

MONOGRAFÍA NUEVA

Con fundamento en el numeral 4.11.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2010, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1° de agosto y hasta el 30 de septiembre de 2015, 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, México, D.F. Fax: 5207 6890
Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

INTERFERÓN BETA-1A

Esta monografía aplica para interferón beta-1a biofármaco y medicamento biotecnológico. Es una proteína purificada, producida con tecnología de ADN recombinante. El interferón beta-1a biofármaco siempre se presenta como una solución concentrada. Es una proteína glicosilada que tiene la misma secuencia de aminoácidos, puentes disulfuro y sitio de N-glicosilación que el interferón beta producido por fibroblastos humanos, en respuesta a una infección viral u otros inductores, el cual tiene actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de Interferón beta-1a

MSYNLLGFLQ	RSSNFQCQKL	LWQLNGRLEY	CLKDRMNFDI
PEEIKQLQQF	QKEDAALTIY	EMLQNIFAIF	RQDSSSTGWN*
ETIVENLLAN	VYHQINHLKT	VLEEKLEKED	FTRGKLMSSL
HLKRYYGRIL	HYLKAKEYSH	CAWTIVRVEI	LRNFYFINRL
TGYLRN			

*Sitio de N glicosilación.

Nota: las líneas representan puentes disulfuro.

C₉₀₈H₁₄₀₆N₂₄₆O₂₅₂S₇

M_raprox. 19 000
(cadena peptídica)

M_raprox. 22 500
(proteína glicosilada)

Contiene no menos de 0.2 mg de proteína por mililitro con una actividad específica de no menos de 1.5 × 10⁸ UI por mg de proteína en la solución concentrada, puede contener sales de las soluciones reguladoras de pH.

BIOFARMACO, SOLUCIÓN CONCENTRADA

DESCRIPCIÓN. Solución transparente, incolora o ligeramente amarillenta y libre de partículas extrañas visibles.

FABRICACIÓN

La solución concentrada de interferón beta-1a se produce mediante la tecnología de ADN recombinante en cultivos de células de mamífero.

Previo a su liberación cada lote del producto a granel final debe cumplir con las siguientes pruebas.

ENSAYOS DE IDENTIDAD

A. ACTIVIDAD ESPECÍFICA.MPB 0700. No menos de 120 MUI/mg.

B. DETERMINACIÓN DE ISOFORMAS. Espectrometría de masas u otro método validado por el fabricante.

La espectrometría de masas obtenida corresponde, con respecto a los seis mayores picos, a la espectrometría de masas obtenida con el cromatograma de referencia del estándar de interferón beta-1a. En el espectro de masa de la muestra se deben observar tres picos mayores: A, B, y C (22 375, 22 084 y 22 739 Da, respectivamente). Deben observarse tres picos de baja intensidad: D, E y F (23031, 23400 y 21793 Da, respectivamente).

Espectrometría de masas

El espectro obtenido con la muestra en análisis corresponde al obtenido con la solución de referencia del interferón beta-1a usada.

Introducción de la muestra. Introducir directamente una preparación desalada de la muestra a ser analizada o una combinación de espectrometría de masas y cromatografía líquida.

Forma de ionización. Electrospray. Adquisición de la señal: Espectro completo desde 1 100 hasta 2 400 m/z.

Calibración. Usar mioglobina en el intervalo m/z de 600 a 2 400 del instrumento, dentro de los parámetros establecidos en la validación del instrumento y analizar la muestra; la desviación de la masa determinada no debe ser mayor al 0.02 % de la masa establecida.

Interpretación de resultados. Un espectro típico consta de 6 formas glicosiladas principales de la A a F, las cuales difieren en su grado de sialilación y/o tipo de glicosilación como se muestra en la *tabla 2*.

Tabla 2

Pico MS	Glicoforma	Mr esperada	Nivel de sialilación
A	2A2S1F	22 375	Disialilado
B	2A1S1F	22 084	Monosialilado
C	3A2S1F y/o 2A2S1F más una repetición HexNacHex	22 739	Disialilado
D	3A3S1F	23 031	Trisialilado
E	4A3S1F y/o 3A3S1F más una repetición HexNacHex	23 400	Trisialilado
F	2A0S1F	21 793	No- sialilado

Resultados. El espectro de masas obtenido con la muestra en análisis corresponde a los 6 picos principales en el espectro de masas al obtenido con la solución de referencia del interferón beta-1a usada.

C. MAPEO DE PÉPTIDOS. MGA 0241, CLAR.

El perfil cromatográfico obtenido con la preparación de muestra corresponde al perfil cromatográfico obtenido con la preparación de referencia de interferón beta-1a.

Fase móvil A: Diluir 1.0 mL de ácido trifluoroacético a 1.0 L de agua para análisis.

