

Actualización

INSULINA HUMANA RECOMBINANTE

PREPARACIONES INYECTABLES

Sinonimia - Preparaciones Inyectables de Insulina Corriente.

Definición - Las Preparaciones Inyectables de Insulina Humana Recombinante son una solución o suspensión neutra y estéril de *Insulina Humana Recombinante*. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más del 110,0 por ciento de la cantidad de $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ declarada. Las Preparaciones Inyectables de Insulina Humana Recombinante deben cumplir los requisitos para *Inyectables* en 1050. *Formas farmacéuticas* y con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

Los métodos de elaboración están diseñados para conferir propiedades adecuadas con respecto al inicio y duración de la acción terapéutica.

Los siguientes procedimientos se llevan a cabo en una secuencia adecuada, dependiendo del método de preparación:

- adición de conservantes antimicrobianos adecuados.
- adición de una sustancia o sustancias adecuadas para hacer que la preparación sea isotónica con la sangre.
- adición de una sustancia o sustancias adecuadas para ajustar el pH al valor apropiado.
- determinación de la concentración del componente o componentes que contienen insulina seguida, cuando sea necesario, de un ajuste de modo que la preparación final contenga el número requerido de Unidades Internacionales por mililitro.
- esterilización por filtración del componente o componentes que contienen insulina. [NOTA: una vez realizado este procedimiento, todos los procedimientos posteriores se llevan a cabo asépticamente utilizando materiales que hayan sido esterilizados mediante un método adecuado.]

Además, cuando sea apropiado, se añaden excipientes y se llevan a cabo procedimientos adecuados para conferir la forma física apropiada

al componente o componentes que contienen insulina. La preparación final se envasa asépticamente en recipientes estériles que se cierran para evitar la contaminación microbiana.

Caracteres generales - Soluciones: líquido incoloro, libre de turbidez y de materiales extraños. Durante su almacenamiento pueden depositarse trazas de un sedimento muy fino. Suspensiones: líquido de color blanco o casi blanco homogéneo; cuando está en reposo, puede presentar un sedimento blanco y un líquido sobrenadante incoloro o casi incoloro; el sedimento se resuspende completamente por agitación suave.

Sustancia de referencia - Insulina Humana Recombinante SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases herméticos, con cierre de seguridad, apirógenos y estériles. Conservar de 2 a 8 °C. No congelar. Proteger de la luz.

ENSAYOS

Identificación

Examinar los cromatogramas obtenidos en *Valoración*. El tiempo de retención del pico correspondiente a insulina en el cromatograma obtenido a partir de la *Preparación muestra* se debe corresponder con el obtenido con la *Preparación estándar*.

Determinación del pH <250>

Entre 6,9 y 7,8; determinado sobre la solución o suspensión.

Insulina en el líquido sobrenadante

[NOTA: realizar este ensayo cuando la preparación sea una Suspensión Inyectable de Insulina Humana Recombinante].

Centrifugar 10,0 mL de la suspensión a 1.500 g durante 10 minutos y separar cuidadosamente el sobrenadante y el residuo. Determinar el contenido de Insulina Humana Recombinante en el sobrenadante (S) por un método apropiado, por ejemplo usando las condiciones cromatográficas indicadas en *Valoración*. Calcular el porcentaje de insulina en el líquido sobrenadante, empleando la fórmula siguiente:

$$100S/T$$

en la cual *T* es el contenido total de insulina determinado como se indica en *Valoración*. No debe contener más de 2,5 %.

Proteínas relacionadas

103 *Solución A, Solución B, Preparación*
104 *muestra, Preparación estándar, Preparación de*
105 *estándar diluida para linealidad y Solución de*
106 *Resolución* - Proceder según se indica en
107 *Valoración*.

108 [NOTA: mantener las soluciones entre 2 y 10° C
109 y emplear dentro de las 24 horas de su
110 preparación].

