





**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 ▲ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (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 × 15 cm; relleno L26

**Temperatura de la columna:** 60°

**Velocidad de flujo:** 0,8 mL/min

**Volumen de inyección:** 33 µL

**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 ▲ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (IRA 1-ene-2021) en agua

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

**Solución de referencia C:** 3 mg/mL de ▲ER Aptitud del Sistema de Filgrastim USP▲ (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 µL de *Solución muestra* (10 µg), *Solución de referencia A* (10 µg), *Solución de referencia B* (0,2 µg) y *Solución de referencia C* (30 µg) a calles separadas en el gel.

Aplicar aproximadamente 10 µL 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

$D^{\Delta}$   $\blacktriangle$  (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