

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Con fundamento en el numeral 4.11.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2010, se publica el presente proyecto a efecto 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, DF Fax: 5207 6890
Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

MONOGRAFÍA NUEVA

FACTOR VII ACTIVADO DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA HUMANA RECOMBINANTE (ADNr)

DEFINICIÓN

El factor VIIa (ADNr) es una glicoproteína, que tiene la misma secuencia de aminoácidos (406 aminoácidos) y puentes disulfuro como el factor VIIa de la coagulación humana. Es una molécula de 2 cadenas, obtenida por ruptura proteolítica de los péptidos que unen Arg 152 e Ile 153 de la cadena simple del factor VII de la coagulación. Consiste de una cadena ligera de 20 kDa (terminal-N) y de una cadena pesada de 30 kDa (terminal-C) conectadas por una unión disulfuro. El factor VIIa (ADNr) de la coagulación humana es estructuralmente similar al de origen plasmático, se distingue de este en términos de su modificación post-translacional, incluyendo el patrón de glicosilación.

FABRICACIÓN

El factor VIIa (ADNr) de la coagulación humana es producido en células renales de hamster recién nacido por un método basado en la tecnología recombinante del ADN.

El factor VIIa recombinante (ADNr) purificado, puede contener albúmina humana u otros agentes estabilizadores, así como sustancias auxiliares para el ajuste adecuado del pH y de la osmolalidad. La albúmina adicionada cumple con los requisitos de la materia prima para elaborar hemoderivados, que se señalan a principio del capítulo de Hemoderivados.

GRANEL FINAL

Previo a la liberación, las siguientes pruebas deben llevarse a cabo en cada lote del producto.

Proteínas derivadas de células del hospedero. El límite será aprobado por la autoridad competente.

ADN derivado de células del hospedero y del vector. El límite será aprobado por la autoridad competente.

PRODUCTO TERMINADO

DESCRIPCIÓN. El liofilizado se presenta como un polvo blanco. Una vez reconstituida la solución es incolora.

ENSAYOS DE IDENTIDAD

A. La prueba de potencia se utiliza como ensayo de identidad.

B. Análisis de glicanos. El cromatograma obtenido con la solución de prueba corresponde con el cromatograma de la solución de referencia.

C. Mapeo peptídico

Preparación de referencia del fabricante, ruptura selectiva de las uniones peptídicas

Solución A. Disolver 0.74 g de cloruro de calcio y 6.06 g de tris (hidroximetil) aminometano en 1 000 mL de agua y ajustar a pH 7.5 con ácido clorhídrico.

Solución de prueba. Diluir la preparación a ser examinada con solución A para obtener una concentración cerca de 1.5 mg/mL. Desalinizar un volumen de la solución por un método disponible (por ejemplo usando una centrífuga con unidad de filtro o una columna de filtración en gel con solución A como solución amortiguadora de elusión). Tras desalinizar, la concentración debe ser de 1.0 mg/ml. Transferir la solución anterior desalinizada a un tubo de polipropileno. Preparar una solución de 1 mg/mL de tripsina para mapeo de péptido y añadir 10 µL a 1 mL de la solución desalinizada. Tapar el tubo y mezclar suavemente por inversión. Incubar a 37 °C durante 24 h. A las 5.5 h, añadir 10 µL de solución de tripsina. Retirar la muestra de la incubación y mantenerla a temperatura ambiente, añadir 9 µL de ácido acético glacial y mezclar por inversión. La solución debe mantenerse a 15 °C bajo cero o menos hasta la separación cromatográfica. Analizar inmediatamente usando un inyector automático, manteniéndola entre 2 y 8 °C.

Solución de referencia. Disolver el factor VIIa de la coagulación humana (ADNr) en la solución A para obtener una concentración de 1.5 mg/mL. Desalinizar y digerir al mismo tiempo y de la misma manera que la solución de prueba.

Método. Cromatografía de líquidos MGA 0241, Separación Cromatográfica.

Columna de 25 cm x 4.0 mm, empacada con gel de sílice octadecil silano de 5 µm y tamaño de poro de 30 nm;

temperatura 30 °C, con velocidad de flujo 1.0 mL/min; el volumen de inyección es de 25 µL; usar para la detección un espectrofotómetro a una longitud de onda de 215 nm.

