



“2025, Año de la Mujer Indígena”

**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 agosto y hasta el 30 de septiembre de 2025, 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](mailto:consultas@farmacopea.org.mx).

**DATOS DEL PROMOVENTE**

**Nombre:** \_\_\_\_\_  
**Institución o empresa:** \_\_\_\_\_  
**Teléfono:** \_\_\_\_\_

**Cargo:** \_\_\_\_\_  
**Dirección:** \_\_\_\_\_  
**Correo electrónico:** \_\_\_\_\_

**MONOGRAFÍA NUEVA**

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>BEVACIZUMAB</b>		
Esta monografía aplica tanto al biofármaco como al medicamento biotecnológico		
Bevacizumab [216974-75-3], es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano e inhibe su actividad biológica.		
Bevacizumab contiene regiones constantes humanas y regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo murino que se unen al VEGF. Bevacizumab es producido mediante tecnología de ADN recombinante en una línea celular estable derivada de células de ovario de hámster chino (CHO).		
Cadena ligera de Bevacizumab:		
DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCSASQDIS		
NYLNWYQQKP GKAPKVLIF TSSLHSGVPS		
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
YSTVPWTFGQ SDEQLKSGTA DNALQSGNSQ LSKADYEKHK RGEC	GTKVEIKRTV SVCLLNNFY ESVTEQDSKD VYACEVTHQG AAPSVFIFPP PREAKVQWKV STYLSSTLT LSSPVTKSFN	
<b>Cadena pesada de Bevacizumab:</b>		
EVQLVESGGG NYGMNWRQA AADFKRRFTF TAVYYCAKYP VSSASTKGPS LVKDYFPEPV QSSGLYSLSS KPSNTKVDKK LGGPSVFLFP DVSHEDPEVK REEMTKNQVS GQPENNYKTT SRWQQGNVFS PGK	LVQPGGSLRL PGKLEWVGW SLDTSKSTAY HYYGSSHWYF VFPLAPSSKS TVSWNSGALT VVTVPSSSLG VEPKSCDKTH PKPKDTLMIS FNWYVDGVEV LTCLVKGFYP PPVLDSGSF CSVMHEALHN SCAASGYTFT INTYTGEPTY LQMNSLRAED DVGQGTTLVT TSGGTAALGC SGVHTFPAVL TQTYICNVNH TCPPCPAPEL RTPEVTCVVV HNAKTKPREE SDIAVEWESN FLYSKLTVDK HYTQKLSLS	
C <sub>6638</sub> H <sub>10160</sub> N <sub>1720</sub> O <sub>2108</sub> S <sub>44</sub>		
Peso molecular, aprox. 149 kDa (glicosilado)		
<b>SUSTANCIA DE REFERENCIA.</b> Cuando exista un estándar de referencia oficial o internacional disponible, éste deberá ser utilizado como base para la generación del estándar interno primario, siempre que se valide conforme al proceso y/o en comparación con un estándar externo. En caso de		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>que la sustancia de referencia no se encuentre disponible, podrá emplearse una sustancia de referencia de trabajo que esté debidamente caracterizada y que cumpla con los criterios establecidos en la presente monografía.</p>		
<p><b>DESCRIPCIÓN.</b> Bevacizumab se presenta como una solución estéril, transparente e incolora o ligeramente opalescente, destinada a administración intravenosa.</p>		
<p><b>ENSAYOS DE IDENTIDAD.</b></p>		
<p><b>A. Mapeo peptídico. MGA 0536.</b></p>		
<p>Analizar la solución muestra, mediante una técnica adecuada capaz de resolver los péptidos generados a partir de una digestión con tripsina.</p>		
<p>La digestión se realiza bajo condiciones reductoras y proporciona no menos del 80 % de la proteína digerida. El método analítico utilizado proporciona un mínimo de 90 % de cobertura de la secuencia de la proteína.</p>		
<p>Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.</p>		
<p><b>Solución del estándar de referencia:</b> Diluir y digerir una cantidad determinada del SRef de Bevacizumab en el diluyente apropiado.</p>		
<p><b>Solución de la muestra:</b> Diluir y digerir una cantidad determinada de la muestra de Bevacizumab en el diluyente apropiado de tal forma que se obtenga la misma concentración que el estándar de referencia.</p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Nota:</b> Preparar la solución del estándar de referencia y la solución de la muestra simultáneamente, utilizando la misma cantidad de reactivos y concentraciones.		
<b>Solución A:</b> Ácido trifluoroacético al 0.1 % en agua.		
<b>Solución B:</b> Ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo.		
<b>Solución C:</b> Ditiotreitolo 0.5 M en agua.		
<b>Solución D:</b> Yodoacetamida 0.5 M en agua.		
<b>Solución E:</b> Solución amortiguadora Tris 0.25 M en agua. Ajustar con ácido clorhídrico diluido a un pH de 7.5.		
<b>Solución F (Solución amortiguadora desnaturalizante):</b> Clorhidrato de guanidina 6 M y EDTA 1 mM en la solución E.		
<b>Solución G:</b> Solución amortiguadora Tris 0.1 M en agua. Ajustar con ácido clorhídrico diluido a un pH de 7.8.		
<b>Solución H (Solución amortiguadora de digestión):</b> 2 M de urea en la solución G.		
<b>Solución I:</b> 0.05 M de ácido acético en agua.		
<b>Solución J:</b> 1 mg/mL de tripsina en la solución I.		
<b>Solución K:</b> 25 mg/mL de SRef de Bevacizumab en agua.		
<b>Solución madre del estándar de referencia 1:</b> Mezclar 16 µL de solución K, 284 µL de Solución F y 4 µL de solución C e incubar a 37°C durante 30 min. Añadir 9.6 µL de solución D, e incubar a temperatura ambiente durante 30 min más en un		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
lugar oscuro. Añadir 4 µL de solución C y mezclar bien.		
