

## Valoración de Insulina <121>

<b>Tipo de Publicación</b>	Boletín de Revisión
<b>Fecha de Publicación</b>	29-mar-2019
<b>Fecha Oficial</b>	01-may-2019
<b>Comité de Expertos</b>	Monografías 1 de Productos Biológicos—Péptidos
<b>Motivo de la Revisión</b>	Omitir el ER Insulina Bovina USP y los requisitos relacionados con la insulina bovina debido a la ausencia de productos de insulina bovina comerciales en los Estados Unidos

De conformidad con las Reglas y Procedimientos del Consejo de Expertos 2015–2020, el Comité de Expertos en Monografías 1 de Productos Biológicos—Péptidos ha revisado el capítulo general <121> Valoración de Insulina. El propósito de esta revisión es eliminar el ER Insulina Bovina USP y los requisitos relacionados con la insulina bovina debido a que no existe ningún fabricante aprobado de insulina bovina terapéutica en los Estados Unidos y los materiales de referencia adecuados no están disponibles.

Si bien se usa el ER Insulina Bovina USP como un Estándar de Referencia en la *Valoración* en el capítulo Valoración de Insulina <121> para las insulinas de origen bovino o de origen bovino y porcino combinado, no existe ningún uso de este Estándar de Referencia para las insulinas no bovinas. Por lo tanto, se han eliminado del capítulo las referencias a la insulina bovina y al ER Insulina Bovina USP.

El Boletín de Revisión del capítulo Valoración de Insulina <121> reemplaza el capítulo general oficial vigente y será incorporado en una próxima publicación.

Para cualquier pregunta, por favor contactar a Diane McCarthy, Senior Manager (301-692-3637 o [diane.mccarthy@usp.org](mailto:diane.mccarthy@usp.org)).

## <121> VALORACIÓN DE INSULINA

### INTRODUCCIÓN

La manifestación más importante de la actividad de la insulina, un brusco descenso de la glucosa en sangre, sirvió de base para valoraciones biológicas desde sus primeros usos clínicos. El procedimiento, si bien es relativamente complejo, tiene el gran mérito de reflejar con exactitud el efecto en el paciente diabético. La aparición de métodos fisicoquímicos prácticos pero sofisticados (por ejemplo la cromatografía líquida) para medir cuantitativamente la potencia de la insulina ha dado lugar a pruebas farmacopeicas más precisas y exactas para la insulina y los productos derivados de la insulina. Sin embargo, no se puede determinar la identidad biológica de la insulina y de sus productos por estos métodos. Por esta razón, se incluye en este capítulo una prueba de bioidentidad en conejos y su uso se especifica en las monografías correspondientes.

El *Método de Determinación de Glucosa en Sangre de Conejos—Cuantitativo* se usa para determinar la potencia de los Estándares de Referencia de la Insulina, para la validación de la estabilidad de nuevas preparaciones de insulina y para determinar las actividades específicas de los análogos de la insulina.

### VALORACIÓN

#### Cambio en la redacción:

#### • MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE DE CONEJOS—CUANTITATIVO

**Diluyente:** Preparar una solución acuosa que contenga de 0,1% a 0,25% (p/v) de cresol o de fenol, de 1,4% a 1,8% (p/v) de glicerina y suficiente ácido clorhídrico para obtener un pH entre 2,5 y 3,5, a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual.

**Solución madre del estándar:** Preparar una solución que contenga 40 Unidades USP de Insulina/mL a partir de ER Insulina USP de las especies apropiadas en *Diluyente* y con un pH entre 2,5 y 3,5, a menos que se especifique algo diferente en la monografía individual. ▲ (BR 1-May-2019) Almacenar en un lugar frío, proteger contra la congelación y usarla dentro de un período de 6 meses.

**Soluciones estándar:** Diluir porciones de la *Solución madre del estándar* con *Diluyente* para obtener dos soluciones, una que contenga 1,0 Unidad USP de Insulina/mL (*Solución estándar 1*), y otra que contenga 2,0 Unidades USP de Insulina/mL (*Solución estándar 2*).

**Solución madre de la muestra:** Proceder según se indica en *Solución madre del estándar*, excepto que se debe usar una cantidad adecuada de la preparación en análisis en lugar de ER Insulina USP de la especie apropiada. La *Solución madre de la muestra* contiene aproximadamente 40 Unidades USP de Insulina/mL.