Fase móvil

Fase móvil A. Agregar 0.65 mL de ácido trifluoroacético a 1000 mL de agua y desgasificar;

Fase móvil B. Mezclar 0.5 mL de ácido trifluoroacético, 100 mL de agua y 900 mL de acetonitrilo para cromatografía y desgasificar.

Tiempo (min)	Fase móvil A (por ciento V/V)	Fase móvil B (por ciento V/V)
0 – 100	100 → 50	0 → 50
100 – 105	50 → 0	50 → 100
105 – 110	0	100
110 - 110.1	0 → 100	100 → 0
110.1 – 125	100	0

APTITUD DEL SISTEMA. El cromatograma obtenido con la solución de referencia es similar al cromatograma obtenido con el factor VIIa humano de la coagulación (ADNr).

El cromatograma obtenido con la solución de prueba corresponde al cromatograma obtenido con la solución de referencia; Todos los picos principales del cromatograma de la solución de referencia están presentes en el cromatograma de la solución de prueba; No hay nuevos picos principales en el cromatograma obtenido con la solución de prueba comparados con el cromatograma de la solución de referencia.

POTENCIA. MPB 0400. La potencia es de 44 000 UI a 64 000 UI/mg de proteínas. El producto es capaz de lograr la coagulación en presencia de plasma deficiente de factor VII. La potencia estimada es del 80 por ciento de la actividad declarada. El intervalo de confianza (IC = 0.95) no excede los límites del 80 al 125 %, de la potencia estimada.

Método. Usar un analizador de la coagulación adecuado o realizar el ensayo con tubos de incubación y reactivos mantenidos en baño de agua a 37 °C.

Solución A. Preparar una solución que contiene 15.12 g/L de ácido 1,4-piperazinodietanosulfónico, 5.73 g/L de cloruro de sodio, 0.74 g/L de edetato de sodio y 10 g/L de albúmina bovina; ajuste a pH 7.2 con hidróxido de sodio.

Prepare 3 diferentes soluciones de la preparación a ser examinada y de la preparación de referencia, diluyendo con la solución A, hasta obtener concentraciones dentro del rango de linealidad (0.002-0.15 UI/mL). Preparar por duplicado y usar las soluciones inmediatamente.

A 40 µL de cada solución, agregar 40 µL de plasma deficiente de factor VII, incubar por el tiempo necesario a 37 °C, y agregar 40 µL de solución de factor tisular humano.

Medir el tiempo de coagulación, es decir el intervalo transcurrido entre la adición de la solución de factor tisular humano y el primer indicio de la formación de fibrina.

Nota: los volúmenes y la secuencia de los reactivos señalados en el párrafo anterior pueden ser adaptados acorde a la solución de factor tisular humano y al aparato utilizado.

Calcular la actividad en UI/mg usando un método estadístico apropiado, por ejemplo modelo de líneas paralelas (ver capítulo de *Estadística para ensayos biológicos*)

La actividad biológica es evaluada por comparación de la curva dosis-respuesta de la preparación en prueba contra la de una preparación de referencia calibrada en Unidades Internacionales (La UI es la actividad contenida en una cantidad establecida de la preparación de referencia internacional). La equivalencia en UI de la preparación de referencia internacional es la establecida por la Organización Mundial de la Salud.

Los límites de confianza (P = 95 %) están en el intervalo de 80 % al 125 % de la potencia estimada.

PROTEÍNAS. Entre 1.11 y 1.78 mg/mL. MGA 0241, Cromatografía líquida de exclusión de tamaño. Se realiza como se describe en la prueba de Dímeros y sustancias relacionadas de alta masa molecular, con las siguientes modificaciones:

Inyección: 10 µL, 20 µL y 30 µL de la solución de referencia. Graficar las áreas de los picos contra el contenido de proteína inyectado y elabore la regresión lineal para crear una curva estándar.

Calcular el contenido de factor de coagulación humana VIIa (ADNr) usando el área del pico del monómero del cromatograma obtenido con la solución de prueba y tomando en cuenta el contenido asignado de factor de coagulación humana VIIa (ADNr) S Ref.

