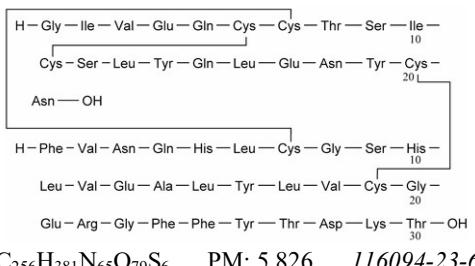


INSULINA ASPÁRTICA



C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆ PM: 5.826 116094-23-6

Definición - La Insulina Aspártica es 28^B-L-aspartato 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, excepto que contiene un ácido aspártico en lugar de prolina en la posición 28 de la cadena B. Al igual que en la insulina humana, Insulina Aspártica contiene dos enlaces disulfuro entre cadenas y un enlace disulfuro dentro de la cadena. Debe contener no menos de 90,0 por ciento y no más de 104,0 por ciento de la sumatoria de insulina aspártica C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆, insulina aspártica A21Asp, insulina aspártica B3Asp, insulina aspártica B3isoAsp e insulina aspártica B28isoAsp, calculado sobre la sustancia seca. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0350 mg de insulina aspártica]. Insulina Aspártica debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

La Insulina Aspártica 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 etanol, en metanol y en soluciones acuosas con un pH de aproximadamente 5,1. En soluciones acuosas con un pH inferior a 3,5 o superior a 6,5 la solubilidad es mayor o igual a 25 mg por mL.

Sustancia de referencia - Insulina Aspártica SR-FA.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos herméticos, a una temperatura menor o igual a -18 °C. Una vez que 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. La Insulina Aspártica debe estar a temperatura ambiente antes de abrir el envase para evitar la absorción de humedad durante la pesada.

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, con un tamaño de poro de 8 nm, con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 μm de diámetro. Mantener la temperatura de la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapa
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 acetonitrilo (70:20:10). Filtrar y desgasificar.

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

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.

Solución de digestión muestra - Preparar una solución de 2 mg por mL de Insulina Aspártica en ácido clorhídrico 0,01 M y transferir 25 µL de la solución a un recipiente apropiado con tapa. Agregar 100 µL de *Solución reguladora de HEPES* y 20 µL de *Solución de enzima*, tapar e incubar a 25 °C durante 6 horas. Inhibir el proceso de digestión agregando 145 µL de *Solución reguladora de sulfato pH 2,0*.

Solución de digestión del estándar - Preparar concomitantemente y de la misma manera que la *Solución de digestión de la muestra*, pero empleando Insulina Aspártica SR-FA.

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*)
- Cromatografiar la *Solución de digestión estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento* e identificar los picos debidos a los fragmentos de digestión I, II y III [NOTA: los tiempos de retención de los fragmentos I, II y IV son los mismos que para insulina humana. El tiempo de retención del fragmento III se diferencia de la insulina humana debido a la sustitución de prolina por ácido aspártico]: el factor de asimetría para 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 8,0.

Procedimiento - Equilibrar el sistema en las condiciones iniciales durante al menos 15 minutos y 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: los cromatogramas obtenidos con la *Solución de digestión de la muestra* y la *Solución de digestión del estándar* deben ser correspondientes.

Determinación del residuo de ignición <270>

No más de 6,0 %; determinado a partir de 200 mg de Insulina Aspártica y calculado sobre la sustancia seca.

Pérdida por secado <680>

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

Proteínas relacionadas

Sistema cromatográfico, Solución de hidróxido fuerte, Solución A, Solución B, Fase móvil, Solución de resolución y Aptitud del sistema - Proceder según se indica en *Valoración*.

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

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo aproximadamente 10 µL de la *Solución muestra*. Calcular el porcentaje de cada proteína relacionada con relación al pico principal: la respuesta del pico correspondiente a insulina aspártica B28isoAsp no debe ser mayor al 1,0 %; la sumatoria de las respuestas debidas a insulina aspártica A21Asp, insulina aspártica B3Asp y insulina aspártica B3isoAsp, no debe ser mayor a 2,0 %; y, la suma de las respuestas de todas las impurezas restantes no debe ser mayor a 1,5 %.

