

Filgrastim

MTPLGPASSL PQSFLKCLE QVRKIQDGA ALQEKLCATY KLCHPEELVL
LGHSLGIPWA PLSSCPQAL QLAGLSQLH SGLFLYQGLL QALEGISPEL
GPTLDTLQLD VADFATTIWQ QMEELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAG
GVLVASHLQS FLEVSRYVLR HLAQP

$C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$ 18 799 daltons
[121181-53-1].

DEFINICIÓN

El Filgrastim es una forma recombinante del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (r-metHuG-CSF, por sus siglas en inglés). Se trata de un polipéptido no glicosilado de 175 aminoácidos de cadena simple producido por la bacteria *Escherichia coli* transfectada con un gen que codifica un factor estimulante de colonias de granulocitos humanos metionilado. Cuando se prepara como fármaco, contiene no menos de 0,9 mg/mL de Filgrastim. La formulación contiene uno o más agentes amortiguadores y/o estabilizantes adecuados. La presencia de proteína y ADN de la célula huésped en el Filgrastim es específica del proceso. La capacidad del proceso para depurar la proteína y el ADN derivado del huésped requiere de validación y se determina a través de métodos validados. Tiene una potencia biológica de no menos de 80% y no más de 125% con respecto a la relación masa-masa con el estándar.

IDENTIFICACIÓN

- A. Cumple con los requisitos de la *Valoración*.
- B. El tiempo de retención del pico principal de la *Solución muestra* corresponde al de la *Solución estándar*, según se obtienen en la prueba de *Impurezas Orgánicas, Compuestos Relacionados*.

Cambio en la redacción:

C. MAPEO DE PÉPTIDOS

(Ver *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Mapeo de Péptidos* (1055).)

Solución A: Agua y ácido trifluoroacético (1000:1)

Solución B: Transferir 100 mL de agua a un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar 1 mL de ácido trifluoroacético y diluir con acetonitrilo a volumen.

Fase móvil: Ver la *Tabla 1*.

Tabla 1

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	98	2
2	98	2
30	70	30
75	40	60
90	2	98
100	2	98
101	98	2
120	98	2

Solución amortiguadora de Tris: Preparar una solución de tris(hidroximetil)aminometano 0,5 M y ajustar con ácido clorhídrico a un pH de 8,1.

Solución de metilamina: Disolver 0,27 g de clorhidrato de metilamina en 10 mL agua.

Solución de DTT: 30,9 mg/mL de ditioneitol en agua, preparada en el momento de su uso

Solución de digestión: Disolver 0,30 g de urea en 200 µL de *Solución amortiguadora de Tris*, 100 µL de *Solución de metilamina*, 50 µL de *Solución de DTT* y 420 µL de agua. Recubrir con nitrógeno y usar inmediatamente.

Solución de endoproteinasa Glu-C: 0,2 µg/µL de endoproteinasa Glu-C en agua. Usar inmediatamente.

Solución de TFA: Agua y ácido trifluoroacético (100:5)

Solución estándar: Preparar una solución que contenga 80 µg de Δ ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP Δ (IRA 1-ene-2021) y 200 µL de *Solución de digestión* en un tubo adecuado. Agregar agua hasta un volumen final de 390 µL. Agregar 10 µL de *Solución de endoproteinasa Glu-C*. Tapar el tubo, mezclar bien e incubar a aproximadamente 25° durante 18 horas. Agregar 18 µL de *Solución de TFA*.

Solución muestra: Δ Preparar una solución que contenga 80 µg de filgrastim y 200 µL de *Solución de digestión* en un tubo adecuado. Agregar agua hasta un volumen final de 390 µL. Agregar 10 µL de *Solución de endoproteinasa Glu-C*. Tapar el tubo, mezclar bien e incubar a aproximadamente 25° durante 18 horas. Agregar 18 µL de *Solución de TFA*. Δ (IRA 1-ene-2021)