<b>Solución madre del estándar de referencia 2:</b> Equilibrar la columna NAP-5 con 10 mL de Solución H. Cargar la solución madre del estándar de referencia 1 en la columna y eluir con la solución H en volúmenes de 150 µL cada uno. Recolectar siete fracciones independientes. Medir la absorbancia de cada fracción a 280 nm. La fracción con una absorbancia superior a 1.2 (correspondiente a 0.7 mg/mL) se utiliza para la digestión.		
<b>Nota:</b> Si la absorbancia de la fracción es superior a 1.2, diluirla con la solución H para obtener una absorbancia de 1.2		
<b>Solución del estándar de referencia:</b> Mezclar bien 50 µL de la solución madre estándar 2 y 1.4 µL de la solución J e incubar a 37 °C durante 18 h. Añadir 1 µL de ácido trifluoroacético y conservar la solución del estándar de referencia a -20°C.		
<b>Sistema Cromatográfico: Condiciones del equipo.</b> Cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC) con un detector PDA (barrido 200-400 nm). Columna 2.1 mm × 100 mm; 130 Å, relleno L1 (tipo C18) de 1.7 µm. Temperatura de la columna: 60 °C Temperatura del auto-muestreador: 8 °C. Velocidad de flujo: 0.3 ml/min. Volumen de inyección: 10 µL.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*																								
Medir absorbancia a 215 nm con el detector adecuado.																										
Para realizar el análisis emplear el gradiente de elución que se muestra en la tabla 1.																										
<p><b>Tabla 1. Gradiente de elución</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (min)</th> <th>Solución A (%)</th> <th>Solución B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>120</td> <td>55</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td>125</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>130</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>131</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>135</td> <td>98</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	0	98	2	5	98	2	120	55	45	125	0	100	130	0	100	131	98	2	135	98	2		
Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)																								
0	98	2																								
5	98	2																								
120	55	45																								
125	0	100																								
130	0	100																								
131	98	2																								
135	98	2																								
<b>Aptitud del sistema:</b>																										
El cromatograma obtenido con la preparación de referencia deberá corresponder al cromatograma del certificado del SRef o al cromatograma tipo del estándar interno de Bevacizumab.																										
<b>Resultado:</b> Los perfiles peptídicos obtenidos de la solución de la muestra se comparan visualmente con los de la solución de referencia.																										
<b>B. Enfoque isoeléctrico capilar (MGA 0312).</b>																										
Analice el producto de prueba mediante isoelectroenfoque por electroforesis capilar (cIEF) con un anfolito de amplio rango (equivalente a un rango de pI de 3.0 a 10.0). Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.																										



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Solución del estándar de referencia:</b> Diluir una cantidad determinada del SRef de Bevacizumab en el diluyente apropiado.		
<b>Solución de la muestra:</b> Diluir una cantidad determinada de la muestra de Bevacizumab en el diluyente apropiado de tal forma que se obtenga la misma concentración que el SRef.		
<b>Solución A (anolito):</b> 0.2 M de ácido fosfórico en agua.		
<b>Solución B (catolito):</b> 0.3 M de hidróxido de sodio en agua.		
<b>Solución C (movilizador químico):</b> 0.35 M de ácido acético en agua.		
<b>Solución D (estabilizador anódico):</b> 0.2 M de ácido iminodiacético en agua.		
<b>Solución E (estabilizador catódico):</b> 0.5 M de arginina en agua.		
<b>Solución F:</b> 4.3 M de urea en agua.		
<b>Solución G:</b> 3.0 M de urea en gel cIEF.		
<b>Solución H:</b> 5 mg/mL de SRef de Bevacizumab en agua.		
<b>Solución de aptitud del sistema:</b> Mezclar 200 µL de la solución G, 12 µL de anolito 3-10, 20 µL de la Solución E, 2 µL de la solución D y 2 µL de cada marcador de pI (10.0; 9.5; 7.0; 5.5 y 4.1). Agitar la solución durante 15 s y mezclar bien. Transferir 200 µL a un microvial para su análisis.		
<b>Solución del estándar de referencia:</b> Mezclar bien 10 µL de la solución H, 200 µL de la solución G, 12 µL de anolitos, 20 µL de la solución E, 2 µL de la solución D y 2 µL de cada marcador de pI		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
(10.0, 5.5 y 4.1). Agitar la solución durante 15 s y mezclar bien. Transferir 200 µL a un microvial para su análisis.		
<b>Solución de la muestra:</b> Preparar el producto de prueba de forma similar a la solución estándar.		
<b>Nota:</b> Preparar la solución de referencia y la solución de la muestra simultáneamente, utilizando la misma cantidad de reactivos y concentraciones.		
<b>Condiciones del equipo:</b> Capilar con recubrimiento neutro de		
30.2 cm × 50 µm y una longitud efectiva de 20 cm, Temperatura del capilar 20 °C y de la muestra 10 °C, detector UV 280 nm, modo de análisis cIEF, con polaridad positiva, tiempo de inyección 25 psi durante 99.0 s, voltaje de enfoque 25.0 kV durante 15.0 min y movilización química: 30.0 kV durante 30.0 min.		
<b>Aptitud del sistema:</b>		
<b>Muestras:</b> Solución de aptitud del sistema y solución del estándar de referencia.		
<b>R<sup>2</sup>:</b> No menos de 0.990, Solución de aptitud del sistema.		
<b>Nota:</b> Determinar el valor de R <sup>2</sup> a partir de la curva de calibración entre el pl y el tiempo de migración.		
<b>pl:</b> Debe ser de 7.4 a 8.0, Solución estándar.		
<b>Muestras:</b> Solución del estándar de referencia y solución de la muestra		
<b>Especificidad:</b> el pl de la solución del estándar de referencia debe estar entre 7.4 y 8.0 unidades.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Resultado:</b> Graficar la curva de tiempo de migración y pl de los marcadores añadidos a la solución de muestra.		