APTITUD DEL SISTEMA. Para la repetibilidad la desviación estándar relativa máxima es del 2.0 % tras 5 inyecciones de 20 µL de la solución de referencia, y el coeficiente de correlación calculado para la curva estándar (r²) no es menor a 0.990.

DEGRADACIÓN DE CADENAS PESADAS Y FORMAS OXIDADAS DEL FACTOR DE COAGULACIÓN HUMANA VIIa (ADNr)

Solución de prueba. Disolver el producto en agua hasta obtener una concentración de 1.5 mg/mL.

Solución de referencia. Disolver el factor de coagulación humana VIIa (ADNr) S Ref en agua para obtener una concentración de 1.5 mg/mL.

MGA 0241 Cromatografía de líquidos.

Condiciones del equipo. Columna de 25 cm x 4.0 mm, empacada con gel de sílice butilsilano de 5µm y tamaño de poro de 30 nm; temperatura entre 60 °C a 70 °C, con velocidad de flujo de 1.0 mL/min; el volumen de inyección es de 20 µL, usar un inyector automático mantenido de 2 °C a 8 °C; para la detección se utiliza un espectrofotómetro a una longitud de onda de 214 nm.

Fase móvil

Fase móvil A. Mezclar 1 mL de ácido trifluoroacético y 999 mL de agua, y desgasificar

Fase móvil B. Mezclar 1 mL de ácido trifluoroacético, 200 mL de agua y 800 mL de acetonitrilo para cromatografía y desgasificar.

Tiempo (min)	Fase móvil A (Porcentaje V/V)	Fase móvil B (Porcentaje V/V)
0 – 30	54 → 41	46 → 59
30 – 33	41 → 0	59 → 100
33 – 38	0	100
38 – 40	0 → 54	100 → 46

Tiempo de retención: aproximadamente 26 min para el factor de coagulación humano VIIa (ADNr).

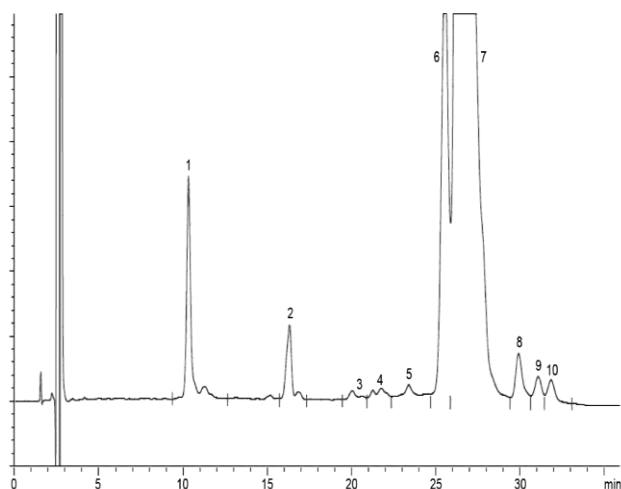


Fig. 1 Cromatograma de la Solución de referencia para la prueba de degradación de cadena pesada y formas oxidadas del factor de coagulación VIIa (ADNr).

- | | | | | |
|----------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1. Cadena pesada degradada | 2. Cadena pesada degradada | 3. Forma oxidadada | 4. Forma oxidadada | 5. Forma oxidadada |
| 6. Cadena pesada degradada | 7. Factor VIIa (ADNr) | 8. Desconocido | 9. Desconocido | 10. Desconocido |

APTITUD DEL SISTEMA. El cromatograma obtenido con la solución de referencia corresponde al cromatograma mostrado en la Figura 1; los picos 1 al 10 son claramente visibles; y la razón pico-valle es de mínimo 1.5, donde A_p = altura sobre la línea base del pico 6 y A_v = Altura sobre la línea base del punto más bajo de la curva entre el pico 6 y el pico 7. El cromatograma obtenido con la solución de prueba corresponde al cromatograma obtenido con la solución de referencia.