Sistema cromatográfico

(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

Modo: HPLC

Detector: UV 214 nm

Columna: 2,1 mm × 25 cm; relleno L26

Temperatura de la columna: 40°

Velocidad de flujo: 0,2 mL/min

Volumen de inyección: 70 µL

Requisitos de aptitud del sistema: Deben presentarse ocho picos principales en cada cromatograma según se observa en el cromatograma de referencia provisto con el Δ ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP. Δ (IRA 1-ene-2021) La diferencia absoluta en el tiempo de retención de cada uno de los ocho picos principales entre los dos cromatogramas de la *Solución estándar* debe ser $\leq 0,5$ minutos. La diferencia en el tiempo de retención de cada uno de los ocho picos principales entre el cromatograma de la *Solución muestra* y el promedio de los cromatogramas de la *Solución estándar* debe ser $\leq 0,5$ minutos. La diferencia relativa en la altura de los picos de cada uno de los ocho picos principales entre los dos cromatogramas de la *Solución estándar* debe ser $\leq 15\%$.

Análisis

Muestras: *Solución estándar* y *Solución muestra*

[NOTA—Acondicionar el *Sistema cromatográfico* corriendo al menos dos programas de gradiente con blancos antes de inyectar los digeridos. Inyectar por separado la *Solución estándar*, la *Solución muestra* y la *Solución estándar* nuevamente, y registrar las respuestas de cada pico.]

Criterios de aceptación: El perfil cromatográfico de la *Solución muestra* es similar al de la *Solución estándar*. La diferencia relativa entre la altura normalizada del pico de la muestra (normalizada por la suma de las alturas de los picos versus el promedio de la altura total de los picos de los cromatogramas de la *Solución estándar*) y la altura promedio de los picos del estándar para cada uno de los ocho picos principales debe ser $\leq 15\%$.

VALORACIÓN

Cambio en la redacción:

• POTENCIA

Medio A¹: RPMI 1640 modificado para que contenga L-glutamina 2 mM, 2 g/L de bicarbonato de sodio, 4,5 g/L de glucosa, [▲]Ácido N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-(etanosulfónico)[▲] (IRA 1-ene-2021) 10 mM [HEPES], piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,05 mM y suero fetal bovino (SFB) al 5% inactivado por calor.

Preparar y agregar el 2-mercaptoetanol inmediatamente antes de usar.

Medio B: RPMI 1640 modificado para que contenga L-glutamina 2 mM, 2 g/L de bicarbonato de sodio, 4,5 g/L de glucosa, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,05 mM y suero fetal bovino (SFB) al 1% inactivado por calor. Preparar y agregar el 2-mercaptoetanol inmediatamente antes de usar.

Medio C: Preparar una mezcla de *Medio A* con 20 ng/mL de interleukina 3 (IL-3).

Medio D: Preparar una mezcla de *Medio A* con 1 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Solución de sustrato: Reconstituir el sustrato de luminiscencia² con la solución amortiguadora provista. Fraccionar la solución en alícuotas y almacenar a una temperatura inferior a -65° durante un máximo de 2 meses.

Solución estándar: 0,5 ng/mL de [▲]ER Filgrastim para Valoraciones Biológicas USP[▲] (IRA 1-ene-2021) en *Medio B*. [NOTA—No usar diluciones mayores de 1:100 en una sola etapa ni transferir volúmenes menores de 40 µL al realizar diluciones en serie. Mezclar suavemente de manera minuciosa (no usar mezclador de vórtice).]

Solución de control positivo: 10 ng/mL de [▲]ER Filgrastim para Valoraciones Biológicas USP[▲] (IRA 1-ene-2021) en *Medio B*

Solución muestra: 0,5 ng/mL de Filgrastim en *Medio B*. [NOTA—No usar diluciones mayores de 1:100 en una sola etapa ni transferir volúmenes menores de 40 µL al realizar diluciones en serie. Mezclar suavemente de manera minuciosa (no usar mezclador de vórtice).]

Preparación del cultivo celular: Adaptar células M-NFS-60³ para cultivo en G-CSF. Cultivar las células en dióxido de carbono al 5% (CO₂) y a 37°. Se deben realizar pasajes de células dos veces por semana y volver a sembrarlas a una densidad de 3 × 10⁴ células/mL durante 3 días o 1 × 10⁴ células/mL durante 4 días. Realizar pasajes de los cultivos en *Medio C* hasta el segundo pasaje. Transferir las células al *Medio D* y realizar pasajes de los cultivos hasta el 11vo. pasaje. Después del 11vo. pasaje, las células se consideran adaptadas para G-CSF y pueden usarse en la *Valoración* o se pueden agregar a un banco. Las células se agregan a un banco a una densidad de aproximadamente 1,5 × 10⁶ células/mL en medio para banco [90% SFB, dimetil sulfóxido al 10% (DMSO)]. Al descongelar las células del banco, cultivar las células durante 2–3 pasajes en *Medio D* antes de usarlas en la *Valoración*.