Calcular el pl del pico principal de Bevacizumab en la solución de muestra. Compare el pl de la solución de muestra y la solución del estándar de referencia. El pl del pico principal obtenido de la solución de muestra difiere en no más de $\pm 0.2$ unidades de pl del pl del pico correspondiente obtenido de la solución del estándar de referencia.		
<b>C. Bioensayo.</b>		
La respuesta a la dosis de la solución de muestra debe ser significativa, con asíntotas inferior y superior definidas y similar a la de la solución de referencia.		
<b>Solución de referencia:</b> Estándar de referencia (SRef) de Bevacizumab en un diluyente adecuado.		
<b>Solución de la muestra:</b> Bevacizumab diluido en un diluyente adecuado, similar al de la solución del estándar de referencia.		
<b>Requisitos de rendimiento del sistema y análisis:</b> Proceder según lo indicado en el ensayo de potencia de unión.		
<b>POTENCIA DE UNIÓN</b>		
La actividad de unión de Bevacizumab al factor de crecimiento endotelial vascular humano recombinante (rhVEGF165) se determina mediante un ensayo de unión en fase sólida utilizando placas recubiertas con rhVEGF165. La unión de Bevacizumab al rhVEGF165 se detecta mediante un anticuerpo secundario específico en un ensayo		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>inmunoabsorbente ligado a enzima (MGA 0507. Ensayo de Elisa – Tipo Indirecta). Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.</p>		
<p><b>Solución A (Solución amortiguadora de recubrimiento):</b> Mezclar 1.59 g/L de carbonato de sodio monohidratado y 2.93 g/L de bicarbonato de sodio en 600 mL de agua. Diluir con agua hasta 1000 mL. Mezclar bien y comprobar el pH. El pH de la solución debe ser de 9.6.</p>		
<p><b>Solución B (PBS 10X):</b> Mezclar 80.0 g de cloruro de sodio, 7.6 g de fosfato de sodio dibásico, 2.0 g de fosfato de potasio monobásico y 2.0 g de cloruro de potasio. Disolver en 800 mL de agua. Diluir con agua hasta 1000 mL. Conservar a temperatura ambiente.</p>		
<p><b>Solución C (1X PBS):</b> Mezclar 100 mL de la solución B en 800 mL de agua y ajustar con HCl 1 N o NaOH 1 N a un pH de 7.2-7.4. Diluir con agua hasta 1000 mL.</p>		
<p><b>Solución D (Solución amortiguadora de lavado/Solución amortiguadora diluyente):</b> Añadir 1 g de BSA y 500 µL de Tween 80 a 1000 mL de la solución C. Preparar en fresco el día del ensayo.</p>		
<p><b>Solución E (Solución amortiguadora de bloqueo):</b> Añadir 3 g de BSA y 10 µL de Tween 80 a 100 mL de la solución C. Preparar en fresco el día del ensayo.</p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Solución F (solución de parada):</b> Solución de ácido sulfúrico 1 M en agua.		
<b>Solución G (antígeno de recubrimiento):</b> 50 ng/mL de rhVEGF165 humano recombinante en la Solución A.		
<b>Nota:</b> Optimizar la concentración de antígeno de recubrimiento para cada nuevo lote de rhVEGF165 en comparación con el lote existente.		
<b>Solución H (anticuerpo secundario):</b> Conjugado de peroxidasa anti-IgG humana (Fc específica) en la solución D (1:60.000).		
<b>Solución estándar 1:</b> 1000 ng/mL de Bevacizumab SRef en la solución D.		
<b>Solución estándar 2:</b> 100 ng/mL de Bevacizumab de la solución estándar 1 en la solución D.		
<b>Solución estándar 3:</b> 50 ng/mL de Bevacizumab de la solución estándar 2 en la solución D.		
<b>Solución estándar 4:</b> 25 ng/mL de Bevacizumab de la solución estándar 3 en la solución D.		
<b>Solución estándar 5:</b> 12.5 ng/mL de Bevacizumab de la solución estándar 4 en la solución D.		
<b>Solución estándar 6:</b> 6.25 ng/mL de Bevacizumab de la solución estándar 5 en la solución D.		
<b>Estándar Solución 7:</b> 3.125 ng/mL de Bevacizumab de la solución estándar 6 en la solución D.		
<b>Solución estándar 8:</b> 1.56 ng/mL de Bevacizumab de la solución estándar 7 en la solución D.		
<b>Solución de muestra 1:</b> 1000 ng/mL de Bevacizumab en la solución D.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Solución de muestra 2:</b> 100 ng/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 1 en la solución D.		
<b>Solución de muestra 3:</b> 50 ng/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 2 en la solución D.		
<b>Solución de muestra 4:</b> 25 ng/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 3 en la solución D.		
<b>Solución de muestra 5:</b> 12.5 ng/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 4 en la solución D.		
<b>Solución de muestra 6:</b> 6.25 ng/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 5 en la solución D.		
<b>Muestra Solución 7:</b> 3.125 ng/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 6 en la solución D.		
<b>Solución de muestra 8:</b> 1.56 ng/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 7 en la solución D.		
<b>Procedimiento:</b>		
Recubrir cada pozo de una placa ELISA de 96 pozos con 100 µL de solución G.		
Cubrir la placa e incubar a 2-8 °C durante 16-20 h. Lavar la placa con 300 µL/pozo de solución D, secar las placas con papel absorbente y añadir 100 µL de solución E a cada pozo.		
Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante unos 60 min en un agitador de placas a 200 rpm.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
Retirar la placa del agitador y lavar cinco veces añadiendo 300 µL/pozo de solución D. Secar la placa con papel absorbente para eliminar el material no unido.		
Transferir 100 µL/pozo de cada una de las soluciones estándar 1-8 y de las soluciones de muestra 1-8 a los pozos designados para los estándares y las muestras a una placa de microtitulación recubierta. Transferir 100 µL/pozo de solución D a los pozos designados como blanco.		
Utilizar un diseño adecuado para distribuir las soluciones estándar y las soluciones de muestra en una placa para lograr la aleatorización.		
