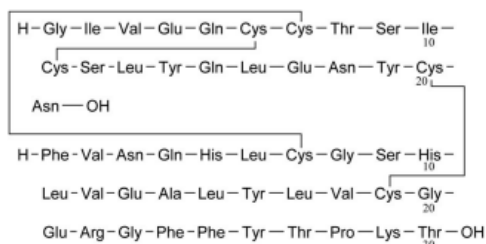


Actualización

INSULINA HUMANA RECOMBINANTE



$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ PM: 5.807,6 11061-68-0

Definición - La Insulina Humana Recombinante es una proteína bicatenaria análoga de la insulina producida por el páncreas humano. El contenido de Insulina Humana más el correspondiente a desamido insulina humana A-21, no debe ser menor de 95,0 por ciento y no mayor de 105,0 por ciento de $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ calculado sobre la sustancia seca. Insulina Humana Recombinante debe cumplir con las siguientes especificaciones. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0347 mg de Insulina Humana].

PRODUCCIÓN

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

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

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

Sustancia de referencia - Insulina Humana Recombinante SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos herméticos, a una temperatura menor o igual a -18 °C. Cuando 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. Para evitar la absorción de humedad durante el pesado, la insulina debe estar a temperatura ambiente.

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 ser similar al 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 - Sulfato de amonio 2,0 M y ácido sulfúrico 0,5 M (50:50). Filtrar y ajustar a pH 2, si fuera necesario.

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

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

Fase móvil - Emplear mezclas de *Solución A* y *Solución B* según se indica en *Sistema cromatográfico*. Hacer los ajustes necesarios

97 (ver *Aptitud del sistema* en 100.
98 *Cromatografía*).

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

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

111 *Solución de digestión muestra* - Preparar
112 una solución de 2 mg por mL de Insulina
113 Humana Recombinante en ácido clorhídrico
114 0,01 M y transferir 500 µL de la solución
115 resultante a un recipiente con tapa apropiada.
116 Agregar 2,0 mL de *Solución reguladora de*
117 *HEPES* y 400 µL de *Solución de enzima*,
118 tapar e incubar a 25 °C durante 6 horas.
119 Inhibir el proceso de digestión agregando 2,9
120 mL de *Solución reguladora de sulfato*.

121 *Solución de digestión estándar* - Preparar
122 al mismo tiempo y de la misma manera que la
123 *Solución de digestión de la muestra*, pero
124 empleando Insulina Humana SR-FA.

125 *Aptitud del sistema* (ver 100.
126 *Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución*
127 *de digestión muestra* y la *Solución de*
128 *digestión estándar* y registrar las respuestas
129 de los picos según se indica en
130 *Procedimiento*. En el cromatograma obtenido
131 a partir de la *Solución de digestión estándar*
132 identificar los picos debidos a los fragmentos
133 de digestión I, II y III. El factor de asimetría
134 de los picos de los fragmentos de digestión II
135 y III no debe ser mayor de 1,5; la resolución
136 R entre los mismos no debe ser menor de 3,4

137 *Procedimiento* - Realizar un blanco en las
138 condiciones descritas en *Sistema*
139 *cromatográfico*. Inyectar por separado en el
140 cromatógrafo volúmenes iguales
141 (aproximadamente 50 µL) de la *Solución de*
142 *digestión del estándar* y la *Solución de*
143 *digestión de la muestra*, registrar los
144 cromatogramas y medir las respuestas de
145 todos los picos: del cromatograma obtenido
146 con la *Solución de digestión de la muestra* se
147 debe corresponder con el obtenido con la
148 *Solución de digestión del estándar*.

149 **Determinación del residuo de ignición**
150 <270>

151 No más de 2,5 %, determinado a partir de
152 200 mg de Insulina Humana y calculado
153 sobre la sustancia seca.

154 **Pérdida por secado** <680>

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

158 **Proteínas relacionadas**

159 *Solución A, Solución B, Preparación*
160 *muestra, Preparación estándar, Preparación*
161 *estándar diluida para linealidad y Solución*
162 *de resolución*. - Proceder según se indica en
163 *Valoración*.

164 [NOTA: mantener las soluciones entre 2 y 10
165 °C y emplear dentro de las 24 horas
166 siguientes.]

167 *Sistema cromatográfico* - Proceder según
168 se indica en *Valoración*, programando el
169 cromatógrafo del siguiente modo:

170

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

171

172 *Fase móvil* - Emplear mezclas variables
173 de la *Solución A* y *Solución B* según se indica
174 en *Sistema cromatográfico*. [NOTA: si fuera
175 necesario, ajustar la *Fase móvil* para que el
176 tiempo de retención del pico correspondiente
177 a insulina humana eluya entre los 18 y 24
178 minutos.]