Suspensión de células: Lavar las células dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) y ajustar la concentración de células a 1 × 10⁵ células/mL en *Medio B*.

Preparación de las células para el análisis: Usar una placa de microtitulación negra de 96 pocillos con fondo plano (los fondos de los pocillos deben ser ópticamente

transparentes) con los pocillos distribuidos en ocho filas (marcadas de la A a la H) con 12 pocillos (numerados del 1 al 12) en cada fila. Colocar 50 µL de *Suspensión de células* en todos los pocillos de la placa de microtitulación de 96 pocillos excepto en los pocillos de la columna 1 (A1–H1, blanco). Colocar 50 µL de *Medio B* en los pocillos de la columna 1. Incubar la placa a 37° en el incubador, durante un máximo de 1 hora, hasta que la *Solución estándar* y la *Solución muestra* estén listas.

Preparación de la Solución estándar y la Solución muestra diluidas: Usar una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo redondo con los pocillos distribuidos en ocho filas (marcadas de la A a la H) con 12 pocillos (numerados del 1 al 12) en cada fila. Dispensar 100 µL de *Medio B* en cada pocillo de la placa excepto en la columna 12 (pocillos A12–H12, control positivo) y A2–A10. Pipetear y transferir 200 µL de *Solución estándar* a los pocillos A3, A6 y A9, y 200 µL de *Solución muestra* a los pocillos A2, A5 y A8. Se pueden preparar dos muestras en una placa. La segunda muestra puede agregarse a los pocillos A4, A7 y A10. Pipetear y transferir 100 µL de *Solución de control positivo* a todos los pocillos de la última columna (A12–H12). Usando una pipeta multicanal (12 canales), realizar diluciones al medio en la placa. Aspirar 100 µL de la primera fila (A2–A10), transferir a la segunda fila y mezclar tres veces. Luego, aspirar 100 µL de la segunda fila, transferir a la tercera fila y mezclar tres veces. Repetir este procedimiento con toda la placa hasta la fila H. Desechar los 100 µL aspirados de la última fila.

Requisitos de aptitud del sistema: La relación señal-ruido entre la señal de quimioluminiscencia media del control positivo y la señal de quimioluminiscencia media del control negativo (A11–H11) debe ser ≥3. El número de valores aberrantes por factores técnicos no puede exceder de cuatro por curva.

Análisis: Usando una pipeta multicanal, transferir 50 µL de cada pocillo de la placa de microtitulación con fondo redondo (que contienen la *Solución estándar* y diluciones seriales de la *Solución muestra*, los blancos y los controles positivos y negativos) al mismo pocillo de la placa de microtitulación negra que contiene la suspensión de células, comenzando con la concentración más baja. Mezclar tres veces. Incubar la placa de microtitulación negra en un incubador humidificado que contiene CO₂ durante 31 ± 2 horas a 37° con CO₂ al 5%. Agregar 100 µL de *Solución de sustrato* reconstituida a todos los pocillos. Incubar la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente mientras se agita la placa suavemente en un agitador de placas. Incubar la placa durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente sin agitar. Leer la placa en un lector de placa de microtitulación por luminiscencia.

Cálculos: Para cada muestra, calcular primero la potencia relativa de Filgrastim (como porcentaje) usando métodos estadísticos para valoraciones de líneas paralelas, luego calcular la potencia en UI/mL. Las pruebas estadísticas para linealidad, pendiente y paralelismo para cada muestra comparada con el estándar tienen que aprobarse al nivel del 95%. El límite de confianza debe estar dentro de 75% y 133% de la potencia estimada.

Criterios de aceptación: La potencia media estimada es no menos de 80% y no más de 125% de la potencia declarada.