Cubrir la placa con un protector e incubar a 23° ± 2°C durante aproximadamente 60 min en un agitador de placas a 200 rpm. Retirar la placa del agitador y lavar cinco veces añadiendo 300 µL/pozo de solución D.		
Secar la placa con papel absorbente para eliminar el material no unido. Añadir 100 µL/pozo de solución H, cubrir la placa con un protector e incubar a temperatura ambiente durante 60 min en un agitador de placas a 200 rpm. Lavar la placa cinco veces añadiendo 300 µL/pozo de solución D y secar la placa con papel absorbente para eliminar el material no unido.		
Añadir 100 µL/pozo de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a todos los pozos e incubar la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos en un lugar oscuro. Añadir 100 µL de la		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
solución F a todos los pozos y medir la absorbancia a 450 nm con un lector de placas de ELISA dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución F.		
Generar curvas dosis-respuesta para las soluciones estándar y de muestra.		
<b>Aptitud del sistema:</b>		
<b>Muestras:</b> Soluciones estándar 1-8 y soluciones de muestra 1-8.		
<b>Especificidad:</b> La solución estándar proporciona una relación dosis-respuesta y cumple los criterios de idoneidad del sistema.		
<b>Desviación estándar relativa:</b> No más del 10.0 % entre los valores de absorbancia de las réplicas.		
<b>Relación:</b> La relación entre los valores de absorbancia de las concentraciones más alta y más baja de las soluciones estándar debe ser no menos de 5.0.		
<b>Valor técnico atípico:</b> No más de 4 por curva, basado en un criterio de desviación estándar relativa (DER) del 10 % para problemas técnicos durante la realización del ensayo, como problemas con el pipeteo o burbujas de aire.		
<b>Nota:</b> El blanco se incluye solo para fines de monitorización y no tiene criterios de aceptación.		
<b>Resultados:</b> , Realizar un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4-PL) de los datos brutos (valores de absorbancia) para realizar pruebas de ajuste de curva y paralelismo utilizando un software de análisis de datos validado.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
Calcular la potencia relativa y los límites de confianza del 95 % para cada muestra.		
Límites de confianza del 95 % para la determinación independiente: 74–136 %.		
Potencia media medida: Debe estar entre 80–125 % de la EC <sub>50</sub> del SRef, obtenida como media geométrica de al menos tres determinaciones independientes de la potencia medida.		
<b>POTENCIA DE NEUTRALIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)</b>		
Determinación de la actividad biológica de la solución de Bevacizumab basada en la capacidad del anticuerpo para neutralizar la bioactividad del rhVEGF165 en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) mediante tinción con resazurina sódica.		
Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.		
<b>Medio A:</b> Medio basal para células endoteliales y mezcla de suplementos.		
<b>Medio B:</b> Medio basal de células endoteliales y 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor.		
<b>Medio C:</b> Medio basal de células endoteliales, 90 µg/mL de heparina sódica [4000–6000 Da] y 2 % de SFB inactivado por calor.		
<b>Línea celular y mantenimiento:</b> Células HUVEC cultivadas en el Medio A (ver Tabla 2).		
<b>Tabla 2.</b> Mantenimiento celular.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice			Debe decir	Justificación*
<b>Número de días en cultivo después de la siembra</b>	<b>Densidad de la siembra</b>	<b>Densidad de cosecha</b>		
2	0.08 x10 <sup>6</sup> células/mL	0.2 x10 <sup>6</sup> células/mL		
3	0.04 x <sup>06</sup> células/mL	0.2 x <sup>06</sup> células/mL		
4	0.025 x <sup>06</sup> células/mL	0.2 x <sup>06</sup> células/mL		
<b>Suspensión celular:</b> 0.9–1.0 × 10 <sup>5</sup> células HUVEC/mL en medio C. <b>Nota:</b> Utilizar células entre 1 y 6 pases y mantener una suspensión celular uniforme durante la adición.				
<b>Solución de resazurina:</b> Utilizar solución de azul de alamar disponible comercialmente. No requiere preparación.				
<b>Solución estándar 1:</b> 5 µg/mL de SRef de Bevacizumab en medio C.				
<b>Solución estándar 2:</b> 1.25 µg/mL de Bevacizumab de la solución estándar 1 en medio C.				
<b>Solución estándar 3:</b> 0.714 µg/mL de Bevacizumab de la solución estándar 2 en medio C.				
<b>Solución estándar 4:</b> 0.408 µg/mL de Bevacizumab de la solución estándar 3 en medio C.				
<b>Solución estándar 5:</b> 0.233 µg/mL de Bevacizumab de la solución estándar 4 en medio C.				
<b>Solución estándar 6:</b> 0.133 µg/mL de Bevacizumab de la solución estándar 5 en medio C.				



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Solución estándar 7:</b> 0.076 µg/mL de Bevacizumab de la solución estándar 6 en medio C.		
<b>Solución estándar 8:</b> 0.019 µg/mL de Bevacizumab de la solución estándar 7 en medio C.		
<b>Solución de muestra 1:</b> 5 µg/mL de Bevacizumab en medio C		
<b>Solución de muestra 2:</b> 1.25 µg/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 1 en medio C.		
<b>Solución de muestra 3:</b> 0.714 µg/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 2 en medio C.		
<b>Solución de muestra 4:</b> 0.408 µg/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 3 en medio C.		
<b>Solución de muestra 5:</b> 0.233 µg/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 4 en medio C.		
<b>Solución de muestra 6:</b> 0.133 µg/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 5 en medio C.		
<b>Solución de muestra 7:</b> 0.076 µg/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 6 en medio C		
<b>Solución de muestra 8:</b> 0.019 µg/mL de Bevacizumab de la solución de muestra 7 en medio C		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Nota:</b> Las concentraciones finales son un cuarto de las concentraciones anteriores al añadirlas a los pozos de ensayo.		