111 *Sistema cromatográfico* - Proceder según se
112 indica en *Valoración*, programando el
113 cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (% v/v)	Solución B (% v/v)	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

115
116 *Fase móvil* - Emplear mezclas de la *Solución*
117 *A* y la *Solución B* según se indica en *Sistema*
118 *cromatográfico*. [NOTA: si fuese necesario,
119 ajustar la *Fase móvil* para que el tiempo de
120 retención de la Insulina Humana se encuentre
121 entre 18 y 24 minutos.]

122 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)
123 - Determinar la resolución y linealidad del
124 sistema procediendo según se indica en
125 *Valoración*. El perfil del gradiente puede
126 ajustarse para asegurar la elusión completa de
127 todas las impurezas relacionadas de la insulina.
128 [NOTA: si fuera necesario, ajustar el volumen de
129 inyección entre 10 y 20 µL de acuerdo con los
130 resultados obtenidos en el ensayo de linealidad
131 según se indica en *Valoración*.]

132 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el
133 cromatógrafo volúmenes iguales (entre 10 µL y
134 20 µL según el volumen definido cuando se
135 determinó la linealidad) de la *Preparación*
136 *muestra* y la *Preparación estándar*. Registrar los
137 cromatogramas durante aproximadamente 50
138 minutos y medir las respuestas de los picos.
139 [NOTA: si fuera necesario, se pueden realizar
140 ajustes en la *Fase móvil* con el fin de asegurar
141 que los conservantes antimicrobianos presentes
142 en la *Preparación de muestra* se separen bien de
143 la insulina y presenten un tiempo de retención
144 menor. Una pequeña disminución en la
145 concentración de acetonitrilo incrementa,
146 relativamente más, el tiempo de retención de los
147 picos de insulina que el de los conservantes.] En
148 el cromatograma obtenido con la *Preparación*
149 *estándar*, la desamido insulina A-21 debe
150 aparecer como un pequeño pico después del pico

151 principal de insulina y debe tener un tiempo de
152 retención relativo de aproximadamente 1,3. En
153 el cromatograma obtenido a partir de la
154 *Preparación muestra*, la respuesta del pico
155 correspondiente a desamido insulina A-21 no
156 debe ser mayor que 5,0 % de la respuesta total de
157 los picos. A excepción de los picos
158 correspondientes a insulina humana y a desamido
159 insulina A-21, la suma de las respuestas de todos
160 los picos no debe ser mayor de 6,0 % de la
161 respuesta total de los picos. Ignorar cualquier
162 pico correspondiente a los conservantes y a la
163 protamina (picos que eluyen primero).

164 **Impurezas con peso molecular mayor que** 165 **la insulina humana recombinante**

166 *Sistema cromatográfico* - Examinar por
167 cromatografía de exclusión por tamaño
168 molecular, empleando un equipo para
169 cromatografía de líquidos con un detector
170 ultravioleta ajustado a 276 nm y una columna de
171 30 cm × 7,5 mm con fase estacionaria constituida
172 por gel de sílice hidrofílico de 5 a 10 µm de
173 diámetro con un tamaño de poro de 12 – 12,5 nm,
174 en un grado apropiado para la separación del
175 monómero de insulina de los dímeros y
176 polímeros. El caudal debe ser aproximadamente
177 0,5 mL por minuto.

178 *Solución de arginina* - Preparar una solución
179 de L-arginina en agua de aproximadamente 1 mg
180 por mL.

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

186 [NOTA: Conservar la *Solución de resolución*
187 y la *Solución muestra*, a una temperatura de entre
188 2 y 10 °C y usar dentro de las 30 horas de su
189 preparación para el caso de Solución Inyectable
190 de Insulina Soluble o dentro de las 7 días de su
191 preparación para otras preparaciones de insulina.
192 Si se emplea un inyector automático mantener la
193 temperatura entre 2 y 10 °C].