IMPUREZAS

Cambio en la redacción:

• IMPUREZAS ORGÁNICAS, COMPUESTOS RELACIONADOS

Solución A: Agua y ácido trifluoroacético (1000:1)

¹ Un medio RPMI 1640 adecuado está disponible en ATCC (núm. de catálogo 30-2001), o usar una formulación equivalente.

² Un sustrato adecuado se encuentra disponible en Promega (Cell Titer Glo-Luminescence Kit, núm. de catálogo: G7572) o equivalente.

³ Se puede obtener M-NFS-60 en ATCC (núm. de catálogo: CRL-1838) o un equivalente adecuado.

Solución B: Transferir 100 mL de agua a un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar 1 mL de ácido trifluoroacético y diluir con acetonitrilo a volumen.
Fase móvil: Ver la *Tabla 2*.

Tabla 2

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	60	40
30	20	80
35	20	80
45	60	40
55	60	40

Solución estándar: 0,75 mg/mL de Δ ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP Δ (IRA 1-ene-2021) en agua

Solución muestra: 0,75 mg/mL de Filgrastim en agua

Sistema cromatográfico

(Ver *Cromatografía (621)*, *Aptitud del Sistema*.)

Modo: HPLC

Detector: UV 215 nm

Columna: 4,6 mm \times 15 cm; relleno L26

Temperatura de la columna: 60°

Velocidad de flujo: 0,8 mL/min

Volumen de inyección: 33 μ L

Aptitud del sistema

Muestra: *Solución estándar*

Requisitos de aptitud

Tiempos de retención relativos: Aproximadamente 0,91 para Filgrastim 1 oxidado, aproximadamente 0,98 para Filgrastim 2 oxidado y aproximadamente 1,04 para Filgrastim reducido con respecto al pico principal

Desviación estándar relativa: La desviación estándar relativa del área total (pico principal y picos menores relacionados con el producto, excluyendo el pico del volumen muerto) y la desviación estándar relativa del tiempo de retención del pico principal de Filgrastim en inyecciones repetidas es no más de 5%.

Análisis

Muestras: *Solución estándar* y *Solución muestra*

Calcular el porcentaje de Filgrastim 1 oxidado, Filgrastim 2 oxidado, Filgrastim y Filgrastim reducido en la porción de Filgrastim tomada:

$$\text{Resultado} = (r_U/r_T) \times 100$$

r_U = respuesta del pico de cada impureza

r_T = suma de las respuestas de todos los picos

Criterios de aceptación

Impurezas individuales: No más de 1,0% de Filgrastim reducido

Impurezas totales: No más de 2,0%

Cambio en la redacción:

• IMPUREZAS CON CARGAS DISTINTAS DE FILGRASTIM

(Ver *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Isoelectroenfoque (1054)*.)

Solución de ácido fosfórico 1 M: Diluir 6,8 mL de ácido fosfórico al 85% con agua hasta un volumen final de 100 mL.

Solución de hidróxido de sodio 1 M: Diluir 10 mL de hidróxido de sodio 10 M con agua hasta un volumen final de 100 mL.

Solución de anolito: Agregar 10 mL de *Solución de ácido fosfórico 1 M* a 90 mL de agua para obtener una solución de ácido fosfórico 0,1 M.

Solución de catolito: Agregar 10 mL de *Solución de hidróxido de sodio 1 M* a 90 mL de agua para obtener una solución de hidróxido de sodio 0,1 M.

Solución iniciadora: Agregar 0,072 g de persulfato de potasio a 10 mL de agua para obtener una solución de persulfato de potasio al 0,72%.

Solución de fijación: Mezclar 35 g de ácido sulfosalicílico y 100 g de ácido tricloroacético en 1000 mL de agua.

Solución de lavado del gel: Preparar una solución que contenga, en cada litro, 400 mL de metanol absoluto, 100 mL de ácido acético glacial y agua.

Solución de tinción de Coomassie: Agregar 1,25 g de Azul Brillante de Coomassie R-250 a 1 litro de *Solución de lavado del gel*.

Solución de decoloración de Coomassie: Preparar una solución que contenga, en cada litro, 75 mL de metanol absoluto, 100 mL de ácido acético glacial y agua.