<b>Procedimiento:</b>		
Preparar la suspensión de HUVEC tripsinizando la monocapa de células HUVEC en confluencia de un matraz T-75. Añadir 1.5-2 mL de tripsina-EDTA fría a un matraz de cultivo tisular T-75 cm <sup>2</sup> y extender uniformemente sobre la monocapa durante aproximadamente 45 s. Incubar el matraz durante 2-3 min a temperatura ambiente.		
Neutralizar la tripsina con medio B, lavar el sedimento celular una vez con medio C y resuspender en medio C.		
En una microplaca de 96 pozos adecuada, transferir 100 µL de suspensión celular a cada pozo designado como estándar, muestra y control celular.		
Transferir 100 µL de medio C a los pozos designados como control de medio. Mezclar e incubar la placa a 37° ± 1°C durante aproximadamente 5 h en una incubadora humidificada con 5 % de CO <sub>2</sub> .		
Transferir 100 µL de las soluciones estándar 1-8 y 100 µL de las soluciones de muestra 1-8 a los pozos designados para los estándares y las muestras a otra placa de microtitulación de 96 pozos. Añadir 100 µL de 100 ng/mL de VEGF a cada pozo.		
Mezclar e incubar la placa a 37° ± 1°C durante al menos 3 h en una incubadora humidificada con		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>CO<sub>2</sub> al 5%. Transferir 100 µL de VEGF neutralizado a la placa donde se sembraron las células. Transferir 100 µL de medio C a los pozos designados como control de medio y control celular.</p>		
<p>[Nota: La concentración de VEGF debe estimarse titulando cada nuevo lote con el lote anterior y cada nuevo lote de HUVEC].</p>		
<p>Utilizar un diseño adecuado para distribuir las soluciones estándar y las soluciones de muestra en una placa para lograr la aleatorización.</p>		
<p>Mezclar e incubar la placa a 37° ± 1°C durante 70 ± 2 h en una incubadora humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>.</p>		
<p>Retirar la placa de la incubadora y añadir 30 µL de solución de azul de Alamar precalentada a cada pozo. Agitar suavemente la placa e incubar durante 17 ± 3 h. Retirar las placas de la incubadora y enfriar a temperatura ambiente colocándolas en un agitador de placas durante aproximadamente 30 min.</p>		
<p>Medir la fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia, RFU) con un lector de placas de 96 pozos adecuado, con una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Generar curvas de dosis-respuesta para las soluciones estándar y de muestra utilizando las concentraciones finales de Bevacizumab.</p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Nota:</b> Las concentraciones corresponden a las obtenidas antes de la adición de la solución de azul de Alamar.		
<b>Aptitud del sistema.</b>		
<b>Muestras:</b> Soluciones estándar 1-8 y soluciones de muestra 1-8.		
<b>Especificidad:</b> La solución estándar proporciona una dosis-respuesta y cumple los criterios de idoneidad del sistema.		
<b>Desviación estándar relativa:</b> No más del 15.0 % entre la RFU replicada.		
<b>Relación:</b> La relación entre la RFU de la concentración más baja de solución estándar y el control celular debe ser de no menos de 1.7.		
<b>Valor técnico atípico:</b> No más de 4 por curva, basado en un criterio de RSD del 15 % para problemas técnicos durante la realización del ensayo, como problemas con el pipeteo o burbujas de aire.		
<b>Nota:</b> El control del medio se incluye solo con fines de monitorización y no tiene criterios de aceptación.		
<b>Pendiente:</b> No menor a 1.0.		
<b>Resultado:</b> La potencia de la solución de muestra se calcula en relación con la solución estándar mediante un método de líneas paralelas o un método logístico paralelo (curva completa) adecuado.		
Utilizando un software de análisis de datos validado, realizar un ajuste de curva logístico de 4		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
parámetros (4-PL) de los datos brutos (RFU) para comprobar el ajuste de curvas y el paralelismo.		
Calcular la potencia relativa y los límites de confianza del 95 % para cada muestra, la cual debe abarcar del 80- 125 % de la EC <sub>50</sub> del SRef.		
Calcular los límites de confianza del 95 % para cada determinación independiente de la potencia medida.		
<b>PERFIL DE GLICANOS (MGA. 0241 CLAR).</b> <i>Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.</i>		
<b>Solución A:</b> Solución de formiato de amonio 0.1 M en agua. Ajustar con ácido fórmico a un pH de 4.5.		
<b>Solución B:</b> Acetonitrilo.		
<b>Solución C:</b> Hidróxido de sodio 1 M en agua.		
<b>Solución D:</b> Acetonitrilo al 5 % en agua.		
<b>Solución E:</b> Acetonitrilo al 50 % en agua.		
<b>Solución F:</b> Ácido trifluoroacético al 0.1 % en la solución D.		
<b>Solución G:</b> Ácido trifluoroacético al 0.1 % en la solución E.		
<b>Solución H:</b> Solución amortiguadora de reacción G7 5X (fosfato de sodio 0.5 M a pH 7.5).		
<b>Solución I (reactivo de marcaje de glicanos 2 AB):</b> Transferir 150 µL de ácido acético a un vial de DMSO y mezclar bien. Transferir 100 µL de la mezcla de DMSO y ácido acético a un vial de colorante tag 2-AB y mezclar suavemente hasta su disolución. Añadir el colorante disuelto a un vial de		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
cianoborohidruro de sodio y mezclar suavemente hasta su completa disolución.		
<b>Nota:</b> Para una solubilización adecuada, calentar el reactivo de marcaje final a 65 °C durante 30 s. Usar en 60 min.		
<b>Solución J:</b> Ácido acético al 30% en agua.		
<b>Solución K:</b> 96 % de acetonitrilo en agua.		
<b>Solución L:</b> 80 % de acetonitrilo en agua.		
<b>Solución M:</b> 25 mg/mL de SRef de Bevacizumab en agua.		
<b>Solución estándar:</b> Mezclar 4 µL de la Solución M, 10 µL de la Solución H, 1.5 µL de PNGasa F (5 U/mL) y diluir con agua hasta 50 µL.		