179 *Aptitud del sistema* (ver 100.
180 *Cromatografía*) - Determinar la resolución y
181 linealidad del sistema procediendo según se
182 indica en *Aptitud del sistema* en *Valoración*.
183 El perfil del gradiente puede ajustarse para
184 asegurar la elución completa de todas las
185 impurezas relacionadas de la insulina.

186 *Procedimiento* - Inyectar por separado en
187 el cromatógrafo volúmenes iguales (entre 10
188 µL y 20 µL según el volumen definido en
189 *Aptitud del sistema*) de la *Preparación*
190 *muestra* y la *Preparación estándar*. Registrar
191 los cromatogramas durante
192 aproximadamente 50 minutos y medir las
193 respuestas de los picos. En el cromatograma
194 obtenido con la *Preparación estándar*, la
195 desamido insulina humana A-21 aparece
196 como un pequeño pico después del pico
197 principal y tiene un tiempo de retención de
198 aproximadamente 1,3. En el cromatograma
199 obtenido a partir de la *Preparación muestra*,
200 la respuesta del pico correspondiente a
201 desamido insulina humana A-21 no debe ser
202 mayor que 2,0 % de la respuesta total de los
203 picos. La suma de áreas de todos los picos, a
204 excepción de los picos de insulina humana y
205 de desamido insulina humana A21, no debe

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

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

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

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

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

230 [NOTA: Conservar la *Solución de*
231 *resolución* y la *Solución muestra*, a una
232 temperatura de entre 2 °C y 8 °C y usar dentro
233 de los 7 días. Si se emplea un inyector
234 automático mantener la temperatura entre 2 y
235 8 °C].

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

253 *Solución muestra* - Disolver 4 mg de
254 Insulina Humana Recombinante en 1,0 mL de
255 ácido clorhídrico 0,01 M.

256 *Aptitud del sistema* (ver 100.
257 *Cromatografía*) - Antes de emplear una
258 columna nueva, equilibrar la columna
259 mediante al menos tres inyecciones repetidas
260 de *Solución de resolución*. La columna está
261 equilibrada cuando se obtienen resultados
262 repetitivos en dos inyecciones consecutivas.

263 *Cromatografiar la Solución de resolución*
264 y registrar las respuestas de los picos según se
265 indica en *Procedimiento*: los tiempos de

266 retención deben aproximadamente entre 13 y
267 17 minutos para los complejos de insulina
268 poliméricos; 17,5 minutos para los dímeros
269 de insulina covalentes; 20 minutos para los
270 monómeros de insulina, y 22 minutos para las
271 sales; la relación pico/valle *p/v* determinada
272 por la relación entre la altura del pico del
273 dímero *H_p* y la altura del valle de separación
274 entre los picos del monómero y del dímero *H_v*
275 debe ser mayor o igual a 2,0

276 *Procedimiento* - Inyectar en el
277 cromatógrafo 100 µL de la *Solución muestra*,
278 registrar el cromatograma durante
279 aproximadamente 35 minutos y medir las
280 respuestas de los picos. Ignorar cualquier pico
281 con un tiempo de retención mayor que el pico
282 de insulina. La suma de las respuestas de los
283 picos con un tiempo de retención menor que
284 el del pico principal no debe ser mayor de 1,0
285 % de la respuesta total de los picos.

286 **Cinc**

287 *Solución madre del estándar* - Disolver
288 una cantidad apropiada de cinc en ácido
289 clorhídrico 0,01 M para obtener una solución
290 de aproximadamente 5 mg por mL.

291 *Soluciones estándar* - Emplear soluciones
292 recientemente preparadas que contengan 0,4;
293 0,8; 1,0; 1,2 y 1,6 µg de cinc por mL,
294 preparadas en el momento de su uso por
295 dilución de la *Solución madre del estándar*
296 con ácido clorhídrico 0,01 M.

297 *Solución muestra* - Disolver 50,0 mg de
298 Insulina Humana en ácido clorhídrico 0,01 M
299 y diluir a 25,0 mL con el mismo ácido. Si
300 fuera necesario, diluir con ácido clorhídrico
301 0,01 M hasta obtener una concentración de
302 aproximadamente 0,4 a 1,6 µg de cinc por
303 mL.

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

320 **Ensayo de endotoxinas bacterianas**
321 <330>

322 Cuando la Insulina Humana
323 Recombinante esté destinada a la preparación
324 de formas farmacéuticas inyectables sin

325 posterior tratamiento de eliminación de
326 endotoxinas bacterianas por un
327 procedimiento apropiado, debe contener
328 menos de 10 Unidades de Endotoxina por mg.