Solución de referencia A: 1 mg/mL de Δ ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP Δ (IRA 1-ene-2021) en agua

Solución de referencia B: Diluir *Solución de referencia A* con agua hasta obtener una concentración de 20 μ g/mL de Δ ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP Δ (IRA 1-ene-2021)

Solución de referencia C: 3 mg/mL de Δ ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP Δ (IRA 1-ene-2021) en agua

Solución de referencia D: Usar una solución de calibración de punto isoelectrónico (pI), en el intervalo de pI de 2,5–6,5, preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Solución muestra: 1 mg/mL de Filgrastim en agua

Gel: Preparar un gel de 6% de T (acrilamida total), 0,16% de C (bisacrilamida) que contenga 0,3 g/mL de urea, 1,5% de anfolitos de pH 3–10, 3,7% de anfolitos de pH 5–7 y 0,05% de *Solución iniciadora*.

Requisitos de aptitud del sistema: Los marcadores de punto isoelectrónico se distribuyen a lo largo de todo el gel; ningún artefacto obstruye la visualización de las bandas; y la *Solución de referencia B* debe ser visible.

Análisis: La electroforesis en gel se lleva a cabo en un aparato horizontal para gel a 10° y una configuración de potencia constante de 10 W (se permite variar el voltaje y la corriente). Pre-enfocar el gel durante 20–40 minutos.

Aplicar 10 μ L de *Solución muestra* (10 μ g), *Solución de referencia A* (10 μ g), *Solución de referencia B* (0,2 μ g) y *Solución de referencia C* (30 μ g) a calles separadas en el gel.

Aplicar aproximadamente 10 μ L de *Solución de referencia D* a cada lado del gel. Enfocar el gel durante aproximadamente 2,5 horas a 10° a una configuración de potencia constante de 10 W (se permite variar el voltaje y la corriente). Retirar el gel del aparato, colocar en un volumen de *Solución de fijación* suficiente para sumergir el gel y someter a un movimiento bascular suave durante no menos de 15 minutos. Decantar y repetir el lavado en *Solución de fijación* durante 15 minutos adicionales. Retirar la *Solución de fijación* y sumergir el gel en *Solución de lavado del gel* mezclando suavemente durante no menos de 30 minutos. Decantar la *Solución de lavado del gel* y sumergir el gel en *Solución de tinción de Coomassie* mezclando suavemente durante 15–60 minutos. Retirar la *Solución de tinción de Coomassie*, enjuagar el gel con *Solución de decoloración de Coomassie* y sumergir el gel en *Solución de decoloración de Coomassie* recientemente preparada. Continuar sometiendo el gel a movimiento bascular en *Solución de decoloración de Coomassie* hasta que el fondo quede transparente y la *Solución de referencia B* aún sea visible. Examinar visualmente el gel.

Criterios de aceptación: La banda principal en la *Solución muestra* se enfoca en la misma posición que la banda

principal de la *Solución de referencia A*. Las bandas menores presentes en la *Solución muestra* también se observan en la *Solución de referencia C* y, basándose en las estimaciones visuales, tienen una intensidad menor o igual que la *Solución de referencia B*. No hay bandas presentes en la *Solución muestra* que no estén presentes en la *Solución de referencia C*.

Cambio en la redacción:

• IMPUREZAS CON PESOS MOLECULARES DIFERENTES AL DE FILGRASTIM

(Ver Artículos Obtenidos por Biotecnología—Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (1056).)

Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X

(condiciones no reductoras): Preparar una solución que contenga, en cada mililitro, 80 mg de dodecil sulfato de sodio y 30 mg de tris(hidroximetil)aminometano. Ajustar con ácido clorhídrico a un pH de 6,8. Agregar 0,80 mg/mL de azul de bromofenol y 0,4 mL/mL de glicerol.

Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X

(condiciones reductoras): Preparar una solución que contenga, en cada mililitro, 80 mg de dodecil sulfato de sodio, 30 mg de tris(hidroximetil)aminometano y 38,5 mg de ditiotreitol. Ajustar con ácido clorhídrico a un pH de 6,8. Agregar 0,80 mg/mL de azul de bromofenol y 0,4 mL/mL de glicerol.

Solución amortiguadora de muestra de SDS 1X

(condiciones no reductoras): Diluir 1 volumen de *Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X (condiciones no reductoras)* con 3 volúmenes de agua.