<b>Nota:</b> La definición de la unidad para PNGasa F puede variar entre las fuentes comerciales. Puede ser necesario determinar experimentalmente la cantidad adecuada de PNGasa F necesaria para la liberación completa de los oligosacáridos N-ligados en la muestra.		
Mezclar suavemente la solución e incubar a 37° durante 18-20 h. Procesar la solución con los cartuchos y el procedimiento de limpieza, como se describe a continuación:		
<b>Lavado:</b> Lavar el cartucho con 500 µL de metanol, 500 µL de Solución C, 1 mL de agua, 1 mL de solución J y 1 mL de agua, secuencialmente.		
<b>Preparación de la resina:</b> Preparar la superficie activa de la resina del cartucho con 500 µL de solución G y 1 mL de solución F, secuencialmente.		
<b>Carga de la muestra:</b> Cargar la solución estándar en el cartucho y dejar que pase a través de la		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
resina. Enjuagar los tubos de muestra con 200 µL de agua y volver a cargarlos en el cartucho para asegurar la unión completa. Lavar de nuevo con 700 µL de agua.		
Eluir los contaminantes no glicanos con 700 µL de solución F. Recoger la muestra de glicanos en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL añadiendo 200 µL de solución G. Repetir este paso dos veces. Secar al vacío la solución de glicanos limpia. Reconstituir la solución con 5 µL de solución I y mezclar bien. Incubar la solución a 65° ± 2°C durante 2 h 30 min.		
Acondicionar el cartucho con 1 mL de agua, 2 mL de la solución J y 1 mL de la solución B, secuencialmente. Cargar la muestra de glicano marcada en el cartucho.		
<b>Nota:</b> Asegurarse que el disco esté húmedo con acetonitrilo.		
Enjuagar el tubo de muestra con 100 µL de la solución B. Dejar que la muestra se adsorba en la membrana durante 15 min. Lavar cada disco con 1 mL de la solución B y luego 1 mL de la solución K. Repetir el paso con la solución K cinco veces. Eluir los glicanos con tres alícuotas de 0.5 mL de agua en un solo tubo de microcentrifuga. Liofilizar los glicanos eluidos. Reconstituir las alícuotas con la solución L hasta un volumen total de 150 µL.		
<b>Solución de muestra:</b> Preparar el Bevacizumab de forma similar a la solución estándar.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*																												
<b>Nota:</b> Preparar la solución estándar y la solución de muestra simultáneamente, utilizando la misma cantidad de reactivos y concentraciones.																														
<b>Condiciones del equipo:</b> Cromatógrafo de líquidos acoplado con un detector de fluorescencia (excitación: 330 nm /emisión: 420 nm), columna de 2.1 mm × 150 mm; 130 Å, fase estacionaria L68 de 1.7 µm, temperatura del horno de columna a 40 °C y del auto-muestreador a 8 °C y un volumen de inyección de 10 µL.																														
<b>Fase móvil:</b> Ver Tabla 3.																														
<b>Tabla 3.</b> Gradiente de elución																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (min)</th> <th>Flujo (mL/min)</th> <th>Solución A (%)</th> <th>Solución B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.01</td> <td>0.40</td> <td>28</td> <td>72</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>0.40</td> <td>38</td> <td>62</td> </tr> <tr> <td>45.1</td> <td>0.25</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>0.25</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>50.1</td> <td>0.40</td> <td>28</td> <td>72</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>0.40</td> <td>28</td> <td>72</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Solución A (%)	Solución B (%)	0.01	0.40	28	72	45	0.40	38	62	45.1	0.25	80	20	50	0.25	80	20	50.1	0.40	28	72	60	0.40	28	72		
Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Solución A (%)	Solución B (%)																											
0.01	0.40	28	72																											
45	0.40	38	62																											
45.1	0.25	80	20																											
50	0.25	80	20																											
50.1	0.40	28	72																											
60	0.40	28	72																											
<b>Aptitud del sistema.</b>																														
<b>Muestra:</b> Solución estándar.																														
<b>Perfil de picos:</b> El perfil obtenido de la solución de resolución muestra picos prominentes para G0F-GN, G0, G0F, G1F y G1F'.																														
<b>Resolución:</b> No menos de 1.5 entre los picos G1F y G1F'.																														
<b>Resultado:</b> Integrar los picos en el cromatograma resultante e indicar el porcentaje relativo de las																														



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
áreas de pico de las principales estructuras de glicanos en la solución de muestra.		
Suma de todos los oligosacáridos sin galactosa: No menos del 60.0%.		
<b>LÍMITE DE VARIANTES CARGADAS (TRAS EL TRATAMIENTO CON CARBOXIPEPTIDASA) - CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIONICO (MGA 0241.</b> <i>Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.)</i>		
<b>Solución A:</b> Solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM en agua. Ajustar con ácido ortofosfórico diluido a un pH de 6.6.		
<b>Solución B:</b> Solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM y solución de cloruro de sodio 100 mM en agua. Ajustar con hidróxido de sodio diluido a un pH de 6.6.		
<b>Solución C:</b> 5.0 mg/mL de enzima carboxipeptidasa B en agua.		
<b>Solución D:</b> Peróxido de hidrógeno al 2% en agua.		
<b>Solución E:</b> Añadir 50 µL de la solución D a 250 µg de Bevacizumab e incubar a 25°C durante 2 h. Eliminar la solución D de la muestra mediante una columna NAP-5.		
Eluir la muestra con la solución A. Recoger siete fracciones de 150 µL cada una. Verificar la absorbancia a 280 nm. Utilice la fracción adecuada con una concentración de proteína de 0.5 mg/mL.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Nota:</b> Si una fracción supera los 0.5 mg/mL, diluir con la solución A hasta obtener 0.5 mg/mL.		
<b>Solución F:</b> 1 mg/mL de SRef de Bevacizumab en la solución A.		
<b>Solución estándar:</b> Añadir 2 µL de la solución C a 200 µL de la solución F e incubar a 37° ± 2°C durante 2 h.		
