

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de mayo y hasta el 30 de junio de 2022, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: _____
Dirección: _____
Correo electrónico: _____

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|--|------------|----------------|
| <p>FILGRASTIM</p> <p>El rhu-G-CSF (Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos o Filgrastim) producido por <i>E. coli</i> es una proteína de 175 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 18.8 kDa. La proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia natural como resultado del análisis de ADN humano, excepto por la presencia de una metionina N-terminal, resultado de la expresión en <i>E. coli</i>. El G-CSF producido en <i>E. coli</i> no está glicosilado y por ende difiere del aislado de células humanas. La función del rhu-G-CSF humano es estimular la proliferación y diferenciación de células madre leucocitarias hacia granulocitos maduros.</p> <p>A continuación se presenta la secuencia de aminoácidos del rhu-G-CSF humano recombinante tal como es sintetizado por la clona bacteriana:</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| <p><i>Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de Filgrastim.</i></p> <p>MTPLGPASSL PQSFLLKCLE QVRKIQGDGA ALQEKLCATY KLCHPEELVL LGHSLGIPWA PLSSCPSQAL QLAGCLSQLH SGLFLYQGLL QALEGISPEL GPTLDTLQLD VADFATTIWQ QMMELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAG GVLVASHLQS FLEVSYRVLR HLAQP</p> <p>C₈₄₅H₁₃₃₉N₂₂₃O₂₄₃S₉ PM 18799</p> | | |
| <p>BIOFÁRMACO (SOLUCIÓN CONCENTRADA)</p> | | |
| <p>La solución contiene no menos de 0.6 mg de proteína por mililitro y una potencia de no menos de 0.9 x 10⁸ UI por miligramo de proteína.</p> | | |
| <p>DESCRIPCIÓN. Solución clara incolora o ligeramente amarilla, libre de partículas extrañas.</p> | | |
| <p>FABRICACIÓN. El Filgrastim es producido con tecnología del ADN recombinante usando bacterias como hospedero. Se fabrica bajo condiciones que minimicen la contaminación microbiana del producto.</p> | | |
| <p>ENSAYOS DE IDENTIDAD.</p> | | |
| <p>Deberán aplicarse una de las siguientes alternativas, comparando con una preparación de referencia.</p> <p>Alternativa 1: Ensayos de identidad: A, B, C y D. Alternativa 2: A, B, C y E.</p> | | |
| <p>A. Potencia. Debe inducir la proliferación celular.</p> | | |
| <p>B. Enfoque isoeléctrico. El punto isoeléctrico se encuentra en 6 ± 0.2 unidades de pH conforme al</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|--|------------|----------------|
| <p>método que se indica en esta monografía.</p> | | |
| <p>C. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. MGA 0311. Tiene un peso molecular relativo de alrededor de 18.8 kDa en comparación con una preparación de referencia conforme al método que se indica en esta monografía.</p> | | |
| <p>D. Mapeo peptídico. MGA 0241, CLAR. MGA 0536. Preparación de la muestra. Colocar en un tubo de polipropileno, 50 µL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.02 M pH 8.0, agregar un volumen de la muestra correspondiente a 25 µg de proteína. Adicionar 25 µL de una solución a 0.1 mg/mL de glutamil endopeptidasa para mapeo peptídico, diluir a 1 mL con agua, tapar el tubo e incubar a cerca de 37 °C durante 18 h. Adicionar 125 µL de una solución de clorhidrato de guanidina 764 g/L (8 M) y mezclar bien; adicionar 10 µL de una solución de ditiotreitól 154.2 g/L (1 M), mezclar bien. Colocar el tubo cerrado en agua en ebullición por 1 min, después dejar enfriar a temperatura ambiente.</p> | | |
| <p>Preparación de referencia. Preparar de la misma forma como se preparó la muestra, utilizando SRef de filgrastim en lugar de la muestra.</p> | | |
| <p>Sistema cromatográfico Fase móvil 1. Diluir 0.5 mL de ácido trifluoroacético en 950 mL de agua, agregar 50 mL de acetonitrilo para cromatografía y mezclar. Fase móvil 2. Diluir 0.5 mL de ácido</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | | | Debe decir | Justificación* |
