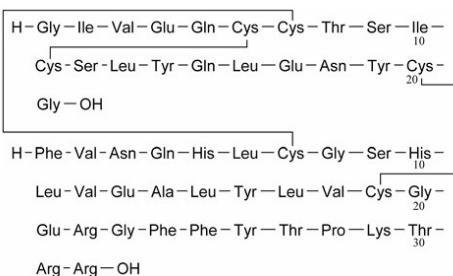


INSULINA GLARGINA



C₂₆₇H₄₀₄N₇₂O₇₈S₆ PM: 6.063 160337-95-1

Definición - La Insulina Glargina es 21^A-Glicina-30^{B-a}-L-Arginina-30^{B-b}-L-Arginina-insulina (humana). Es un péptido de dos cadenas que contiene 53 aminoácidos. La cadena A está compuesta por 21 aminoácidos y la cadena B por 32 aminoácidos. Su estructura primaria es idéntica a la de la insulina humana, sólo difiere en la secuencia del aminoácido de la posición 21 de la cadena A y en el extremo C-terminal de la cadena B que contiene dos aminoácidos adicionales. En la insulina humana es Asn(21A), mientras que la insulina Glargina es Gly(21A), Arg(B31) y Arg(B32). Al igual que en la insulina humana, la Insulina Glargina contiene dos enlaces disulfuro entre cadenas y un enlace disulfuro intracadena. Insulina Glargina debe contener no menos de 94,0 por ciento y no más de 105,0 por ciento de C₂₆₇H₄₀₄N₇₂O₇₈S₆ calculado sobre la sustancia anhidra. [NOTA: una Unidad Internacional de Insulina equivale a 0,0364 mg de insulina glargina]. Insulina Glargina debe cumplir con las siguientes especificaciones.

PRODUCCIÓN

La Insulina Glargina 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 higroscópico blanco o casi blanco. Prácticamente insoluble en agua y etanol anhídrico. Se disuelve en ácidos minerales diluidos.

Sustancias de referencia - Insulina Glargina SR-FA. Insulina Glargina para la identificación de picos SR-FA (contiene insulina glargina y 0^A-Arg-insulina glargina).

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos herméticos, a una temperatura entre - 15 °C y - 25 °C.

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* se 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 125 cm × 3,0 mm, con fase estacionaria totalmente encapada constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas esféricas de sílice de 4 µm de diámetro. Mantener la temperatura de la columna a 35 °C. El caudal debe ser aproximadamente 0,6 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Etapa
0 - 30	90 → 20	10 → 80	Gradiente lineal
30 - 35	20	80	Isocrático
35 - 40	90	10	Re-equilibrio

Solución reguladora - Disolver 11,6 g de ácido fosfórico y 42,1 g de perclorato de sodio en 1.600 mL de agua, ajustar el pH a 2,3 con trietilamina y diluir a 2.000 mL con agua.

Solución A - *Solución reguladora* y acetonitrilo (93:7). Filtrar y desgasificar.

Solución B - Acetonitrilo y *Solución reguladora* (57:43). 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 reguladora de tris-clorhidrato 1 M, pH 7,5 - Disolver 12,11 g de tris(hidroximetil)aminometano en 90 mL de agua, ajustar a pH 7,5 con ácido clorhídrico y diluir a 100,0 mL con agua.

Solución de enzima - Preparar una solución a partir de un polvo liofilizado de proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* cepa V-8, tipo XVII-B en *Solución reguladora de tris-clorhidrato 1 M, pH 7,5* para obtener una solución de aproximadamente 20 unidades de proteasa por mL.

Solución muestra - Preparar una solución de aproximadamente 10,0 mg de Insulina Glargina por mL en una solución de 1 g de ácido clorhídrico por litro. Transferir 5 µL de la solución a un tubo limpio y agregar 1,0 mL de *Solución reguladora de tris-clorhidrato 1 M, pH 7,5* y 100 µL de *Solución de enzima*. Mezclar e incubar a 45 °C durante aproximadamente 2 horas. Detener la reacción añadiendo 2 µL de ácido fosfórico.

Solución estándar - Preparar concomitantemente y de la misma manera que la *Solución muestra*, una solución que contenga Insulina Glargina SR-FA en lugar de la sustancia en ensayo.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía)

- Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: los tiempos de retención del fragmento de digestión II de insulina glargina y el fragmento de digestión III de insulina glargina deben ser aproximadamente 14 minutos y 15 minutos, respectivamente. [NOTA: los tiempos de retención de los fragmentos I y IV son los mismos que para insulina humana. Los tiempos de retención de los fragmentos II y III difieren los de insulina humana debido a la diferencia en la secuencia de la posición 21 de la cadena A y a los 2 aminoácidos adicionales de la cadena B.] En el cromatograma obtenido a partir de la *Solución estándar* el factor de asimetría para los picos correspondientes a los fragmentos de digestión II y III no debe ser mayor a 1,5; la resolución *R* entre los picos correspondientes a los fragmentos de digestión II y III no debe ser menor a 3,4.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 50 µL) de la *Solución estándar* y la *Solución de muestra*. Registrar los cromatogramas: los cromatogramas obtenidos con la *Solución muestra* y la *Solución estándar* deben ser correspondientes.

Determinación de agua <120>

Titulación culombimétrica. No debe contener más de 8,0 %, determinado sobre una porción de 30,0 mg.

