10 días o
281 incubando 100 mg de Insulina LisPro a
282 100°C durante 10 minutos. [NOTA:
283 mantener la temperatura de las soluciones
284 entre 2 y 8 °C y emplearlas en un lapso de 8
285 días].

286 *Solución muestra* - Disolver 4 mg de
287 Insulina LisPro en 1,0 mL de ácido
288 clorhídrico 0,01 M. [NOTA: mantener la
289 temperatura entre 2 y 8 °C, emplear dentro
290 de las 48 hs.]

291 *Aptitud del sistema* (ver 100.
292 *Cromatografía*) - Cromatografiar la
293 *Solución de resolución* al menos tres veces
294 según se indica en *Procedimiento*: se deben
295 obtener resultados repetitivos en dos
296 inyecciones consecutivas para verificar que
297 la columna esté equilibrada.
298 Cromatografiar la *Solución de resolución* y
299 registrar las respuestas de los picos según se
300 indica en *Procedimiento*: los tiempos de
301 retención deben ser de 13 a 17 minutos para
302 los complejos de insulina lispro
303 poliméricos; aproximadamente 17,5
304 minutos para los dímeros de insulina;
305 aproximadamente 20 minutos para los
306 monómeros de insulina, y
307 aproximadamente 22 minutos para las sales;
308 la relación pico/valle *p/v* determinada como
309 la relación entre la altura del pico del
310 dímero *H_p* y la altura del valle de
311 separación entre los picos del monómero y
312 del dímero *H_v* debe ser mayor o igual de
313 2,0; el factor de simetría para el pico
314 correspondiente a insulina lispro debe ser
315 menor o igual a 2,0.

316 *Procedimiento* - Inyectar en el
317 cromatógrafo 100 µL de la *Solución*
318 *muestra*, registrar el cromatograma
319 aproximadamente durante 35 minutos y

320 medir las respuestas de los picos. Ignorar
321 cualquier pico con un tiempo de retención mayor
322 que el pico de insulina lispro monómero. La
323 suma de las respuestas de los picos con un tiempo
324 de retención menor que el pico principal no debe
325 ser mayor de 0,25 % de la respuesta total de los
326 picos.

327 Cinc

328 *Soluciones estándar* – Preparar soluciones
329 que contengan entre 0,2 y 0,8 µg de cinc por
330 mililitro mediante la dilución de una solución
331 estándar de cinc (5 mg por mL de Zn) con ácido
332 clorhídrico 0,01 M [NOTA: preparar estas
333 soluciones en el momento de su uso].

334 *Solución muestra* – Disolver al menos 50,0
335 mg de Insulina LisPro en ácido clorhídrico 0,01
336 M y diluir a 25,0 mL con el mismo solvente.
337 Diluir a una concentración, aproximadamente
338 entre 0,4 y 0,6 µg de Zn por mililitro, con ácido
339 clorhídrico 0,01 M, si fuera necesario.

340 *Procedimiento* - Determinar las absorbancias
341 de las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra*
342 en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm, con
343 un espectrofotómetro de absorción atómica (ver
344 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión*
345 *atómica*) equipado con una lámpara de cinc de
346 cátodo hueco y una llama de acetileno-aire
347 (aproximadamente 2 litros de acetileno y 11
348 litros de aire por minuto). Graficar las
349 absorbancias de las *Soluciones estándar* en
350 función de la concentración en µg por mL de cinc
351 y determinar la concentración de cinc en la
352 muestra en ensayo: debe contener no más de 1,0
353 % determinado sobre la sustancia seca.

354 VALORACIÓN

355 *Sistema cromatográfico* - Emplear un equipo
356 para cromatografía de líquidos con un detector
357 ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de
358 10 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida
359 por octadecilsilano químicamente unido a
360 partículas porosas de sílice de 3 µm de diámetro,
361 con un tamaño de poro de 8 nm. Mantener la
362 temperatura de la columna a 40 °C. El caudal
363 debe ser aproximadamente 0,8 mL por minuto.

364 *Solución de sulfato de sodio pH 2,3* -
365 Preparar una solución que contenga 28,4 g de
366 sulfato de sodio anhidro por litro. Ajustar a pH
367 2,3 con ácido fosfórico.

368 *Fase móvil – Solución de sulfato de sodio pH*
369 *2,3 y acetonitrilo (745:255)*. Filtrar y
370 desgasificar. Hacer los ajustes necesarios (ver
371 *Aptitud del sistema* en 100. *Cromatografía*).

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

378 *Preparación muestra* - Preparar una
379 solución que contenga aproximadamente
380 0,8 mg por mL de Insulina LisPro en ácido
381 clorhídrico 0,01 M. [NOTA: mantener la
382 temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C
383 y usar dentro de las 48 horas].

384 *Solución de resolución* - Disolver
385 aproximadamente 10 mg de Insulina LisPro
386 en 10 mL de ácido clorhídrico 0,01 M.
387 Dejar reposar a temperatura ambiente para
388 obtener una solución que contenga entre 0,8
389 % y 11 % de desamido insulina lispro A21.
390 [NOTA: mantener la temperatura de la
391 solución entre 2 °C y 8 °C y usar dentro de
392 los 14 días].

393 *Aptitud del sistema* (ver 100.
394 *Cromatografía*) - Cromatografiar la
395 *Preparación estándar* según se indica en
396 *Procedimiento*: el tiempo de retención del
397 pico correspondiente a insulina lispro debe
398 ser aproximadamente 24 minutos; la
399 desviación estándar relativa para tres
400 inyecciones repetidas debe ser menor o
401 igual a 1,1 %. Cromatografiar la *Solución*
402 *de resolución* según se indica en
403 *Procedimiento*: la resolución *R* el pico
404 correspondiente a insulina lispro y el pico
405 correspondiente a desamido insulina lispro
406 A21 debe ser mayor a 1,8.

407 *Procedimiento* - Inyectar por separado
408 en el cromatógrafo volúmenes iguales
409 (aproximadamente 20 µL) de la
410 *Preparación muestra* y la *Preparación*
411 *estándar* y registrar las respuestas de los
412 picos principales. Calcular la cantidad de
413 C₂₅₇H₃₃₁N₆₅O₇₇S₆ en la porción de Insulina
414 LisPro en ensayo.

415
416