|--|---------------------|---------------------|------------|----------------|
| trifluoroacético en 50 mL de agua, agregar 950 mL de acetonitrilo para cromatografía y mezclar. | | | | |
| Tiempo (min) | Fase móvil 1% (v/v) | Fase móvil 2% (v/v) | | |
| 0-8 | 97 → 94 | 3 → 6 | | |
| 8-25 | 94 → 66 | 6 → 34 | | |
| 25-40 | 66 → 10 | 34 → 90 | | |
| 40-45 | 10 | 90 | | |
| Nota: previo a la inyección de la muestra, el sistema deberá equilibrarse a las condiciones del tiempo cero. | | | | |
| Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 215 nm, columna de 2.1 mm × 10 cm, empacada con octadecilsilil octadecilsilano silica gel para cromatografía (5 µm) con tamaño de poro de 20 nm, temperatura 60 °C, velocidad de flujo de 0.2 mL/min. Volumen de inyección: 10 µL. | | | | |
| Aptitud del sistema. El cromatograma obtenido con la preparación de referencia deberá corresponder al cromatograma del certificado de la SRef de filgrastim. | | | | |
| Resultados. El perfil del cromatograma obtenido con la preparación de la muestra deberá corresponder al del cromatograma obtenido con la preparación de referencia. | | | | |
| E. Secuencia N-terminal. Los primeros 15 aminoácidos secuenciados a partir del amino terminal deberán ser: Met-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu. Hacer una | | | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| <p>degradación de Edman en un equipo secuenciador de fase sólida automatizado, operado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cargar aproximadamente 1 mmol del material a probar en el cartucho del secuenciador usando el protocolo aprobado por el fabricante. Correr al menos 15 ciclos de secuenciación. Identificar los derivados de fenilhidantoína (PTH) de los aminoácidos liberados en cada ciclo de secuenciación por CLAR de fase reversa. El procedimiento puede llevarse a cabo usando la columna y los reactivos recomendados por el fabricante del secuenciador para separar los aminoácidos PTH. El procedimiento de separación se calibra usando: –La mezcla de aminoácidos PTH suministrada por el fabricante del secuenciador, con las condiciones del gradiente ajustadas para lograr la máxima resolución de todos los aminoácidos. –Una mezcla obtenida del primer ciclo de secuenciación en blanco de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del equipo.</p> | | |
| <p>ENDOTOXINAS BACTERIANAS. MGA 0316. No más de 2.0 UE⁺ de endotoxina por miligramo de proteína.</p> | | |
| <p>PROTEÍNAS DEL HOSPEDERO. No más de 10 ppm. De acuerdo al método propuesto y validado por el fabricante.</p> | | |
| <p>ADN RESIDUAL. No más de 400 pg/mg de proteína de acuerdo al método propuesto y validado por el fabricante.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| <p>IMPUREZAS CON PESOS MOLECULARES MAYORES QUE EL DE FILGRASTIM. MGA 0241, CLAR. El total de picos con tiempos de retención menores que el del pico principal debe ser no más del 2 %. El total de picos con tiempos de retención menores que al dímero debe ser no más del 0.5%. Determinar por cromatografía de exclusión molecular. Emplear el procedimiento de normalización.</p> | | |
| <p>Solución 1. Disolver 4.1 g de acetato de sodio en 400 mL de agua, ajustar el pH a 4.0 con ácido acético y diluir a 500 mL con agua.</p> | | |
| <p>Preparación de la muestra. Diluir la preparación que se va a analizar con la solución 1 hasta obtener una concentración de 0.4 mg/mL.</p> | | |
| <p>Preparación de la referencia. Diluir una cantidad de SRef de Filgrastim con solución 1 para obtener una concentración de 0.4 mg/mL.</p> | | |
| <p>Solución de resolución. Mezclar una porción de la preparación de referencia en vórtex durante 30 s aproximadamente.</p> | | |
| <p>Fase móvil. Disolver 7.9 g de bicarbonato de amonio en 1 000 mL de agua y ajustar el pH a 7.0 con SR de ácido fosfórico y diluir a 2 000 mL con agua.</p> | | |