194 *Solución de resolución* - Emplear una
195 solución de insulina humana recombinante de
196 aproximadamente 4 mg por mL, que contenga
197 más de 0,4 % de proteínas de alto peso
198 molecular. Se puede emplear una preparación
199 inyectable de insulina humana recombinante
200 (solución o suspensión) que ha sido aclarada con
201 una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 M,
202 para que contenga el porcentaje indicado de
203 proteínas de elevada masa molecular; o se puede
204 utilizar una solución preparada a partir de
205 insulina humana recombinante disuelta en ácido
206 clorhídrico 0,01 M. También puede obtenerse,
207 dejando reposar insulina en polvo a temperatura
208 ambiente durante aproximadamente 10 días.

Solución muestra - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Valoración*.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*) - Antes de emplear una columna nueva, equilibrar la columna mediante al menos tres inyecciones repetidas de *Solución de resolución*. La columna está equilibrada cuando se obtienen resultados repetitivos en dos inyecciones consecutivas. [NOTA: si se analizan muestras que contienen protamina, el equilibrado de la columna se realiza empleando una solución que contenga protamina.]

Cromatografiar la *Solución de Resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención deben ser aproximadamente entre 13 y 17 minutos para los complejos de insulina poliméricos o complejos covalentes de insulina-protamina; 17,5 minutos para los dímeros de insulina covalentes; 20 minutos para los monómeros de insulina y 22 minutos para las sales. [NOTA: si la *Solución de resolución* hubiera sido preparada a partir de una solución de insulina que contiene conservantes, como por ejemplo metilparabeno, *m*-cresol o fenol, estos compuestos deben eluir más tarde.]. 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 durante al menos 35 minutos y medir las respuestas de los picos. Ignorar cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el pico de insulina. La suma de las respuestas de los picos con un tiempo de retención menor que el del pico de insulina no debe ser mayor de 3,0 % (para las preparaciones que contienen protamina) y del 2,0% (para las preparaciones que no contienen protamina) de la respuesta total de los picos.

Cinc total

Debe contener una cantidad menor o igual a 40 µg de Cinc por 100 UI de insulina; determinado por espectrometría de absorción atómica (ver 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

[NOTA: preparar la *Solución madre del estándar de Cinc*, las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra* inmediatamente antes de su uso].

Solución madre del estándar de Cinc (10 µg por mL) - Realizar una dilución 1 en 10 de la *Solución de Cinc* (100 ppm Zn) (SL) con agua.

Soluciones estándar - Preparar soluciones que contengan 0,4 µg; 0,8 µg; 1,0 µg; 1,2 µg y 1,6 µg de cinc por mililitro mediante la dilución

de la *Solución madre del estándar de Cinc* (10 µg/mL) con ácido clorhídrico 0,01 M.

Solución muestra - Cuando la Preparación Inyectable de Insulina Humana Recombinante es una solución, transferir un volumen de Solución Inyectable de Insulina Humana Recombinante que contenga 200 UI por mL de insulina, a un matraz aforado de 25,0 mL, disolver y completar a volumen agua. Si fuera necesario, diluir con agua para obtener una solución que contenga entre 0,4 y 1,6 µg de cinc por mL.

Cuando la Preparación Inyectable de Insulina Humana Recombinante es una suspensión, agitar suavemente la preparación antes de usar, transferir un volumen que contenga 200 UI por mL de insulina, a un matraz aforado de 25,0 mL, disolver y completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01 M. Si fuera necesario, diluir con ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una solución que contenga entre 0,4 y 1,6 µg de cinc por mL.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra* en la línea de emisión del cinc a 213,9 nm, con un espectrofotómetro de absorción atómica (ver 440. *Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*) equipado con una lámpara de cinc de cátodo hueco y una llama de acetileno-aire (aproximadamente 2 litros de acetileno y 11 litros de aire por minuto). Graficar las absorbancias de las *Soluciones estándar* en función de la concentración en µg por mL de cinc y determinar la concentración de cinc en µg por mL en la *Solución muestra*.

Cinc en solución

[NOTA: realizar este ensayo cuando la preparación sea una Suspensión Inyectable de Insulina Humana Recombinante].

Debe contener una cantidad menor o igual a 0,5 µg de Cinc por mL de insulina.