Calcular el área porcentual individual (respecto al área total del pico) de los picos debidos a la degradación de cadena pesada del factor de coagulación humana VIIa (ADNr) (picos 1, 2 y 6) y de las formas oxidadas del factor de coagulación humana VIIa (ADNr) (picos 3, 4 y 5). La suma de las formas

degradadas de la cadena pesada es de máximo 11 %, y la suma de las formas oxidadas es máximo 2.2 %.

Gla-RESIDUOS DEL FACTOR DE COAGULACIÓN HUMANA VIIa (ADNr) (GAMMA-CARBOXILACIÓN).

Solución de prueba. Diluir la preparación a examinar en agua para obtener una concentración de 1.5 mg/mL.

Solución de referencia. Disolver factor de coagulación humana VIIa (ADNr) S Ref en agua para obtener una concentración de 1.5 mg/mL.

MGA 0241 Cromatografía de líquidos.

Condiciones del equipo. Requiere el uso de una precolumna empacada con copolímero de estireno – divinilbenceno con grupos iminodiacéticos, para la remoción de calcio. La columna es de 25 cm x 4.0 mm, empacada con resina para cromatografía de intercambio iónico fuertemente básica; temperatura de 25 °C, con velocidad de flujo de 1.0 mL/min; el volumen de inyección es de 100 µL, usar un inyector automático mantenido de 2 °C a 8 °C; para la detección se utiliza un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm.

Fase móvil

Fase móvil A. Solución con 1.2 g/L de tris (hidroximetil) aminometano y 2.8 g/L de bis-tris propano, ajustada a pH 9.4 con ácido acético glacial y desgasificada.

Fase móvil B. Solución con 1.2 g/L de tris (hidroximetil) aminometano, 2.8 g/L de bis-tris propano y 107.9 g/L de acetato de amonio, ajustada a pH 9.4 con amoniaco concentrado y desgasificada.

Tiempo (min)	Fase móvil A (Porcentaje V/V)	Fase móvil B (Porcentaje V/V)
0 - 2.5	100	0
2.5 - 27.5	100 → 0	0 → 100
27.5 - 30.5	0 → 100	100 → 0

APTITUD DEL SISTEMA. Usando la solución de referencia, la separación en la línea base entre el pico del Gla-residuo y el conjunto de picos del factor de coagulación humana VIIa (ADNr) es de máximo 6.1 %.

El tiempo de retención de los Gla-residuos del factor de coagulación humana VIIa (ADNr) es de aproximadamente 0.7 con respecto al factor de coagulación humana VIIa (ADNr), cuyo tiempo de retención es de aproximadamente 14 min.

ANÁLISIS DE GLICANOS

El análisis de glicanos incluye las siguientes etapas:

- Tras desalinizar, liberación de los glicanos.
- Marcado de los glicanos con un marcador fluorescente adecuado.

- Análisis de las glicanos marcados por cromatografía de líquidos con detección fluorométrica.

Método. Pueden usarse los siguientes procedimientos:

Solución de prueba. Diluir la preparación a ser examinada en agua para obtener una concentración de 1.5 mg/mL.

Solución de referencia. Disolver factor de coagulación humana VIIa (ADNr) S Ref a una concentración de 1.5 mg/mL.

DESALINIZADO. Desalinizar la solución de prueba y la solución de referencia como se describe en el método B de la prueba de Identidad. La solución amortiguadora para la desalinización y la elución es una solución con 1.21 g/L de tris (hidroximetil) aminometano ajustada a pH 7.5 con ácido clorhídrico. Tras desalinizar, la concentración de las soluciones es de aproximadamente 1.0 mg/mL.

LIBERACIÓN SELECTIVA DE LOS GLICANOS.

Transferir 500 µL de la solución de prueba desalinizada y 500 µL de la solución de referencia desalinizada a tubos de centrifugación separados, y agregar 10 µL de una solución con 200U/mL de péptido N-glicosidasa F R. Tapar los tubos e incubar por 16 a 24 horas a 37 °C. Remover la fracción proteica adicionando a los tubos 1.5 mL de etanol al 96 % a -20 °C. Mezclar y dejar reposar a -20 °C por 20 a 30 min. Centrifugar los tubos a 10 000 r/min durante 10 min. Recolectar el sobrenadante y evaporar hasta secar, usando por ejemplo un rotavapor.