Fase móvil B: Diluir 1.0 mL de ácido trifluoroacético en 700 mL de acetonitrilo para cromatografía y aforar a 1 000 mL con agua para análisis.

Preparación de muestra. Preparar una solución de tris (hidroximetil) aminometano, que contenga 242 g/L. Tomar 5.0 µL de esta solución y adicionarlos al volumen de la muestra a ser analizada que contenga 20.0 µg de proteína contenida en un tubo de polipropileno. Adicionar 4.0 mL de una solución que contiene 1.0 µg/mL de endoproteasa Lis C en una solución amortiguadora de clorhidrato de tris al 0.05 M y pH 9.0, mezclar suavemente e incubar a 30 °C por 2 h. Adicionar 10 µL de una solución de ditiotreitól que contiene 15.4 g/L, diluir la mezcla con un volumen igual de la solución de clorhidrato de guanidina que contiene 573 g/L e incubar a 4.0 °C por 3.0 a 4.0 h.

Preparación de referencia. Prepare al mismo tiempo y de la misma forma que la solución de prueba pero usando la referencia de interferón beta-1a en lugar de la muestra a ser analizada.

Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 214 nm.

Precolumna de 0.02 m x 2.1 mm con fase estacionaria L1 para cromatografía (5.0 µm) con tamaño de poro de 30 nm.

Columna de 25 cm x 2.1 mm con fase estacionaria L1 para cromatografía (5.0 µm) con tamaño de poro de 30 nm. Velocidad de flujo de 0.2 mL/min.

Inyección. El volumen que contenga 20 µg de proteína digerida.

Aptitud del sistema. El cromatograma obtenido con la solución de referencia es cualitativamente similar al cromatograma del interferón beta-1a digerido que se suministra con el interferón beta-1a de referencia.

Resultados. El perfil del cromatograma obtenido con la solución de prueba, corresponde a la obtenida en el cromatograma con la solución de referencia.

Tabla 3. Gradiente para mapeo de péptidos.

Tiempo (min)	Fase móvil A (% v/v)	Fase móvil B (% v/v)
0 - 30	100 → 64	0 → 36
30 - 45	64 → 55	36 → 45
45 - 50	55 → 40	45 → 60
50 - 70	40 → 0	60 → 100
70 - 83	0	100
83 - 85	0 → 100	100 → 0

PUREZA. MGA 0311, *Electroforesis en gel de poliácridamida en condiciones reductoras.*

Interferón beta-1a parcialmente glicosilado no más de 5%; interferón beta-1a desglucosilado no más de 2%; cualquier otra impureza de menor peso molecular que el interferón beta-1a glicosilado, no más de 1%.

Gel de resolución. Poliacrilamida al 12%.

Solución reguladora concentrada para muestras. La solución reguladora para la concentración de la muestra para la electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras contiene 2-mercaptoetanol como agente reductor.

Solución reguladora de muestra. Mezclar volúmenes iguales de la solución reguladora concentrada para muestras y agua.

Solución de prueba (a). Concentrar la solución a ser analizada, por un método adecuado para obtener una concentración de proteínas de 1.5 mg/mL.

Solución de prueba (b). Mezclar volúmenes iguales de la solución a ser analizada (a) y la solución amortiguadora concentrada para muestras.

Solución de prueba (c). Diluir la solución de prueba (a) para tener una concentración de proteínas de 0.6 mg/mL. Mezclar volúmenes iguales de esta solución con la solución amortiguadora concentrada para muestras.

Solución de prueba (d). Mezclar 8.0 µL de la solución de prueba (c) con 40 µL de la solución amortiguadora de muestra.

Solución de prueba (e). Mezclar 15 µL de la solución de prueba (d) con 35 µL de la solución amortiguadora de muestra.

Solución de prueba (f). Mezclar 18 µL de la solución de prueba (e) con 18 µL de la solución amortiguadora de muestra.

Solución de prueba (g). Mezclar 12 µL de la solución de prueba (f) con 12 µL de la solución amortiguadora de muestra.

Solución de referencia. Disolver los marcadores de masa molecular relativa adecuados para calibrar los geles de SDS-PAGE en el intervalo de 15 a 67 kDa en la solución reguladora de muestra.

Preparación de la muestra. Hervir las soluciones de prueba de la (b) a la (g) y la solución de referencia durante 3 min.

Aplicación de la muestra. Depositar 20 µL de cada una de las soluciones de prueba de la (b) a la (g) y de la solución de referencia, en los carriles del gel.

Detección. Sumergir los geles en la solución de azul Coomassie de 33 a 37 °C durante 90 min con agitación suave, remover la solución de tinción. Desteñir los geles con una solución que contiene: una parte de ácido acético glacial, una parte de 2- propanol y 8 partes de agua.