Solución madre del estándar, Soluciones estándar y Procedimiento - Proceder según se indica en *Cinc total*.

Solución muestra - Diluir 1 mL del líquido sobrenadante limpio obtenido mediante centrifugación de la Suspensión Inyectable de Insulina Humana Recombinante a 25,0 mL con agua. Diluir con agua, si fuera necesario, para obtener una solución entre 0,4 y 1,6 µg de cinc por mL.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Debe contener menos de 80 Unidades de Endotoxina por 100 UI de insulina.

Ensayos de esterilidad <370>

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

323 *Sistema cromatográfico* - Emplear un equipo
324 para cromatografía de líquidos con un detector
325 ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de
326 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida
327 por octadecilsilano químicamente unido a
328 partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro.
329 Mantener la columna a 40 °C. El caudal debe ser
330 aproximadamente 1 mL por minuto.

331 [NOTA: preparar y mantener a la *Solución A*
332 y la *Solución B* a una temperatura no inferior a
333 20°C].

334 *Solución A* - Disolver 28,4 g de sulfato de
335 sodio anhidro en 1 litro de agua. Agregar 2,7 mL
336 de ácido fosfórico y ajustar a pH 2,3 con
337 etanolamina, si fuera necesario. Filtrar y
338 desgasificar.

339 *Solución B* - Mezclar 550 mL de *Solución A*
340 con 450 mL de acetonitrilo. Calentar la solución
341 a una temperatura no inferior a 20 °C con el fin
342 de evitar la precipitación (la mezcla es
343 endotérmica). Filtrar y desgasificar.

344 *Fase móvil* - Emplear una mezcla de *Solución*
345 *B* y *Solución A* (58:42). [NOTA: si fuese
346 necesario, ajustar la *Fase móvil* para que el
347 tiempo de retención de la Insulina Humana se
348 encuentre entre 18 y 24 minutos.]

349 *Preparación estándar* - Cuando la
350 Preparación Inyectable de Insulina Humana
351 Recombinante indique que contiene 100 UI/mL,
352 disolver el contenido de un vial de Insulina
353 Humana Recombinante SR-FA en ácido
354 clorhídrico 0,01 M para obtener una solución de
355 aproximadamente 4 mg por mL.

356 Cuando la Preparación Inyectable de Insulina
357 Humana Recombinante indique que contiene 40
358 UI/mL, diluir 4,0 mL de la solución anterior en
359 10,0 mL de ácido clorhídrico 0,01M.

360 [NOTA: en todos los casos que se menciona
361 la *Preparación estándar* se considerará la
362 preparación estándar que corresponda].

363 *Preparación estándar diluida para*
364 *linealidad* - Transferir 1,0 mL de la *Preparación*
365 *estándar* a un matraz aforado de 10 mL,
366 completar a volumen con ácido clorhídrico 0,01
367 M y mezclar.

368 *Solución de Resolución* - Preparar una
369 solución de 1,5 mg por mL del estándar de
370 Insulina Humana Recombinante SR-FA en ácido
371 clorhídrico 0,01 M. Dejar en reposo a
372 temperatura ambiente, protegido de la luz
373 durante no menos de 3 a 6 días para obtener una
374 solución que contenga no menos de 5% de
375 desamido insulina humana A21 con respecto al
376 área total obtenida como suma del pico de
377 Insulina Humana más el pico de A21 Desamido.
378 [NOTA: esta solución puede emplearse dentro de
379 los 30 días de preparada cuando se conserva
380 refrigerada y protegida de la luz].

381 *Preparación muestra* - Agregar a la
382 Preparación Inyectable de Insulina Humana

383 Recombinante (solución o suspensión) 4 µL de
384 ácido clorhídrico 6 M por mL, para obtener una
385 solución límpida.

386 Cuando la muestra es una suspensión, agitar
387 el material previamente con el fin de obtener una
388 muestra homogénea. Si la suspensión no se
389 vuelve límpida dentro de los 5 minutos siguientes
390 a la adición inicial de ácido clorhídrico, agregar
391 más ácido clorhídrico 6 M en alícuotas menores
392 a 4 µL por mL hasta la solubilización.