**Soluciones muestra:** Diluir porciones de la *Solución madre de la muestra* con *Diluyente* para obtener dos diluciones de la preparación en análisis, una de las cuales se puede esperar que contenga 1,0 Unidad USP de Insulina/mL (*Solución muestra 1*), basándose en la potencia supuesta, y la otra que contenga 2,0 Unidades USP de Insulina/mL (*Solución muestra 2*). En el caso de una inyección de insulina neutra, ajustar a un pH entre 2,5 y 3,5 antes de realizar las diluciones.

**Dosis de las soluciones a inyectar:** Seleccionar la dosis de las diluciones a inyectar, basándose en pruebas o experiencias anteriores, cuyo volumen generalmente está entre 0,30 mL y 0,50 mL. Para cada animal, el volumen de la *Solución estándar* es el mismo que el de la *Solución muestra*.

**Preparación de los animales:** Seleccionar conejos adecuados y sanos que no pesen menos de 1,8 kg cada uno. Mantener los conejos en el laboratorio durante no menos de 1 semana antes de utilizarlos en la valoración y alimentarlos con una dieta uniforme satisfactoria, con acceso libre al agua en todo momento.

**Análisis:** Dividir los conejos en cuatro grupos iguales, preferentemente de no menos de seis conejos cada uno. El día anterior al procedimiento, aproximadamente 20 horas antes de la valoración, suministrar a cada conejo alimento suficiente para que se consuma en 6 horas. Seguir este mismo programa de alimentación antes de cada día de prueba. Durante la valoración, no suministrar alimentos hasta no haber extraído la última muestra de sangre. Manipular los conejos con cuidado para evitar una excitación indebida e inyectar subcutáneamente las dosis indicadas en el siguiente diseño (ver la *Tabla 1*), la segunda inyección se debe administrar el día posterior a la primera inyección o no más de 1 semana después. El tiempo entre la primera y la segunda inyección es el mismo para todos los conejos.

Tabla 1

Grupo	Primera Inyección	Segunda Inyección
1	<i>Solución estándar 2</i>	<i>Solución muestra 1</i>
2	<i>Solución estándar 1</i>	<i>Solución muestra 2</i>
3	<i>Solución muestra 2</i>	<i>Solución estándar 1</i>
4	<i>Solución muestra 1</i>	<i>Solución estándar 2</i>

**Muestras de sangre:** A 1 hora  $\pm$  5 minutos y 2½ horas  $\pm$  5 minutos después de la inyección, extraer de cada conejo una muestra adecuada de sangre de una vena marginal de la oreja. La sangre también se puede extraer eficazmente de la arteria auricular central.

**Determinación de dextrosa:** Determinar el contenido de dextrosa en las muestras de sangre mediante un procedimiento adecuado que se adapte a un análisis automatizado. Se puede utilizar el siguiente procedimiento.

**Solución anticoagulante:** Disolver 1 g de edetato sódico y 200 mg de fluoruro de sodio en 1 L de agua y mezclar.

**Preparaciones estándar de dextrosa:** Transferir concentraciones conocidas de ER Dextrosa USP a recipientes adecuados y diluir cuantitativamente y en diluciones sucesivas con *Solución anticoagulante* (1:9) para obtener una serie de *Preparaciones estándar de dextrosa* que contengan entre 20 mg y 100 mg por 100 mL, con concentraciones conocidas similares a las concentraciones de las muestras de sangre de los conejos.

**Preparaciones muestra:** Pipetear y transferir a sendos recipientes adecuados 0,1 mL de cada *Muestra de sangre* y 0,9 mL de *Solución anticoagulante*.

**Análisis:** Someter a diálisis las *Preparaciones muestra* a través de una membrana semipermeable durante un tiempo suficiente de modo que la dextrosa pase a través de la membrana a una solución salina SR que contenga oxidasa de glucosa, peroxidasa de rábano, clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona SR y *N,N*-dimetilnilina. Las absorbancias de las *Preparaciones muestra* se determinan a 600 nm en un colorímetro con registrador. Las absorbancias de las *Preparaciones Estándar de Dextrosa* se determinan de manera similar al comienzo y al final de cada corrida.

**Cálculos:** Calcular la respuesta de cada conejo a cada inyección a partir de la suma de los dos valores de glucemia y restar su respuesta, sin tomar en cuenta el orden cronológico en el cual se observaron las respuestas, para obtener las diferencias individuales,  $y$ , según se indica en la *Tabla 2*.

Cuando falten datos de uno o más conejos en una valoración, no usar las fórmulas de intervalo de confianza que se brindan en la presente valoración, sino que se debe usar otro procedimiento estadístico. Los datos aún pueden analizarse con un análisis de varianza apropiado.