Masa molecular aparente:

Interferón beta-1a = 23 000 aproximadamente

Interferón beta-1a subglicosilado = 21 000

Interferón beta-1a sin glicosilar = 20 000

Dímeros de interferón beta-1a = 46 000

Identificación de las bandas. Usar el electroferograma que se provee con la referencia del interferón beta-1a.

Aptitud del sistema:

- Se cumple el criterio de validación.
- Se ve una banda en el electroferograma obtenido con la solución de prueba (g).
- Se ve un gradiente de intensidad en el color de las bandas en los electroferogramas obtenidos con las soluciones de prueba de la (b) a la (g).

Límites:

- En electroferograma obtenido con la solución de prueba (b), la banda correspondiente al interferón beta-1a glicosilado, no deben ser menor al 90 %.
- En el electroferograma obtenido con la solución de prueba (c) la banda correspondiente al interferón beta-1a subglicosilado, no es más intensa que la banda principal del electroferograma obtenido con la solución de prueba (e) que corresponde al 5.0 %.
- En el electroferograma obtenido con la solución de prueba (b) la banda correspondiente al interferón beta-1a sin glicosilar, no es más intensa que la banda

principal del electroferograma obtenido con la solución de prueba (e) que corresponde al 2.0 %.

- Cualquier otra banda correspondiente a una impureza de una masa molecular menor que el interferón beta-1a, aparte de la banda que corresponde al interferón beta-1a subglicosilado, no es más intensa que la banda principal obtenida con la solución de prueba (f) que corresponde al 1.0 %.

INTERFERÓN BETA-1a OXIDADO. No más del 6.0 %.

Usar el cromatograma obtenido con la solución de prueba en la prueba de identidad C (mapeo de péptidos y cromatografía de líquidos). Localizar los picos debidos a la fragmentación del péptido que comprende de los aminoácidos 34 a 45 y su forma oxidada usando el cromatograma del interferón beta-1a oxidado digerido que se suministra con el interferón beta-1a de referencia.

Calcular el porcentaje de oxidación del interferón beta-1a usando la siguiente ecuación:

$$\text{INF Oxidado} = \left(\frac{A_{34-45ox}}{A_{34-45} + A_{34-45ox}} \right) 100$$

Donde:

$A_{34-45ox}$ = área del pico correspondiente al fragmento oxidado del péptido 34 – 45.

A_{34-45} = área del pico correspondiente al fragmento del péptido 34 – 45.

PROTEÍNAS DERIVADAS DE LA CÉLULA HOSPEDERA. No más de 0.6 mg/mL conforme al método validado por el fabricante.

CONTENIDO DE ADN DERIVADO DEL VECTOR O DE LA CÉLULA HOSPEDERA. No más de 100 pg/44µg de proteína, conforme al método validado por el fabricante.

SECUENCIA N-TERMINAL. Determinar la secuencia de la región N-terminal conforme al método validado por el fabricante.

ENDOTOXINAS BACTERIANAS. MGA 0316. Menos de 0.7 UE en el volumen que contenga 1×10^6 UI de interferón beta-1a, si se usa para producción de preparaciones parenterales, sin un procedimiento posterior para la remoción de endotoxinas.

CONTENIDO DE INTERFERÓN BETA-1a. MGA 0241, CLAR. Prepare tres diluciones diferentes para cada solución.

Fase móvil A. Solución de ácido trifluoroacético al 0.1 % v/v.

Fase móvil B. Adicionar a 300 mL de agua 1.0 mL de ácido trifluoroacético para cromatografía y diluir a 1 000 mL con acetonitrilo para cromatografía.

Solución de prueba. Diluir la preparación de interferón beta-1a a ser analizada para obtener una concentración de 100 µg/mL.

Solución de referencia. Disolver el contenido de un vial del interferón beta-1a de referencia para obtener una concentración de 100 µg/mL.

Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 214 nm.

Precolumna de 2 cm x 2.1 mm con fase estacionaria butil-sililsilica gel para cromatografía (5 µm) con tamaño de poro de 30 nm.

Columna de 25 cm x 2.1 mm con fase estacionaria butil-sililsilica gel para cromatografía (5 µm) con tamaño de poro de 30 nm. Velocidad de flujo de 0.2 mL/min.

Inyección: 50 µL

Aptitud del sistema. Utilizar la solución de referencia. El tiempo de retención del Interferón beta-1a es alrededor de 20 min. El factor de simetría es de 0.8 a 2.0 para el pico correspondiente al interferón beta-1a.

Repetitividad: Coeficiente de variación del 3.0 % entre las áreas de los picos obtenidos con tres diluciones independientes.

Tabla 4. Gradiente para mapeo de péptidos.