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina aspártica

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

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

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

Solución de resolución - Emplear una solución de insulina de aproximadamente 4 mg por mL, que contenga más de 0,4 % de proteínas de alto peso molecular. Se puede emplear una preparación inyectable de insulina aspártica, tanto si es una solución como una suspensión, que ha sido aclarada con una cantidad suficiente de ácido clorhídrico 6 M, para que contenga el porcentaje indicado de proteínas de elevada masa molecular o se puede utilizar una solución

preparada a partir de insulina aspártica, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 M. También puede obtenerse, dejando reposar insulina aspártica en polvo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 días. [NOTA: conservar entre 2 y 8 °C y usar dentro de los 7 días].

Solución muestra - Disolver 4 mg de Insulina Aspártica en 1,0 mL de ácido clorhídrico 0,01 M. [NOTA: conservar entre 2 y 8 °C y usar dentro de las 48 hs].

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía)

- Cromatografiar la *Solución de resolución* al menos tres veces según se indica en *Procedimiento*: se deben obtener resultados repetitivos en dos inyecciones consecutivas para verificar que la columna esté equilibrada. Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención deben entre 13 y 17 minutos para los complejos de insulina aspártica poliméricos; aproximadamente 17,5 minutos para los dímeros de insulina aspártica; aproximadamente 20 minutos para el monómero de insulina aspártica y aproximadamente 22 minutos para las sales; 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 aproximadamente durante 35 minutos y medir las respuestas de los picos. Ignorar cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el pico de insulina aspártica monómero. La suma de las respuestas de los picos con un tiempo de retención menor que el pico principal no debe ser mayor de 0,5 % de la respuesta total de los picos.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando Insulina Aspártica esté destinada a la preparación de formas farmacéuticas inyectables sin posterior tratamiento de eliminación de endotoxinas bacterianas por un procedimiento apropiado, debe contener menos de 10 Unidades de Endotoxina por mg.

VALORACIÓN

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 4,0 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 5 µm de diámetro. Mantener la temperatura de la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1,0 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Etapa
0 - 35	58	42	Isocrático
35 - 40	58→20	42→80	Gradiente lineal
40 - 45	20	80	Isocrático
45 - 46	20→58	80→42	Gradiente lineal
46 - 60	58	42	Re-equilibrio

Solución de hidróxido de sodio fuerte - Disolver 42 g de hidróxido de sodio en agua y diluir a 100 mL con el mismo solvente.

Solución A - Disolver 142,0 g de sulfato de sodio anhídrido en agua, agregar 13,5 mL de ácido fosfórico, diluir en 5.000 mL de agua y ajustar a pH 3,6 con *Solución de hidróxido de sodio fuerte*, si fuera necesario. Mezclar 9 volúmenes de la solución anterior con 1 volumen de acetonitrilo. Filtrar y desgasificar.

Solución B - Agua y acetonitrilo (50:50). 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).

Preparación estándar - Disolver el contenido de un vial de Insulina Aspártica SR-FA en ácido clorhídrico 0,01 M para obtener una solución que contenga aproximadamente 4 mg por mL de Insulina Aspártica SR-FA. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C y usar dentro de las 48 horas].

Preparación muestra - Preparar una solución que contenga aproximadamente 4 mg por mL de Insulina Aspártica en ácido clorhídrico 0,01 M. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C y usar dentro de las 24 horas].

Solución de resolución - Emplear una solución apropiada que contenga no menos de 1 % de insulina aspártica B3Asp y de insulina aspártica A21Asp. Esto se puede lograr manteniendo *Preparación estándar* a temperatura ambiente de uno a tres días. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C y usar dentro de las 72 horas].

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía)

- Cromatografiar la *Preparación estándar* según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención del pico correspondiente a insulina aspártica debe encontrarse entre 20 y 24 minutos. Cromatografiar la *Solución de resolución* según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención relativos al pico de insulina aspártica deben ser aproximadamente 0,9 para B28isoAsp

insulina aspártica; 1,3 para B3Asp insulina aspártica más A21 Asp insulina aspártica (generalmente coeluyen); 1,5 para B3isoAsp insulina aspártica; la resolución *R* entre el pico correspondiente a insulina aspártica y el pico correspondiente a insulina aspártica A21Asp e insulina aspártica B3Asp debe ser mayor o igual a 2,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 10 µL) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de C₂₅₆H₃₈₁N₆₅O₇₉S₆ más insulina aspártica B28isoAsp, insulina aspártica A21Asp, e insulina aspártica B3Asp e insulina aspártica B3isoAsp, en la porción de Insulina Aspártica en ensayo.