| <p>Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 215 nm, columna de 7.8 mm × 30 cm, empacada con sílica gel hidrofílica para cromatografía (5 µm) de un grado apropiado para fraccionamiento de proteínas globulares en el rango de peso molecular relativo</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| de 10 000 a 500 000, temperatura 30 °C, velocidad de flujo de 0.5 mL/min, volumen de inyección de 20 µL. | | |
| Retención relativa con referencia al monómero de filgrastim (tiempo de retención: cerca de 19 min); agregados aproximadamente 0.60; oligómero de filgrastim 1 aproximadamente 0.75; oligómero de filgrastim 2 aproximadamente 0.80; dímero de filgrastim aproximadamente 0.85. | | |
| Aptitud del sistema. Utilizar la solución de resolución. El tiempo de retención del monómero de filgrastim es de 17 a 20 min; la resolución es no menor de 3 entre los picos del dímero y monómero de filgrastim. Calcular el porcentaje del contenido del dímero, oligómeros y agregados. | | |
| IMPUREZAS CON PESOS MOLECULARES DIFERENTES AL DEL FILGRASTIM. MGA 0311, Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, condiciones reducidas y no reducidas. En la preparación de la muestra 1 las impurezas con pesos moleculares menores o mayores que el de filgrastim, ninguna banda deberá ser más intensa que la banda principal en el electroferograma obtenido con la preparación de la muestra 4 (2 %). | | |
| Dimensiones del gel. 1 mm de espesor. | | |
| Gel de resolución. Acrilamida al 13 %. | | |
| Solución amortiguadora para muestras (condiciones no reducidas). Mezclar volúmenes iguales de agua y solución amortiguadora | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| concentrada para muestras SDS-PAGE. | | |
| <p>Solución amortiguadora concentrada para muestras SDS-PAGE. Disolver 1.89 g de tris (hidroximetil) amino metano, 5.0 g de lauril sulfato de sodio y 50 mg de azul de bromofenol en agua. Añadir 25.0 mL de glicerol y diluir a 100 mL con agua. Ajustar el pH a 6.8 con ácido clorhídrico y diluir a 125 mL con agua.</p> | | |
| <p>Solución amortiguadora para muestras (condiciones reducidas). Mezclar volúmenes iguales de agua y solución amortiguadora concentrada para muestras SDS-PAGE en condiciones reducidas que contiene 2-mercaptoetanol como agente reductor.</p> | | |
| <p>Solución amortiguadora concentrada para muestras SDS-PAGE en condiciones reducidas. Disolver 3.78 g de tris (hidroximetil) amino metano, 10.0 g dodecil sulfato de sodio y 100 mg de azul de bromofenol en agua. Agregar 50.0 mL de glicerol y diluir a 200 mL con agua. Añadir 25.0 mL de 2-mercaptoetanol. Ajustar el pH a 6.8 con ácido clorhídrico y diluir a 250.0 mL con agua. Alternativamente se puede emplear ditiotreitól como agente reductor en lugar del 2-mercaptoetanol. En este caso preparar la solución amortiguadora como sigue: disolver 3.78 g de tris (hidroximetil) amino metano, 10.0 g dodecil sulfato de sodio y 100 mg de azul de bromofenol en agua. Agregar 50.0 mL de glicerol y diluir a 200 mL con agua. Ajustar el pH a 6.8 con ácido clorhídrico y diluir a 250.0 mL con agua. Inmediatamente antes</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| de usar, agregar la cantidad necesaria de ditiotreitól para obtener una concentración de 100 mM. | | |
| Preparación de la muestra 1. Diluir la preparación que se va a analizar con la solución amortiguadora para muestras hasta obtener una concentración de 100 µg/MI | | |
| Preparación de la muestra 2. A 0.20 mL de la preparación de la muestra 1 agregar 0.20 mL de solución amortiguadora para muestras. | | |
| Preparación de la muestra 3. Diluir 0.20 mL de la preparación de la muestra 2 a 1 mL con la solución amortiguadora para muestras. | | |
| Preparación de la muestra 4. Diluir 0.20 mL de la preparación de la muestra 3 a 1 mL con la solución amortiguadora para muestras. | | |
| Preparación de la muestra 5. A 0.20 mL de la preparación de la muestra 4 agregar 0.20 mL de solución amortiguadora para muestras. | | |