Proteínas relacionadas

Sistema cromatográfico, Solución reguladora, Solución A, Solución B, Fase móvil, Diluyente, 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 5 µL de la *Solución muestra* y registrar las respuestas de todos los picos: la respuesta de ningún pico secundario debe ser mayor a 0,4 % y la suma de las respuestas de todos los picos secundarios no debe ser mayor a 1,0 %.

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina glargina

Sistema cromatográfico - Examinar por cromatografía de exclusión por tamaño molecular empleando 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 10 µm de diámetro con un tamaño de poro de 12,5 nm, en un grado adecuado para el fraccionamiento de proteínas globulares de molecular relativo en un rango de peso de 5.000 a 150.000. 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).

[NOTA: Conservar la *Solución de resolución* a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y usar dentro de los 7 días].

Solución de resolución - Secar aproximadamente 200 mg de Insulina Glargina en una estufa a 100 °C durante 1,5 a 3 horas. Disolver 15,0 mg de la sustancia seca en 1,5 mL de una solución de ácido clorhídrico de 1 g por litro y diluir a 10,0 mL con agua.

Solución muestra - Preparar una solución de aproximadamente 4 mg de Insulina Glargina por mL de una solución de ácido clorhídrico de 1 g por litro.

Solución estándar - Diluir 1,0 mL de *Solución muestra* a 100,0 mL con agua. Diluir 3,0 mL de la solución anterior a 20,0 mL con agua.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía)

- Cromatografiar la *Solución estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención para insulina glargina debe ser de aproximadamente 18 minutos; la relación señal-ruido debe ser mayor o igual a 10. Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el factor de asimetría debe ser menor o igual a 2,0 para el pico correspondiente a insulina glargina; la relación pico/valle *p/v* determinada por la relación entre

la altura del pico debido a las proteínas de alto peso molecular *Hp* y la altura del valle de separación entre este pico y el pico correspondiente a insulina glargina *Hv* debe ser mayor o igual a 2,0.

Procedimiento - Inyectar en el cromatógrafo 100 µL de la *Solución muestra*, registrar el cromatograma durante aproximadamente 35 minutos y medir las respuestas de los picos: el total de impurezas con un tiempo de retención menor que el de insulina glargina debe ser menor o igual al 0,3 % del área total de los picos; descartar cualquier pico con un tiempo de retención mayor que el del pico debido a la insulina glargina.

Cinc

Diluyente - Preparar una solución de ácido clorhídrico de 1 g por litro.

Soluciones estándar - Preparar soluciones que contengan 0,2 µg; 0,4 µg y 0,6 µg de cinc por mL mediante la dilución de una solución estándar de zinc (10 ppm Zn) con *Diluyente*.

Solución muestra - Disolver al menos 45,0 mg de Insulina Glargina con *Diluyente* y diluir a 50,0 mL del mismo solvente. Diluir 10,0 mL de la solución anterior a 100,0 mL con *Diluyente*.

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). No debe contener más de 0,80 %.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando Insulina Glargina esté destinada a la preparación 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 ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 3,0 mm con fase estacionaria totalmente encapsulada constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas esféricas de sílice de 4 µm de diámetro. Mantener la temperatura de la columna a 35 °C. El caudal debe ser aproximadamente 0,6 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del siguiente modo:

Tiempo (minutos)	<i>Solución A</i> (%)	<i>Solución B</i> (%)	Etapa
0-20	96→83	4→17	Gradiente lineal
20-30	83→63	17→37	Gradiente lineal
30-33	63→96	37→4	Gradiente lineal
33-40	96	4	Re-equilibrio

Solución reguladora - Disolver 20,7 g de fosfato dihidrógeno de sodio anhídrico en 900 mL de agua, ajustar a pH 2,5 con ácido fosfórico y diluir a 1.000 mL con agua.

Solución A - Disolver 18,4 g de cloruro de sodio en 250 mL de *Solución reguladora*, agregar 250 mL de acetonitrilo y mezclar. Diluir a 1.000 mL con agua. Filtrar y desgasificar.

Solución B - Disolver 3,2 g de cloruro de sodio en 250 mL de *Solución reguladora*, agregar 650 mL de acetonitrilo y mezclar. Diluir a 1.000 mL con agua. 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*).

Diluyente - Preparar una solución de ácido clorhídrico de 1 g por litro.

Preparación estándar - Disolver el contenido de un vial de Insulina Glargina SR-FA en 1,5 mL de *Diluyente* y diluir a 10,0 mL con agua. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C].

Preparación muestra - Disolver 15,0 mg de Insulina Glargina en 1,5 mL de *Diluyente* y diluir a 10,0 mL con agua. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C].

Solución de resolución - Disolver el contenido del vial de Insulina Glargina para la identificación de picos SR-FA en 0,3 mL de *Diluyente* y agregar 1,7 mL de agua. [NOTA: mantener la temperatura de la solución entre 2 °C y 8 °C].

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*)

- Cromatografiar la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención de insulina glargina debe ser aproximadamente 20 minutos. Cromatografiar la *Solución de resolución* y registrar las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la relación pico/valle *p/v* determinada por la relación entre

la altura del pico debido a O^{A} -Arg-insulina glargina H_p y la altura del valle de separación entre este pico y el pico correspondiente a insulina glargina H_v debe ser mayor o igual a 2,0.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 μL) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar* y registrar las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad de $\text{C}_{267}\text{H}_{404}\text{N}_{72}\text{O}_{78}\text{S}_6$ en la porción de Insulina Glargina en ensayo.