MARCADO DE LOS GLICANOS. Marcar los glicanos libres con 2-aminobenzamida usando un procedimiento adecuado. El procedimiento emplea una combinación de reactivos optimizada y validada para el marcado eficiente de los glicanos, y es seguida por la extracción y recobro de los glicanos marcados por la reacción.

Condiciones del equipo. MGA 0241. Requiere el uso de una precolumna de 5 cm x 4.0 mm, empacada con Resina para cromatografía de intercambio iónico fuertemente básica. La columna es de 25 cm x 4.0 mm, empacada con resina para cromatografía de intercambio iónico fuertemente básica; temperatura de 30°C, con velocidad de flujo de 0.5 mL/min; el volumen de inyección es de 100 µL, usar un inyector automático mantenido de 2°C a 8°C; para la detección se utiliza un fluorímetro a una longitud de onda de 330 nm para excitación y 420 nm para emisión.

Fase móvil

Fase móvil A. Solución con 6 g/L de Hidróxido de sodio;

Fase móvil B. Solución con 40.8 g/L de acetato de sodio y 6 g/L de Hidróxido de sodio.

Tiempo (min)	Fase móvil A (Porcentaje V/V)	Fase móvil B (Porcentaje V/V)
0 – 52	100 → 35	0 → 65
52.0 - 52.1	35 → 0	65 → 100
52.1 – 65	0	100
65 - 65.1	0 → 100	100 → 0
65.1 – 90	100	0

APTITUD DEL SISTEMA. Usando la solución de referencia, el cromatograma obtenido corresponde al cromatograma mostrado en la Figura 2; los picos 1 al 12 son claramente visibles; y el ancho del pico a media altura es de máximo 30 s para el pico 8.

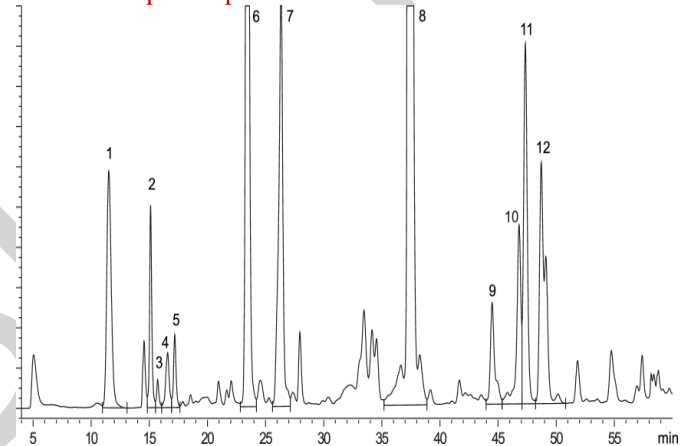


Fig. 2 Cromatograma de la Solución de referencia para la prueba de análisis de glicanos del factor de coagulación VIIa (ADNr).

Pico	Marcado	Estructura	Pico	Marcado	Estructura
1	No	Núcleo fucosilado biantenarico – no sialilado (2 terminales N-acetilgalactosamina)	7	Sí	Núcleo fucosilado biantenarico – mono sialilado (y 1 terminal galactosa)
2	No	Núcleo fucosilado biantenarico – no sialilado (terminal N-acetilgalactosamina y terminal galactosa)	8	Sí	Núcleo fucosilado biantenarico – bisialilado
3	No	Estructura no determinada	9	Sí	Estructura de oligomanosa con 1 grupo fosfato.
4	No	Núcleo fucosilado biantenarico – no sialilado (terminal N-acetilglucosamina y terminal galactosa)	10	Sí	Núcleo fucosilado triantenarico – trisialilado.
5	No	Núcleo fucosilado biantenarico – no sialilado (2 terminales galactosa)	11	Sí	Núcleo fucosilado triantenarico – trisialilado.
6	Sí	Núcleo fucosilado biantenarico – mono sialilado (y 1 terminal N-acetilgalactosa-mina)	12	Sí	Estructura no determinada.