329 VALORACIÓN

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

340 [NOTA: preparar y mantener a la
341 *Solución A* y la *Solución B* a una temperatura
342 no inferior a 20°C].

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

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

353 *Fase móvil* - Emplear una mezcla de
354 *Solución B* y *Solución A* (58:42). Hacer los
355 ajustes necesarios [NOTA: si fuera necesario,
356 ajustar la *Fase móvil* para que el tiempo de
357 retención del pico correspondiente a insulina
358 humana eluya entre los 18 y 24 minutos.]

359 *Preparación estándar* - Disolver el
360 contenido de un vial Insulina Humana
361 Recombinante SR-FA en ácido clorhídrico
362 0,01 M para obtener una solución que
363 contenga aproximadamente 4 mg por mL de
364 Insulina Humana Recombinante SR-FA

365 *Preparación estándar diluida para*
366 *linealidad* - Transferir 1,0 mL de la
367 *Preparación estándar* a un matraz aforado de
368 10 mL, completar a volumen con ácido
369 clorhídrico 0,01 M y mezclar.

370 *Solución de resolución* - Preparar una
371 solución de 1,5 mg por mL Insulina Humana
372 SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 M. Dejar
373 reposar a temperatura ambiente, protegida de
374 la luz de 3 a 6 días para obtener una solución
375 que contenga no menos de 5 % de desamido
376 insulina humana A21 con respecto al área
377 total obtenida como suma del pico
378 correspondiente a insulina humana más el
379 pico correspondiente a desamido insulina
380 humana A21. [NOTA: la solución puede
439 -

381 emplearse dentro del mes de su preparación si
382 se conserva en heladera y protegida de la luz].

383 *Preparación muestra* - Pesar exactamente
384 alrededor de 40 mg de Insulina Humana
385 Recombinante, disolver en ácido clorhídrico
386 0,01 M y diluir a 10,0 mL con el mismo
387 solvente.

388 [NOTA: mantener las soluciones a una
389 temperatura entre 2 y 8 °C y emplearlas
390 dentro de las 48 horas siguientes. Si se emplea
391 un inyector automático, mantener la
392 temperatura entre 2 y 8°C.]

393 *Aptitud del sistema* (ver 100.
394 *Cromatografía*) - Cromatografiar la
395 *Preparación estándar* y registrar las
396 respuestas de los picos según se indica en
397 *Procedimiento*: la desviación estándar
398 relativa para cinco inyecciones repetidas no
399 debe ser mayor a 1,6 %. Cromatografiar la
400 *Solución de resolución* y registrar las
401 respuestas de los picos según se indica en
402 *Procedimiento*: la resolución *R* entre el pico
403 correspondiente a insulina humana y el pico
404 correspondiente a desamido insulina humana
405 A21, debe ser mayor o igual a 2,0; el factor de
406 asimetría para el pico de correspondiente a
407 insulina humana no debe ser mayor de 1,8.
408 Cromatografiar 20 µL de la *Preparación*
409 *estándar* y 20 µL de la *Preparación estándar*
410 *diluida para linealidad*, registrar las
411 respuestas de los picos según se indica en
412 *Procedimiento*: el ensayo sólo es válido si la
413 respuesta del pico principal en el
414 cromatograma obtenido a partir la
415 *Preparación estándar* es $10 \pm 0,5$ veces la
416 respuesta del pico principal en el
417 cromatograma obtenido con la *Preparación*
418 *estándar diluida para linealidad*. Si fuera
419 necesario, ajustar el volumen de inyección
420 entre 10 µL y 20 µL, con el fin de que la
421 respuesta esté comprendida en el intervalo de
422 linealidad del detector.

423 *Procedimiento* - Inyectar por separado
424 volúmenes iguales (entre 10 µL y 20 µL
425 según el volumen definido en *Aptitud del*
426 *sistema*) de la *Preparación muestra* y la
427 *Preparación estándar*, registrar los
428 cromatogramas y medir las respuestas de los
429 picos. Calcular el contenido en insulina
430 humana más el correspondiente a la desamido
431 insulina A-21, a partir de la respuesta del pico
432 principal y de la respuesta del pico
433 correspondiente a la desamido insulina A-21
434 en los cromatogramas obtenidos a partir de la
435 *Preparación muestra* y la *Preparación*
436 *estándar*, usando el contenido declarado en el
437 envase de Insulina Humana SR-FA
438 empleado.