Cuando el número de conejos,  $f$ , usado en la valoración sea igual en cada grupo, determinar la suma de  $y$  para cada grupo y calcular:

$$T_a = -T_1 + T_2 + T_3 - T_4$$

y

$$T_b = T_1 + T_2 + T_3 + T_4$$

El logaritmo de la potencia relativa de las diluciones de prueba es  $M' = 0,301 T_a/T_b$ . La potencia de la inyección en Unidades USP/mg es igual al antilogaritmo ( $\log R + M'$ ), donde:

$$R = v_s/v_u$$

$v_s$  = número de Unidades USP/mL de la *Solución estándar*

$v_u$  = número de mg/mL de insulina de la *Solución muestra* correspondiente

Determinar el intervalo de confianza del logaritmo de la potencia relativa con una confianza del 95% usando el Teorema de Fieller (ver el *Apéndice y Diseño y Análisis de Valoraciones Biológicas* (111)). Si el intervalo de confianza es mayor de 0,082, que corresponde, a  $P = 0,95$ , a límites de confianza de aproximadamente  $\pm 10\%$  de la potencia calculada, repetir la valoración hasta que los datos combinados de dos o más valoraciones, redeterminadas según se describe en *Combinación de Valoraciones Independientes en Diseño y Análisis de Valoraciones Biológicas* (111), cumplan con este límite aceptable.

**Tabla 2**

Grupo	Diferencias	Respuesta Individual ( $y$ )	Respuesta Total ( $T$ )	Desviaciones Estándar de Diferencias ( $S$ )
1	<i>Solución estándar 2 – Solución muestra 1</i>	$y_1$	$T_1$	$S_1$
2	<i>Solución muestra 2 – Solución estándar 1</i>	$y_2$	$T_2$	$S_2$
3	<i>Solución muestra 2 – Solución estándar 1</i>	$y_3$	$T_3$	$S_3$
4	<i>Solución estándar 2 – Solución muestra 1</i>	$y_4$	$T_4$	$S_4$

#### Apéndice: Teorema de Fieller para Determinar el Intervalo de Confianza para un Cociente

Esta versión del Teorema de Fieller es para el caso en el cual el numerador y el denominador no están correlacionados. La ecuación asume que el numerador y el denominador están normalmente distribuidos y que los grupos de conejos son del mismo tamaño.

Entonces, el intervalo de confianza de 95% para el cociente es:

$$(L, U) = \frac{M' \pm \frac{t}{T_b} \sqrt{(1-g)S_N^2 + (M')^2 S_D^2}}{1-g}$$

donde  $f$  (grados de libertad en los errores estándar) =  $4(k-1)$ , donde  $k$  es la cantidad de conejos en un grupo,  $t$  es el percentil superior de 97,5 de la distribución  $t$  con  $f$  grados de libertad, y

$$g = \frac{t^2 S_D^2}{T_b^2}$$

Si  $g \geq 1$ , el denominador no es significativamente diferente a 0 y la fórmula no funciona.

$$S_N = 0,301 \sqrt{k} \sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2}$$

$$S_D = \sqrt{k} \sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2}$$

• **PRUEBA DE BIOIDENTIDAD**

Proceder según se indica en el *Método de Determinación de Glucosa en Sangre de Conejos—Cuantitativo* con las siguientes modificaciones.

**Procedimiento:** Dividir los conejos en cuatro grupos iguales de dos conejos cada uno.

**Cálculos:** Proceder según se indica para *Cálculos* en *Método de Determinación de Contenido de Glucosa en Sangre de Conejos—Cuantitativo* pero no determinar el intervalo de confianza del logaritmo de la potencia relativa, *M'*.

**Interpretación:** Si el valor de la potencia obtenido no es menor de 15 Unidades USP/mg, se cumple el requisito de la *Prueba de Bioidentidad*. Si el valor de la potencia es menor de 15 Unidades USP/mg, repetir la prueba usando ocho conejos más. Si la potencia promedio de los dos conjuntos de pruebas no es menor de 15 Unidades USP/mg, se cumple el requisito de la prueba.

**REQUISITOS ADICIONALES**

**Cambio en la redacción:**

• **ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP (11)**

ER Dextrosa USP  
ER Insulina Asparta USP

▲ (BR 1-May-2019)

ER Insulina Glargina USP  
ER Insulina Humana USP  
ER Insulina Lispro USP  
ER Insulina Porcina USP