| Preparación de referencia 1. Solución de marcadores de peso molecular en el rango de 14.4 a 94 kDa para calibrar geles de poliacrilamida-SDS. | | |
| Preparación de referencia 2. Diluir la referencia de Filgrastim SRef con solución amortiguadora para muestras hasta obtener una concentración de 100 µg/mL. | | |
| Tratamiento de la muestra. Calentar a ebullición durante 5 min. | | |
| Volumen de aplicación. 20 µL. | | |
| Detección. Tinción con plata. | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|--|------------|----------------|
| <p>Aptitud del sistema. La preparación de referencia 1 cumple los criterios de validación. Se observa una banda en el electroferograma obtenido con la preparación de muestra 5. Se observa una graduación en la intensidad del teñido en los electroferogramas obtenidos con las preparaciones de muestra desde la 1 hasta la 5.</p> | | |
| <p>IMPUREZAS CON CARGAS DIFERENTES A LA DEL FILGRASTIM. <i>Enfoque isoeléctrico.</i> En cualquier impureza, ninguna banda debe ser más intensa que la banda principal en el electroferograma obtenido con la preparación de referencia 2 (10 %).</p> | | |
| <p>Preparación de la muestra. Diluir la preparación que se va a analizar con agua hasta obtener una concentración de 0.3 mg/mL.</p> | | |
| <p>Preparación de la referencia 1. Diluir la SRef de Filgrastim con agua hasta obtener una concentración de 0.3 mg/mL.</p> | | |
| <p>Preparación de la referencia 2. Diluir la SRef de Filgrastim con agua hasta obtener una concentración de 0.03 mg/mL.</p> | | |
| <p>Preparación de la referencia 3. Usar una solución de calibración de punto isoeléctrico en el intervalo de pI de 2.5 a 6.5 preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.</p> | | |
| <p>Enfoque. Gradiente de pH: 4.5 a 8.0. Catolito: solución de hidróxido de sodio 1M. Anolito: solución de ácido glutámico 0.04 M en una solución de ácido fosfórico al 0.0025 % (v/v). Volumen de aplicación: 20 µL.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|--|------------|----------------|
| <p>Detección: Sumergir el gel en solución de fijación para isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida (solución que contiene 35.0 g de ácido sulfosalicílico y 100.0 g de ácidotricloroacético por litro de agua). Incubar con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 min. Vaciar la solución y añadir 200 mL de solución decolorante (Cconsta de una mezcla de 1 volumen de ácido acético glacial , 4 volúmenes de metanol y 5 volúmenes de agua). Incubar con agitación durante 1 h. Drenar el gel, añadir solución de colorante Coomassie (Ssolución de 1.25 g/L de azul ácido 83 en una mezcla consistente en 1 volumen de ácido acético glacial, 4 volúmenes de metanol y 5 volúmenes de agua. Filtrar). Incubar durante 30 min. Decolorar el gel por difusión pasiva con solución decolorante hasta que las bandas se observen claramente frente a un fondo claro.</p> | | |
| <p>Aptitud del sistema. En el electroferograma obtenido con la preparación de referencia 3, los marcadores relevantes de punto isoelectrico, deberán estar distribuidos a lo largo de todo el gel. En el electroferograma obtenido con la preparación de referencia 1, el pI de la banda principal deberá estar entre 5.7 a 6.3.</p> | | |
| <p>PROTEÍNAS RELACIONADAS. MGA 0241, CLAR. Para cada impureza no más del 2% 1%. La suma total de proteínas relacionadas no es mayor del 3.5% 2.0 %. Emplear el procedimiento de normalización de áreas.</p> | | |
| <p>Solución 1. Solución amortiguadora pH 4.0 de</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* | | | | | | | | | | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|--|
| acetato de sodio 0.1 M, que contiene 0.1 mg/mL de polisorbato 80 y 50 mg/mL de sorbitol. | | | | | | | | | | | | | | |
| Preparación de la muestra. Diluir la preparación que se va a analizar con la solución 1 hasta obtener una concentración de 0.2 mg/mL. | | | | | | | | | | | | | | |