Tiempo (min)	Fase móvil A (% v/v)	Fase móvil B (% v/v)
0 – 20	100 → 0	0 → 100
20 – 25	0	100
25 – 26	0 → 100	100 → 0
26 – 40	100	0

Calcular el contenido de interferón beta-1a (C₉₀₈H₁₄₀₆N₂₄₆O₂₅₂S₇) considerando el contenido asignado a la referencia del interferón beta-1a C₉₀₈H₁₄₀₆N₂₄₆O₂₅₂S₇.

ALMACENAMIENTO. En un recipiente cerrado hermético al aire, protegido de la luz, a temperaturas inferiores a 70 °C bajo cero. Si el producto es estéril, almacénese en un recipiente estéril cerrado y hermético al aire.

ETIQUETADO. La etiqueta debe contener:

- El contenido de interferón beta-1a en miligramos por mililitro.
- La actividad antiviral en UI por mililitro.
- Cuando aplique que el producto es adecuado para ser utilizado en la producción de preparaciones parenterales.

MEDICAMENTO BIOTECNOLÓGICO INTERFERON BETA-1a

DESCRIPCIÓN

La solución es clara o ligeramente opalescente, incolora o ligeramente amarilla y libre de partículas extrañas visibles. El liofilizado, es polvo de color blanco o ligeramente amarillo.

Aspecto de la solución. MGA 0121. Claridad y grado de opalescencia. Para soluciones claras: no más intensa que la suspensión de referencia I. Para soluciones opalescentes: no más intensa que la suspensión de referencia II.

Color de la solución. MGA 0181. No más intensa que la solución de referencia B9 o no más que la solución de referencia Y6.

ENSAYOS DE IDENTIDAD

Debe aplicarse una de las siguientes alternativas, comparando con una preparación de referencia.

Alternativa 1: A y B.

Alternativa 2: A y C.

A. MPB 0700, Actividad biológica. Presenta actividad biológica.

B. MGA 0311, Inmunoidentificación por Western Blot. Debe observarse en el electroferograma de la muestra, una banda principal con la misma posición que el estándar.

C. MGA 0241, CLAR. El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la muestra debe corresponder con la preparación de referencia.

PUREZA. Realizar un gel como se describe en el apartado de pureza del biofármaco. Transferir a una membrana adecuada y realizar una inmunodetección con un anticuerpo específico para el interferón beta-1a.

- En el electroferograma obtenido con la solución de prueba (c) la banda correspondiente al interferón beta-1a subglicosilado, no es más intensa que la banda principal del electroferograma obtenido con la solución de prueba (e) que corresponde al 5.0 %.
- En el electroferograma obtenido con la solución de prueba (b) la banda correspondiente al interferón beta-1a sin glicosilar, no es más intensa que la banda principal del electroferograma obtenido con la solución de prueba (e) que corresponde al 2.0 %

DÍMEROS Y SUSTANCIAS RELACIONADAS DE MAYOR PESO MOLECULAR. Determinar conforme al método validado por el fabricante. Menor o igual a 0.8 % para interferón beta-1a, vía de administración intramuscular y menor o igual a 3.0 % para vía de administración subcutáneo.

INTERFERÓN BETA-1a OXIDADO. Se podrá utilizar cualquiera de los siguientes métodos descritos en la producción del interferón beta-1a (solución concentrada) de esta monografía, validado por el fabricante. No más del 6.0 %.

PROTEÍNAS TOTALES. MGA 0241, CLAR. Como se describe en la producción del interferón beta-1a (solución concentrada) de esta monografía, validado por el fabricante. De 54 a 69 µg/mL para la vía de administración intramuscular.

ESTERILIDAD. MGA 0381. Cumple los requisitos.

ENDOTOXINAS BACTERIANAS. MGA 0316.

Vía de administración subcutánea entre 10 y 30 UE por 0.5 mL.

Vía de administración intramuscular entre 10 y 48 UE por 0.5mL.

Nota: la especificación en UE dependerá de la presentación del medicamento biotecnológico.

AGUA. MGA 0041, *Titulación directa.* No más del 4.0 %.

pH. MGA 0701. Entre 3.4 a 4.4 (vía de administración subcutánea) y entre 4.5 a 5.1 (vía de administración intramuscular).

OSMOLALIDAD. Entre 250 y 450 mOsm/kg después de la disolución.

VARIACIÓN DE VOLUMEN. MGA 0041. El volumen de la jeringa debe estar entre 0.50 y 0.55 mL.

POTENCIA. MPB 0700. No menos de 80 % y no más de 125 % de lo indicado en el marbete, de 22 µg, 44 µg, 66 µg (subcutáneo, 6 MUI, 12 MUI y 18 MUI respectivamente) y de 30 µg (intramuscular, 6 MUI).

Nota: la especificación en MUI dependerá de la presentación del medicamento biotecnológico.

CONSERVACIÓN. Entre 2y 8 °C.