<b>Solución de muestra:</b> Preparar Bevacizumab de forma similar a la de la solución estándar.		
<b>Nota:</b> Preparar la solución estándar y la solución de muestra simultáneamente, utilizando la misma cantidad de reactivos y concentraciones.		
<b>Solución de resolución:</b> Añadir la solución E a la solución F hasta una concentración final del 10 %.		
<b>Condiciones del equipo:</b> Cromatógrafo de líquidos acoplado con un detector de PDA (barrido 200–400 nm), columna de 4.6 mm ×		
100 mm y fase estacionaria L53, flujo de 0.8 mL/min, temperatura del horno de columna: 25 °C y del auto-muestreador 8 °C y un volumen de inyección de 80 µL.		
<b>Nota:</b> Los cálculos deben basarse en los cromatogramas obtenidos a 280 nm.		
<b>Aptitud del sistema:</b>		
<b>Muestra:</b> Solución de resolución.		
<b>Especificidad:</b>		
Perfil de pico: Cromatograma obtenido		
Relación pico-valle (p/v): Relación p/v inicial no menor de 1.0 para el pico oxidado al 10% de la solución de resolución.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Nota:</b> Los siguientes criterios se aplican a las variantes ácidas y básicas.		
<b>Resultado:</b> Integrar los picos en el cromatograma resultante e informar los porcentajes relativos de las áreas de pico de las variantes ácidas y básicas en la solución de muestra.		
Variantes ácidas: No más del 45.0 %.		
Variantes básicas: No más del 5.0 %.		
<b>IMPUREZAS</b>		
<b>LÍMITE DE IMPUREZAS DE CADENAS PESADAS NO GLICOSILADAS (por sus siglas en inglés NGHC): CE-SDS (MGA 0312.</b> <i>Electroforesis capilar en condiciones reductoras)</i> <i>Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.</i>		
Utilizar un kit de pureza/heterogeneidad de IgG.		
<b>Solución A (Solución amortiguadora de muestra):</b> Tris HCl 0.1 M a pH 9.0 y SDS al 1 %.		
<b>Solución B:</b> Marcador interno de 10 kDa.		
<b>Solución C:</b> Marcador de peso molecular, 10-225 kDa.		
<b>Solución D:</b> β-Mercaptoetanol.		
<b>Solución E:</b> 4 mg/mL de SRef de Bevacizumab en agua.		
<b>Solución estándar 1:</b> Mezclar 25 µL de la solución E, 70 µL de la solución A, 2 µL de la solución B y 5 µL de la solución D. Calentar la solución a 70 °C durante 10 min. Transferir 100 µL a un microvial para su análisis.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Solución estándar 2:</b> Añadir 85 µL de la solución A, 2 µL de la solución B y 5 µL de la solución D a 10 µL de la solución C. Calentar la solución a 96° ± 2°C durante 3 min. Transferir 100 µL a un microvial para su análisis.</p>		
<p><b>Solución de muestra:</b> Preparar Bevacizumab de forma similar a la de la solución estándar 1.</p>		
<p><b>Nota:</b> Preparar las soluciones estándar y la solución de muestra simultáneamente, utilizando la misma cantidad de reactivos y concentraciones.</p>		
<p><b>Solución de NHCG:</b> Mezclar 25 µL de la solución E, 70 µL de la solución A y 5 µL de la solución D. Calentar la solución a 70 °C durante 10 min. Enfriar a temperatura ambiente y añadir 0.38 µL de la enzima PNGasa F. Incubar la solución a 37 °C durante 15 h.</p>		
<p><b>Solución de resolución:</b> Solución de NHCG adicionada a la solución estándar 1 hasta una concentración final del 2%.</p>		
<p><b>Condiciones del equipo:</b> Capilar con recubierto de sílice fundida de 30.2 cm × 50 µm y una longitud efectiva de 20 cm, temperatura del capilar de 25 °C y del auto-muestreador de 10 °C, detector PDA (barrido 200-400 nm), polaridad positiva, tiempo de inyección 5.0 kV durante 20 s con polaridad inversa y voltaje de separación 15.0 kV durante 30 min con polaridad inversa.</p>		
<p><b>Nota:</b> Los cálculos deben basarse en los cromatogramas obtenidos a 220 nm.</p>		
<p><b>Aptitud del sistema:</b></p>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Muestras:</b> Solución estándar 2 y solución de resolución.		
<b>Especificidad:</b> El electroferograma obtenido de la solución estándar muestra picos correspondientes a la cadena ligera y la cadena pesada.		
<b>Resolución:</b> No menos de 1.2 entre los picos de NHCG y de cadena pesada, Solución de resolución.		
<b>R<sup>2</sup>:</b> No menos de 0.990, Solución estándar 2.		
<b>Nota:</b> Determinar el valor de R <sup>2</sup> a partir de la curva de calibración entre el logaritmo del peso molecular y el tiempo de migración. Considerar un estándar de peso molecular de 20–225 kDa.		
<b>Resultado:</b> Calcular el porcentaje de impureza de NHCG en la solución de muestra.		
Impureza de NHCG: No más de 2.0%.		
<b>LÍMITE DE IMPUREZAS DE BAJO PESO MOLECULAR: CE-SDS</b> (MGA 0312. <i>Electroforesis capilar en condiciones no reductoras</i> ). <i>Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.</i>		
Utilice un kit de pureza/heterogeneidad de IgG.		
<b>Solución A (Solución amortiguadora de muestra):</b> Tris HCl 0.10 M a pH 9.0 y SDS al 1 %.		
<b>Solución B:</b> Marcador interno de 10 kDa.		
<b>Solución C:</b> Marcador de peso molecular, 10-225 kDa.		
<b>Solución D:</b> Yodoacetamida 0,25 M en agua.		
<b>Solución E:</b> β-Mercaptoetanol.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Solución F:</b> 4 mg/mL de SRef de Bevacizumab en agua.		