| Preparación de la referencia 1. Diluir la SRef de Filgrastim con solución 1 hasta obtener una concentración de 0.2 mg/mL. | | | | | | | | | | | | | | |
| Preparación de la referencia 2. A 500 µL de la preparación de referencia 1, agregar 2 µL de una solución de peróxido de hidrógeno de una concentración de 4.5 g/L, mezclar e incubar a 25 °C durante 30 min, después agregar 1.5 mg de L-metionina. | | | | | | | | | | | | | | |
| Fase móvil 1. Diluir 1.0 mL de ácido trifluoroacético con 900 mL de agua y agregar 100 mL de acetonitrilo. | | | | | | | | | | | | | | |
| Fase móvil 2. Diluir 1.0 mL de ácido trifluoroacético con 200 mL de agua y agregar 800 mL de acetonitrilo. | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (min.)</th> <th>Fase móvil 1 % (v/v)</th> <th>Fase móvil 2 % (v/v)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 - 35</td> <td>34 → 27</td> <td>66 → 73</td> </tr> <tr> <td>35 - 50</td> <td>27 → 10</td> <td>73 → 90</td> </tr> <tr> <td>50 - 60</td> <td>10 → 34</td> <td>90 → 66</td> </tr> </tbody> </table> | Tiempo (min.) | Fase móvil 1 % (v/v) | Fase móvil 2 % (v/v) | 0 - 35 | 34 → 27 | 66 → 73 | 35 - 50 | 27 → 10 | 73 → 90 | 50 - 60 | 10 → 34 | 90 → 66 | | |
| Tiempo (min.) | Fase móvil 1 % (v/v) | Fase móvil 2 % (v/v) | | | | | | | | | | | | |
| 0 - 35 | 34 → 27 | 66 → 73 | | | | | | | | | | | | |
| 35 - 50 | 27 → 10 | 73 → 90 | | | | | | | | | | | | |
| 50 - 60 | 10 → 34 | 90 → 66 | | | | | | | | | | | | |
| Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 215 nm, columna de 4.6 mm × 0.25 m, empacada con butilsilil sílica gel para cromatografía (5 µm) con un tamaño de poro de 30 nm, temperatura 60 °C, | | | | | | | | | | | | | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|--|------------|----------------|
| <p>velocidad de flujo de 0.6mL/min, volumen de inyección de 50 µL. Retención relativa con referencia al filgrastim; tiempo de retención: cerca de 28 min; forma oxidada 1: aproximadamente 0.85; forma oxidada 2: aproximadamente 0.95; formas desamidadas: aproximadamente 1.1.</p> | | |
| <p>Aptitud del sistema. Con la preparación de referencia 2. La resolución es no menor de 1.5 entre los picos de las formas oxidadas 1 y 2.</p> | | |
| <p>PROTEÍNAS TOTALES. MGA 0241, CLAR. Entre 90 y 110 % de lo declarado en el marbete.</p> | | |
| <p>POTENCIA. No menor del 80 % y no más del 125 % de la potencia establecida. Los límites de confianza (P = 0.95) están entre el 74 y 136 % de la potencia estimada. La actividad de la preparación a examinar se determina por comparación de las diluciones de la preparación de la muestra con las diluciones de la preparación de referencia de filgrastim calibrada en Unidades Internacionales (UI). Utilizar el método descrito a continuación o un método previamente desarrollado y validado por el fabricante.</p> | | |
| <p>Preparación de referencia. Solución de SRef de filgrastim a una concentración de 800 UI/mL. Preparar 10 diluciones seriadas de la SRef de filgrastim para la curva de calibración.</p> | | |
| <p>Preparación de la muestra. Solución de la muestra a una concentración de 800 UI/mL. Realizar 10 diluciones seriadas de la muestra para la curva de calibración.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| <p>Solución de sal de tetrazolio. Pesar 5.0 g de sal de tetrazolio y disolver en 1000 mL del medio de cultivo y esterilizar por filtración.</p> | | |
| <p>Preparación de células. Preparar una suspensión de células M-NFS-60 (o ATCC no. CRL-1838) que contenga 7×10^5 células por mililitro. Inmediatamente antes de su uso, añadir 2-mercaptoetanol para obtener una concentración final 0.1 mM en la suspensión.</p> | | |