Solución amortiguadora de muestra de SDS 1X

(condiciones reductoras): Diluir 1 volumen de *Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X (condiciones reductoras)* con 3 volúmenes de agua.

Solución de lavado del gel I:

Preparar una solución que contenga, en cada litro, 400 mL de metanol absoluto, 100 mL de ácido acético glacial y agua.

Solución de lavado del gel II:

Preparar una solución que contenga, en cada litro, 100 mL de etanol al 95%, 50 mL de ácido acético glacial y agua.

Solución reductora:

Preparar una solución que contenga 2 mg de ditiotreitol en 400 mL de agua. [NOTA—Preparar esta solución inmediatamente antes de su uso y protegerla de la luz. Esta cantidad de solución es suficiente para dos placas de gel.]

Solución de nitrato de plata:

Agregar 0,68 g de nitrato de plata a 400 mL de agua y mezclar bien. [NOTA—Preparar esta solución inmediatamente antes de su uso y protegerla de la luz. Esta cantidad de solución es suficiente para dos placas de gel.]

Solución reveladora:

Agregar 18,6 g de carbonato de sodio monohidrato y 0,5 mL de formaldehído a 500 mL de agua. [NOTA—Preparar esta solución en el momento de su uso. Esta cantidad de solución es suficiente para dos placas de gel.]

Solución de ácido acético:

Preparar una solución que contenga, en cada litro, 50 mL de ácido acético glacial y agua.

Solución amortiguadora de corrida:

Preparar una solución amortiguadora que contenga 1 g de dodecil sulfato de sodio, 3,03 g de tris(hidroximetil)aminometano y 14,4 g de glicina por litro.

Gel de resolución:

Usar un gel de gradiente de poliacrilamida al 10%–20% [10%–20% de T, 2,6% de C (bisacrilamida)] de 1,5 mm de espesor.

Gel concentrador: 4% T (acrilamida total), 2,6% C (bisacrilamida)

Solución de referencia A: Diluir 25 µg de ▲ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (IRA 1-ene-2021) con 25 µL de *Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X* apropiada y suficiente agua para obtener 100 µL de una solución que contenga ▲250 µg/mL de ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (IRA 1-ene-2021) en *Solución amortiguadora de muestra de SDS 1X*. Preparar una *Solución de referencia A* reducida y una no reducida usando la *Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X* apropiada. Calentar la muestra reducida a aproximadamente 65° durante 5–10 minutos. No calentar la muestra no reducida.

Solución de referencia B: Preparar una *Solución de referencia B* reducida y una no reducida diluyendo *Solución de referencia A* (1:100) con la *Solución amortiguadora de muestra de SDS 1X* apropiada para obtener una preparación de 2,5 µg/mL de ▲ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (IRA 1-ene-2021). Calentar la muestra reducida a aproximadamente 65° durante 5–10 minutos. No calentar la muestra no reducida.

Solución de referencia C: Diluir 75 µg de ▲ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (IRA 1-ene-2021) con 25 µL de *Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X* apropiada y suficiente agua para obtener 100 µL de una solución que contenga ▲750 µg/mL de ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (IRA 1-ene-2021) en *Solución amortiguadora de muestra de SDS 1X*. Preparar una *Solución de referencia C* reducida y una no reducida usando la *Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X* apropiada. Calentar la muestra reducida a aproximadamente 65° durante 5–10 minutos. No calentar la muestra no reducida.

Solución de referencia D: Usar una solución de marcadores de peso molecular adecuada para calibrar geles de SDS-poliacrilamida en el intervalo de 14,4–94 kDa.

Solución muestra: Diluir 25 µg de la muestra a analizar con 25 µL de *Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X* apropiada y agua suficiente para obtener 100 µL de una solución que contenga 250 µg/mL de preparación del artículo de prueba en *Solución amortiguadora de muestra de SDS 1X*. Preparar una *Solución muestra* reducida y una no reducida usando la *Solución amortiguadora de muestra de SDS 4X* apropiada. Calentar la muestra reducida a aproximadamente 65° durante 5–10 minutos. No calentar la muestra no reducida.