<b>Solución estándar 1:</b> Mezclar 25 µL de la Solución F, 70 µL de la Solución A, 2 µL de la Solución B y		
5 µL de la Solución D. Calentar la solución a 65 °C durante 4 min. Transferir 100 µL a un microvial para su análisis. <b>Solución estándar 2:</b> Añadir 85 µL de la Solución A, 2 µL de la Solución B y 5 µL de la Solución E a 10 µL de la Solución C. Completar el volumen a 100 µL. Calentar la solución a 96° ± 2°C durante 3 min. Transferir 100 µL a un microvial para su análisis.		
<b>Solución de muestra:</b> Preparar Bevacizumab de forma similar a la Solución estándar 1.		
<b>Nota:</b> Preparar las soluciones estándar y la solución de muestra simultáneamente, utilizando la misma cantidad de reactivos y concentraciones.		
<b>Solución de resolución:</b> Mezclar 25 µL de la solución F, 70 µL de la solución A, 2 µL de la Solución B y 5 µL de la solución D. Calentar la solución a 70 °C durante 90 min. Transferir 100 µL a un microvial para su análisis.		
<b>Condiciones del Equipo:</b> Capilar con recubierto de sílice fundida de 30.2 cm × 50 µm y una longitud efectiva de 20 cm, temperatura del capilar de 25 °C y del auto muestreador de 10 °C, detector PDA (barrido 200-400 nm), polaridad positiva, tiempo de inyección 5.0 kV durante 20 s con polaridad inversa y voltaje de separación 15.0 kV durante 40 min con polaridad inversa.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Nota:</b> Los cálculos deben basarse en los cromatogramas obtenidos a 220 nm.		
<b>Aptitud del sistema:</b>		
<b>Muestras:</b> Solución estándar 2 y solución de resolución.		
<b>Especificidad:</b>		
<b>Perfil de picos:</b> El cromatograma obtenido de la solución de resolución muestra un pico de alto peso molecular que eluye antes del pico principal.		
<b>Resolución:</b> No menos de 2.0 entre el pico de alto peso molecular y el pico correspondiente a Bevacizumab intacto, solución de resolución.		
<b>Resolución:</b> No menos de 1.3 entre el pico de la cadena pesada ligera (HHL) y el pico correspondiente a Bevacizumab intacto, solución de resolución.		
<b>R<sup>2</sup>:</b> No menos de 0,990, solución estándar 2.		
<b>Nota:</b> Determinar el valor de R <sup>2</sup> a partir de la curva de calibración entre el logaritmo del peso molecular y el tiempo de migración. Considerar un estándar de peso molecular de 20-225 kDa.		
<b>Nota:</b> Los siguientes criterios se refieren al pico principal correspondiente al Bevacizumab intacto.		
<b>Resultado:</b> Calcular el porcentaje de impurezas de bajo peso molecular en la solución de muestra.		
Suma de impurezas de bajo peso molecular: No más de 5.0%.		
<b>LÍMITE DE IMPUREZAS DE ALTO PESO MOLECULAR CON MASA MOLECULAR SUPERIOR A LA DE BEVACIZUMAB: CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN</b>		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>MOLECULAR (MGA 0241 CLAR).</b> <i>Se podrán utilizar métodos alternativos y/o variantes a la presente metodología, siempre y cuando estén previamente validados por el fabricante y cumplan con los límites establecidos.</i>		
<b>Solución A:</b> Solución de fosfato de potasio 0.2 M y cloruro de potasio 0.25 M en agua, pH 6.2.		
<b>Solución estándar:</b> 10 mg/mL de SRef de Bevacizumab en la solución A.		
<b>Solución de muestra:</b> 10 mg/mL de Bevacizumab en la solución A.		
<b>Solución de resolución:</b> Calentar la solución estándar a 55 °C durante 2 h.		
<b>Condiciones del equipo:</b> Cromatógrafo de líquidos equipado con detector PDA (barrido 200-400 nm), columna de 7.8 mm × 30 cm; 250 Å, y fase estacionaria L59 de 5 µm, flujo de 0.5 ml/min, temperatura del horno de la columna 25 °C y del auto muestreador 8 °C, volumen de inyección de 20 µL y tiempo de ejecución por cada inyección de 35 min.		
<b>Nota:</b> Los cálculos deben basarse en los cromatogramas obtenidos a 280 nm.		
<b>Aptitud del sistema:</b>		
<b>Muestra:</b> Solución de resolución.		
<b>Especificidad:</b>		
<b>Perfil de picos:</b> El cromatograma obtenido con la solución de resolución muestra un pico de alto peso molecular que eluye antes del pico principal.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<b>Resolución:</b> No menos de 2.0 entre el pico de alto peso molecular y el pico correspondiente al Bevacizumab intacto.		
<b>Nota:</b> El tiempo de retención relativo del pico de alto peso molecular con respecto al pico de bevacizumab es de aproximadamente 0.82.		
<b>Nota:</b> Los siguientes criterios se refieren al pico principal correspondiente al Bevacizumab intacto.		
<b>Resultado:</b> Calcular el porcentaje de impurezas de alto peso molecular en la solución de muestra.		
Suma de las impurezas de alto peso molecular No más de 5.0%		
<b>IMPUREZAS RELACIONADAS.</b>		
<b>PROTEÍNA A:</b> No más de 10 ppm.		
<b>PROTEÍNAS DE LA CÉLULA HOSPEDERA:</b> No más de 100 ppm.		
<b>DETERMINACIÓN DE ADN RESIDUAL DE CÉLULAS HOSPEDERAS:</b> No más de 10 ng/dosis para adultos humanos.		
<b>LÍMITES MICROBIANOS. MGA 0571. Biofármaco.</b>		
La cuenta total de microorganismos aerobios no es mayor de 1 UFC/mL.		
<b>ESTERILIDAD: MGA 0381.</b> El medicamento biotecnológico debe ser estéril.		
<b>ENDOTOXINAS BACTERIANAS MGA 0316:</b> No más de 0.1 UE/mg de medicamento biotecnológico.		

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