| <p>Procedimiento. Colocar 50 μL del medio de dilución a cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos. Añadir 50 μL más del medio de dilución a los pozos correspondientes a los blancos. Agregar 50 μL de cada preparación (la muestra y referencia más las diluciones seriales de la curva de calibración), por triplicado. Después colocar en cada pozo 50 μL de la suspensión celular preparada, cuidando de mantener las células en suspensión homogénea durante la adición. Incubar la placa ade 36.0 °C a 38.0 °C durante 44 h a 48 h en una incubadora humidificada usando 6 ± 1 % de CO₂. Finalmente, adicionar 20 μL de una solución estéril de sal de tetrazolio a cada pozo y volver a incubar por 4 horas más. Transcurrido el tiempo, disolver el formazán y estimar la cantidad producida, usando un lector de placas a 490 nm.</p> | | |
| <p>Cálculos. Calcular la potencia de la preparación examinada, empleando un método estadístico apropiado, por ejemplo el ensayo de líneas paralelas.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| <p>ACTIVIDAD ESPECÍFICA. No menos de 0.9 × 10⁸ UI/mg. La actividad específica (AE), se calcula usando la siguiente fórmula:</p> | | |
| $A E = A / P$ | | |
| <p>Donde: A = Actividad biológica por unidad de volumen. P = Concentración proteica.</p> | | |
| <p>CONSERVACIÓN. Entre 2 y 8 °C. No debe congelarse.</p> | | |
| <p>MEDICAMENTO BIOTECNOLÓGICO (SOLUCIÓN INYECTABLE)</p> | | |
| <p>DESCRIPCIÓN. Solución clara incolora o ligeramente amarilla, libre de partículas extrañas.</p> | | |
| <p>ENSAYOS DE IDENTIDAD</p> | | |
| <p>Deberán aplicarse una de las siguientes alternativas, comparando con una preparación de referencia, como se indica para el biofármaco. Alternativa 1: A y B. Alternativa 2: A y C.</p> | | |
| <p>A. Potencia Prueba de potencia. Debe inducir la proliferación celular.</p> | | |
| <p>B. ENFOQUE ISOELÉCTRICO. El punto isoeléctrico se encuentra en 6 ± 0.2 unidades de pH conforme al método que se emplea para el biofármaco.</p> | | |
| <p>B. PROTEINAS RELACIONADAS. El pico principal del cromatograma obtenido con la solución de prueba es similar al tiempo de retención y forma del pico principal del cromatograma obtenido de la solución de referencia.</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|--|------------|----------------|
| <p>C. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS. MGA 0311. Tiene un peso molecular relativo de alrededor de 18.8 kDa en comparación con una preparación de referencia conforme al método indicado para el biofármaco.</p> | | |
| <p>IMPUREZAS CON PESOS MOLECULARES MAYORES QUE EL DE FILGRASTIM. MGA 0241, CLAR. El total de picos con tiempos de retención menores que el del pico principal debe ser no más del 1 %. El total de picos con tiempos de retención menores que al dímero debe ser no más del 0.5%. Determinar por cromatografía de exclusión molecular. Emplear el procedimiento de normalización.</p> | | |
| <p>Solución 1. Disolver 4.1 g de acetato de sodio en 400 mL de agua, ajustar el pH a 4.0 con ácido acético y diluir a 500 mL con agua.</p> | | |
| <p>Preparación de la muestra. Diluir la preparación que se va a analizar con la solución 1 hasta obtener una concentración de 0.4 mg/mL.</p> | | |
| <p>Preparación de la referencia. Diluir una cantidad de SRef de Filgrastim con solución 1 para obtener una concentración de 0.4 mg/mL.</p> | | |
| <p>Solución de resolución. Mezclar una porción de la preparación de referencia en vórtex durante 30 s aproximadamente.</p> | | |
| <p>Fase móvil. Disolver 7.9 g de bicarbonato de amonio en 1 000 mL de agua y ajustar el pH a 7.0 con SR de ácido fosfórico y diluir a 2 000 mL con agua.</p> | | |
| <p>Condiciones del equipo. Cromatógrafo de</p> | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|---|------------|----------------|
| líquidos equipado con detector UV a 215 nm, columna de 7.8 mm × 30 cm, empacada con sílica gel hidrofílica para cromatografía (5 µm) de un grado apropiado para fraccionamiento de proteínas globulares en el rango de peso molecular relativo de 10 000 a 500 000, temperatura 30 °C, velocidad de flujo de 0.5 mL/min, volumen de inyección de 20 µL. | | |