Calcular el porcentaje del contenido de glicanos en la solución de referencia usando la siguiente ecuación:

$$\frac{A}{A + B} * 100$$

A = Suma del área de los picos correspondientes a los glicanos cargados (picos 6 al 12).

B = Suma del área de los picos correspondientes a los glicanos no cargados (Picos 1 al 5).

El porcentaje de glicanos marcados cumple con lo autorizado por la autoridad competente.

DÍMEROS Y SUSTANCIAS RELACIONADAS DE ALTA MASA MOLECULAR

Solución de prueba. Diluir la preparación a ser examinada en agua para obtener una concentración de aproximadamente 1.5 mg/mL.

Solución de referencia. Disolver factor de coagulación humana VIIa (ADNr) S Ref en agua para una concentración de 1.5 mg/mL.

MGA 0241 Cromatografía de líquidos por exclusión de Tamaño.

Condiciones del equipo. La columna es de 30 cm x 7.5 mm, empacada con gel de sílica hidrofílica para cromatografía de 10 µm de un grado adecuado para el fraccionamiento de proteínas globulares en el rango de masa molecular de 10 000 a 500 000; temperatura de 21°C a 25°C, con velocidad de flujo de 0.5 mL/min; el volumen de inyección es de 20 µL, usar un inyector automático mantenido de 2°C a 8°C; para la detección se utiliza un espectrofotómetro a una longitud de onda de 215 nm.

Fase móvil. Disolver 26.4 g de sulfato de amonio en aproximadamente 900 mL de agua. Ajuste el pH primero a 2.5 con ácido fosfórico y luego a pH 7.0 con trietilamina. Agregar 50 mL de 2-propanol y llevar a 1000 mL con agua.

APTITUD DEL SISTEMA. Usando la solución de referencia, el factor de simetría para el pico del monómero es mínimo 1.3, y la razón pico a valle es mínimo 1.1, donde A_p = Altura sobre la línea base del pico de los dímeros y A_v = Altura sobre la línea base del pico más bajo de la curva que separa a éste pico del pico de monómero.

La suma de las áreas de los picos con tiempo de retención menor al pico del monómero es de máximo 2.7 %.

FACTOR VII INACTIVADO (ADNr) (CADENA SENCILLA). **MGA 0311.** El factor de la cadena sencilla de factor VII inactivado (ADNr) es máximo 3 %.

SOLUBILIDAD. Fácilmente soluble en agua. Para su preparación adicionar lentamente al producto la cantidad de agua inyectable indicada en la etiqueta, a temperatura entre 20 y 30 °C. Mezclar por rotación evitando la formación de espuma. El producto se disuelve por completo antes de 30 min.

ESTERILIDAD. **MGA 0381.** Cumple los requisitos.

ENDOTOXINAS. **MGA 0316.** Menor de 10 UI/mL.

PIROGENOS. **MGA 0711.** Cumple los requisitos. Inyectar un volumen equivalente a 50 UI/kg de peso del conejo.

HUMEDAD. **MGA 0041.** No más de 5.5 % de contenido de agua en el liofilizado.

pH. **MGA 0701.** Entre 5.2 y 6.5 en el producto reconstituido.

CADUCIDAD. De acuerdo a estudios de estabilidad validados por el fabricante y aceptados por la *Autoridad Sanitaria*.

CONSERVACIÓN. Conservar en refrigeración entre 2 y 8 °C, protegido de la luz. No debe congelarse.

En los casos de que el fabricante demuestre la estabilidad del producto ante la Secretaría de Salud a una temperatura no mayor de 30 °C, podrá indicarse; *consérvase a temperatura ambiente a no más de 30 °C y protegido de la luz*. Ya reconstituido es estable en almacenamiento a 25 °C hasta por 24 h. No debe congelarse.

ETIQUETADO

1. Contenido de factor VIIa (ADNr), en miligramos por mililitros.
2. Actividad específica, en unidades internacionales por miligramos de proteína.
3. Estabilizador utilizado.
4. No se debe usar si no se reconstituye completamente.
5. El contenido se debe usar sólo una vez.
6. Tipo de diluyente y volumen usado para la reconstitución.