393 Las preparaciones con concentraciones
394 mayores a 100 UI por mL deben ser diluidas con
395 ácido clorhídrico 0,01 M con el fin de evitar la
396 sobrecarga de la columna con el monómero de
397 insulina.

398 [NOTA: conservar la *Preparación estándar*,
399 *Preparación de estándar diluida para linealidad*
400 y la *Preparación muestra* entre 2 y 10 °C y
401 emplearlas dentro de las 48 hs de su preparación.
402 Si se emplea un inyector automático, mantener la
403 temperatura entre 2 y 10 °C].

404 *Aptitud del sistema* (ver 100. *Cromatografía*)

405 -

406 Cromatografiar la *Preparación estándar* y
407 registrar las respuestas de los picos según se
408 indica en *Procedimiento*: la desviación estándar
409 relativa para cinco inyecciones repetidas no debe
410 ser mayor a 1,6 %. Cromatografiar la *Solución*
411 *de resolución* y registrar las respuestas de los
412 picos según se indica en *Procedimiento*: la
413 resolución *R* entre el pico correspondiente a
414 insulina humana y el pico correspondiente a
415 desamido insulina humana A21, debe ser mayor
416 o igual a 2,0; el factor de asimetría para el pico
417 de correspondiente a insulina humana no debe
418 ser mayor de 1,8. Cromatografiar 20 µL de la
419 *Preparación estándar* y 20 µL de la *Preparación*
420 *estándar diluida para linealidad*, registrar las
421 respuestas de los picos según se indica en
422 *Procedimiento*: el ensayo sólo es válido si la
423 respuesta del pico principal en el cromatograma
424 obtenido a partir la *Preparación estándar* es 10
425 ± 0,5 veces la respuesta del pico principal en el
426 cromatograma obtenido con la *Preparación*
427 *estándar diluida para linealidad*. Si fuera
428 necesario, ajustar el volumen de inyección entre
429 10 µL y 20 µL, con el fin de que la respuesta esté
430 comprendida en el intervalo de linealidad del
431 detector.

432 *Procedimiento* - Inyectar por separado en el
433 cromatógrafo volúmenes iguales (entre 10 µL y
434 20 µL según el volumen definido en *Aptitud del*
435 *sistema*) de la *Preparación muestra* y la
436 *Preparación estándar*. [NOTA: si fuera
437 necesario, realizar nuevos ajustes en la *Fase*
438 *móvil*, para asegurar que los conservantes
439 antimicrobianos presentes en la *Preparación*
440 *muestra* se separen correctamente de la insulina
441 y presenten tiempos de retención menores. Una
442 pequeña reducción de la concentración de

443 acetonitrilo incrementa el tiempo de retención de
444 los picos de insulina más que el de los
445 conservantes.] Si fuera necesario, antes de
446 inyectar la solución siguiente, lavar la columna
447 con una mezcla de acetonitrilo y agua (50:50),
448 durante el tiempo suficiente para asegurar la
449 elusión de sustancias que puedan interferir.

450 Calcular el contenido en insulina humana
451 más el correspondiente a la desamido insulina A-
452 21, a partir de la respuesta del pico principal y de
453 la respuesta del pico correspondiente a la
454 desamido insulina A-21 en los cromatogramas
455 obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la
456 *Preparación estándar*, usando el contenido
457 declarado en el envase de Insulina Humana SR-
458 FA empleado.

459 **ROTULADO**

460 Indicar en el rótulo la actividad de la insulina
461 en UI por mL.

462 Indicar en el rótulo que la Insulina Humana
463 Recombinante ha sido obtenida mediante
464 técnicas de recombinación de ADN.

465 En el caso de que la Preparación Inyectable
466 de Insulina Humana Recombinante sea una
467 suspensión, indicar en el rótulo que la misma
468 debe ser resuspendida antes de su uso.

469 En el rótulo debe figurar la leyenda: “*No*
470 *congelar*”.