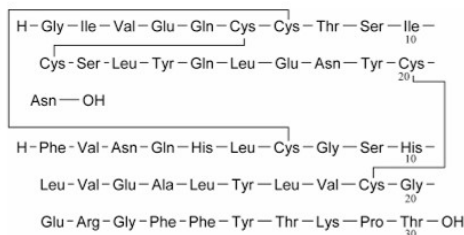


INSULINA LISPRO



$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ 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 inactivos 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 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 LisPro en ácido clorhídrico 0,01 M y transferir 500 µL de la solución a un tubo limpio. Agregar 2 mL de *Solución reguladora de HEPES* y 400 µL de *Solución de enzima*, tapar e incubar a 25 °C durante 6 horas. Inhibir el proceso de digestión agregando 2,9 mL 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 LisPro 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 la insulina humana. El tiempo de retención del fragmento III se diferencia de la insulina humana debido a diferencias en la posición de las secuencias 28 y 29 de la cadena B.]: el factor de asimetría de 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.

Ensayo de endotoxinas bacterianas <330>

Cuando Insulina LisPro 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.

Determinación del residuo de ignición <270>

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

Pérdida por secado <680>

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

Proteínas relacionadas

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 214 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm, con un tamaño de poro de 30 nm, con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosas de 5 µm de diámetro. Mantener la temperatura de la columna a 40 °C. El caudal debe ser aproximadamente 1 mL por minuto. Programar el cromatógrafo del 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

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

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

Solución B - *Solución de sulfato de sodio pH 2,3* 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*).

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

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

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

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

Impurezas con peso molecular mayor que la insulina lispro

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 a 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 LisPro 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 lispro (solución o 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 lispro, disuelta en ácido clorhídrico 0,01 M. También puede obtenerse, dejando reposar insulina en polvo a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 días o incubando 100 mg de Insulina LisPro a 100°C durante 10 minutos. [NOTA: mantener la temperatura de las soluciones entre 2 y 8 °C y emplearlas en un lapso de 8 días].

Solución muestra - Disolver 4 mg de Insulina LisPro en 1,0 mL de ácido clorhídrico 0,01 M. [NOTA: mantener la temperatura entre 2 y 8 °C, emplear 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 ser de 13 a 17 minutos para los complejos de insulina lispro poliméricos; aproximadamente 17,5 minutos para los dímeros de insulina; aproximadamente 20 minutos para los monómeros de insulina, y aproximadamente 22 minutos para las sales; la relación pico/valle *p/v* determinada como 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 de 2,0; el factor de simetría para el pico correspondiente a insulina lispro debe ser menor 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 lispro monómero. La suma de las respuestas de los picos con un tiempo de retención menor que el pico principal no debe ser mayor de 0,25 % de la respuesta total de los picos.

Cinc

Soluciones estándar - Preparar soluciones que contengan entre 0,2 y 0,8 µg de cinc por mililitro mediante la dilución de una solución estándar de cinc (5 mg por mL de Zn) con ácido

clorhídrico 0,01 M [NOTA: preparar estas soluciones en el momento de su uso].

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

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 la muestra en ensayo: debe contener no más de 1,0 % determinado sobre la sustancia seca.

VALORACIÓN

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

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

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

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

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

Aptitud del sistema (ver 100. *Cromatografía*)

- Cromatografiar la *Preparación estándar* según se indica en *Procedimiento*: el tiempo de retención del pico correspondiente a insulina lispro debe ser aproximadamente 24 minutos; la desviación estándar relativa para tres inyecciones repetidas debe ser menor o igual a 1,1 %. Cromatografiar la *Solución de resolución* según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* el pico correspondiente a insulina lispro y el pico correspondiente a desamido insulina lispro A21 debe ser mayor a 1,8.

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