Análisis: Aplicar por separado 20 µL de la *Solución muestra*, de la *Solución de referencia A*, de la *Solución de referencia B* y de la *Solución de referencia C* en calles separadas del gel. Aplicar aproximadamente 20 µL de *Solución de referencia D* a cada lado del gel. [NOTA—Las muestras reducidas y no reducidas deben correrse en geles separados o en el mismo gel siempre que estén separadas por al menos tres calles que contengan *Solución amortiguadora de muestra de SDS 1X (no reductora)*.] Realizar la electroforesis usando un voltaje constante de 125 V. [NOTA—Se permite variar la corriente y la potencia durante la corrida.] Retirar el gel del aparato después de que el colorante de rastreo comience a aproximarse al extremo del ánodo del gel, colocar el gel en un volumen suficiente de *Solución de lavado del gel I* para sumergir el gel y mezclar suavemente durante no menos de 1 hora. Decantar la *Solución de lavado del gel I* y sumergir el gel en un volumen similar de *Solución de lavado del gel II*. Después de 15 minutos de mezclar suavemente, decantar y lavar el gel durante 15 minutos adicionales en *Solución de lavado del gel II*. Lavar el gel dos veces durante 15 minutos cada vez con la *Solución reductora* seguida por dos lavados de 15 minutos cada vez con la *Solución de nitrato de plata*. Enjuagar dos veces con agua y decantar. Transferir el gel a un recipiente transparente que contenga un volumen suficiente de la *Solución reveladora* para sumergir el gel y

someter el envase a un movimiento bascular cambiando con frecuencia la *Solución reveladora* (10–15 segundos) hasta que los marcadores de peso molecular y el *Estándar de referencia B* se vuelvan visibles. Cuando el gel esté visiblemente teñido, lavar inmediatamente con *Solución de ácido acético*. Enjuagar el gel repetidamente con *Solución de ácido acético* hasta retirar la *Solución reveladora*, luego someter a un movimiento bascular suave durante aproximadamente 30 minutos. Examinar visualmente el gel.

Requisitos de aptitud del sistema: Ningún artefacto obstruye la visualización de las bandas y la *Solución de referencia B* debe ser visible.

Criterios de aceptación: La banda principal en la *Solución muestra* migra hacia la misma posición que la banda principal de la *Solución de referencia A*. Las bandas menores presentes en la *Solución muestra* también se observan en la *Solución de referencia C* y, basándose en las estimaciones visuales, tienen una intensidad menor o igual que la *Solución de referencia B*. No hay bandas presentes en la *Solución muestra* que no estén presentes en la *Solución de referencia C*.

Cambio en la redacción:

• LÍMITE DE PROTEÍNAS DE ALTO PESO MOLECULAR

Fase móvil: Agregar 11,5 g de ácido fosfórico concentrado a 800 mL de agua. Ajustar con hidróxido de sodio 10 N a un pH de 2,5 y diluir con agua hasta 1000 mL. Filtrar y desgasificar.

Solución de acondicionamiento de la columna: Disolver 18 mg de albúmina sérica bovina (BSA) en 9 mL de agua.

Solución de resolución: ▲0,3 mg/mL de ER Filgrastim de Alto Peso Molecular USP▲ (IRA 1-ene-2021)

Solución estándar: 0,3 mg/mL de ▲ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (IRA 1-ene-2021) en agua

Solución muestra: Diluir Filgrastim con agua hasta 0,3 mg/mL.

Sistema cromatográfico

(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

Modo: HPLC

Detector: UV 214 nm

Columna: 7,8 mm × 30 cm; relleno L59

Temperatura de la columna: Ambiente

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 40 µL

Aptitud del sistema

Muestras: *Solución de acondicionamiento de la columna*, *Solución de resolución* y *Solución estándar*

Requisitos de aptitud

Respuesta de los picos de la solución de la columna:

Cromatografiar la *Solución de acondicionamiento de la columna* 3–10 veces. La respuesta del pico de las inyecciones consecutivas finales debe ser constante.

Tiempos de retención relativos: Cromatografiar la *Solución de resolución* dos veces y registrar las respuestas de los picos. Los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,5 para el agregado de Filgrastim, 0,9 para el dímero de Filgrastim y 1,0 para el monómero de Filgrastim.