| Adecuabilidad del sistema: El tiempo de retención del monómero de filgrastim deberá estar entre 17 y 20 min y la resolución mínima entre picos debidos al dímero del filgrastim y el monómero del filgrastim deberá ser de 3.0. | | |
| Enfoque isoeléctrico. MGA 0311. El punto isoeléctrico se encuentra en 6 ± 0.2 unidades de pH conforme al método que se emplea para el biofármaco. | | |
| PROTEÍNAS RELACIONADAS. MGA 0241, CLAR. Para cada impureza no más del 3%. La suma total de proteínas relacionadas no es mayor del 6.5%. Emplear el procedimiento de normalización de áreas. | | |
| Preparación de la muestra. Diluir la preparación que se va a analizar con agua hasta obtener una concentración de 0.5 mg/mL. | | |
| Preparación de la referencia 1. Diluir la SRef de Filgrastim con agua hasta obtener una concentración de 0.5 mg/mL. | | |
| Preparación de la referencia 2. A 250 µL de la preparación de referencia 1, agregar 2.5 µL de una solución de peróxido de hidrógeno de una | | |

"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* | | | | | | | | | | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|--------|---------|---------|---------|----|----|---------|---------|---------|--|--|
| concentración de 4.5 g/L, mezclar e incubar a 25± 2 °C durante 30 min, después agregar 1.9 mg de L-metionina. | | | | | | | | | | | | | | |
| Preparación de referencia 3. A 250 µL de la preparación de referencia 1, agregar 0.25 mg de ditiotreitolo, mezclar e incubar a 35 ± 2 durante 60 min. | | | | | | | | | | | | | | |
| Fase móvil 1. Diluir 1.0 mL de ácido trifluoroacético en 1000 mL de agua. | | | | | | | | | | | | | | |
| Fase móvil 2. Diluir 1.0 mL de ácido trifluoroacético en 100 mL de agua y agregar 900 mL de acetonitrilo. | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (min.)</th> <th>Fase móvil 1 % (v/v)</th> <th>Fase móvil 2 % (v/v)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 - 30</td> <td>60 → 20</td> <td>40 → 80</td> </tr> <tr> <td>30 - 35</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>35 - 45</td> <td>20 → 60</td> <td>80 → 40</td> </tr> </tbody> </table> | Tiempo (min.) | Fase móvil 1 % (v/v) | Fase móvil 2 % (v/v) | 0 - 30 | 60 → 20 | 40 → 80 | 30 - 35 | 20 | 80 | 35 - 45 | 20 → 60 | 80 → 40 | | |
| Tiempo (min.) | Fase móvil 1 % (v/v) | Fase móvil 2 % (v/v) | | | | | | | | | | | | |
| 0 - 30 | 60 → 20 | 40 → 80 | | | | | | | | | | | | |
| 30 - 35 | 20 | 80 | | | | | | | | | | | | |
| 35 - 45 | 20 → 60 | 80 → 40 | | | | | | | | | | | | |
| Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 215 nm, columna de 4.6 mm × 0.15 m, empacada con butilsilil sílica gel para cromatografía (5 µm) con un tamaño de poro de 30 nm, temperatura 60 °C, velocidad de flujo de 0.8mL/min, volumen de inyección de 50 µL. | | | | | | | | | | | | | | |
| Retención relativa con referencia al filgrastim; tiempo de retención: cerca de 23 min; forma oxidada 1: aproximadamente 0.84; forma oxidada 2: aproximadamente 0.98; formas reducidas: aproximadamente 1.04. | | | | | | | | | | | | | | |
| Aptitud del sistema. Con la preparación de referencia 2. La resolución es no menor de 1.5 | | | | | | | | | | | | | | |



"2022, Año de Ricardo Flores Magón, Precursor de la Revolución Mexicana"

| Dice | Debe decir | Justificación* |
|--|------------|----------------|
| entre los picos del filgrastim y el filgrastim reducido. El factor de simetría deberá ser como máximo 1.8 para el pico debido al filgrastim. | | |
| ESTERILIDAD. MGA 0381. Cumple los requisitos. | | |
| ENDOTOXINAS BACTERIANAS. MGA 0316. No más de 2 UEI de endotoxina por dosis. | | |
| POTENCIA. Como se indica para el Biofármaco. | | |
| PROTEÍNAS TOTALES. MGA 0241, CLAR. Entre 90 y 110 % de lo declarado en el marbete. | | |
| INOCUIDAD. MPB 0680. Cumple los requisitos. | | |
| pH. MGA 0701. Entre 3.0 y 4.5 para el producto sin diluir. | | |
| VARIACIÓN DE VOLUMEN. MGA 0981. Cumple los requisitos. | | |
| CONSERVACIÓN. Entre 2 y 8 °C. No debe congelarse. | | |

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

CONSULTA