Desviación estándar relativa: La desviación estándar relativa del área total (pico principal y picos menores relacionados con el producto, excluyendo el pico del volumen muerto) en inyecciones repetidas de la *Solución estándar* es no más de 3%. La desviación estándar relativa del tiempo de retención del pico principal de Filgrastim en inyecciones repetidas de la *Solución estándar* es no más de 3%.

Análisis

Muestras: *Solución estándar* y *Solución muestra*

Medir las áreas del pico principal y de los picos que eluyen antes que el pico principal, excluyendo los picos de disolventes. Calcular el porcentaje de agregados (picos que eluyen antes que el dímero), dímero y monómero en la porción de Filgrastim tomada:

$$\text{Resultado} = (r_U/r_T) \times 100$$

r_U = respuesta del pico individual de agregados, dímero y monómero

r_T = suma de las respuestas de todos los picos

Criterios de aceptación

Impurezas individuales: No más de 0,5% de agregado

Impurezas totales de alto peso molecular: No más de 2,0%

PRUEBAS ESPECÍFICAS

Cambio en la redacción:

• CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

(Ver *Artículos Obtenidos por Biotecnología—Valoración de Proteínas Totales* (1057).)

Solución de sorbitol al 5% de pH 3,25: Preparar una solución de sorbitol al 5% en agua y ajustar con ácido clorhídrico a un pH de 3,25.

Solución muestra: Diluir el Filgrastim en *Solución de sorbitol al 5% de pH 3,25* hasta obtener una solución con una concentración entre 0,2 y 1,7 mg/mL.

Blanco: *Solución de sorbitol al 5% de pH 3,25*

Condiciones instrumentales

Modo: UV-Vis

Longitudes de onda analítica: 280; 320 y 350 nm

Celda: Espectrofotométrica de cuarzo con una longitud de paso de 1 cm

Análisis

Muestra: *Solución muestra*

Calcular la absorbancia de la muestra a 320 nm como porcentaje de la absorbancia a 280 nm:

$$\text{Resultado} = (A_{320}/A_{280}) \times 100$$

A_{320} = valor de absorbancia de la *Solución muestra* a 320 nm

A_{280} = valor de absorbancia de la *Solución muestra* a 280 nm

Si la absorbancia a 320 nm es menos de 5,0% de la absorbancia a 280 nm, calcular la concentración de proteína de la muestra de Filgrastim:

$$\text{Resultado} = A_{280} \times D^{\Delta}_{\text{▲}} (IRA 1-ene-2021)/0,86$$

A_{280} = valor de absorbancia de la *Solución muestra* a 280 nm

$D^{\Delta}_{\text{▲}} (IRA 1-ene-2021)$ = factor de dilución de la *Solución muestra*

Si la absorbancia a 320 nm es más de 5,0% de la absorbancia a 280 nm, calcular la concentración de proteína de la muestra de Filgrastim:

$$\text{Resultado} = \{A_{280} - [(3,3435 \times A_{320}) - (2,3435 \times A_{350})]\} \times D^{\Delta}_{\text{▲}} (IRA 1-ene-2021)/0,86$$

A_{280} = valor de absorbancia de la *Solución muestra* a 280 nm

A_{320} = valor de absorbancia de la *Solución muestra* a 320 nm

A_{350} = valor de absorbancia de la *Solución muestra* a 350 nm

D^{Δ} \blacktriangle (IRA 1-ene-2021) = factor de dilución de la *Solución muestra*

- **PRUEBAS DE RECuento MICROBIANO** <61> y **PRUEBAS DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS** <62>: El recuento total de microorganismos aerobios no excede de 0 ufc/10 mL de la solución de la sustancia.
- **PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS** <85>: Contiene no más de 2 Unidades USP de Endotoxina/mg de fármaco.

REQUISITOS ADICIONALES

- **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO:** Conservar en envases impermeables. Almacenar a una temperatura de entre 2° y

8°. Proteger de la luz durante el almacenamiento a largo plazo.

- **ETIQUETADO:** Etiquetar indicando el contenido de fármaco en gramos por envase. El etiquetado indica que el origen del material es ADN recombinante.

Cambio en la redacción:

- **ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP** <11>
 - ▲ER Filgrastim para Valoraciones Biológicas USP
 - ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP
 - ER Filgrastim de Alto Peso Molecular USP \blacktriangle (IRA 1-ene-2021)

Oficial