

Epoetina

Tipo de Publicación	Boletín de Revisión, Aplazamiento
Fecha de Publicación	27-abr-2018
Fecha Oficial	01-may-2018
Comité de Expertos	Monografías 2 de Productos Biológicos—Proteínas
Motivo de la Revisión	Cumplimiento

De conformidad con las Reglas y Procedimientos del Consejo de Expertos 2015–2020, el Comité de Expertos en Monografías 2 de Productos Biológicos—Proteínas ha pospuesto la monografía de Epoetina.

La USP ha recibido comentarios con respecto a la implementación de la monografía. Para resolver estas inquietudes se requerirá de aportes adicionales de las partes interesadas. Se invita a las partes interesadas a ponerse en contacto con la USP para recibir información adicional sobre este tema y para participar en el diálogo acerca del desarrollo de los estándares USP de Epoetina.

El Boletín de Revisión de Epoetina pospone la implementación de la monografía oficial vigente. El Boletín de Revisión será incorporado en USP42-NF37.

Para cualquier pregunta, por favor contactar a Kevin Carrick, Director, Science and Standards, Science—Global Biologics (301-230-6349 o klc@usp.org).

Cambio en la redacción:

▲Epoetina

•(Pospuesto el 01-may-2018)• (BR 01-may-2018)

APRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTTGCA EHCSLNENIT VPDTKVNFYA
WKRMEVGGQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS
GLRSLTTLR ALGAQKEALS PDAASAAPL RTITADTRK LFRVYSNFLR
GKLLKLYTGEA CRTGD

C₈₀₉H₁₃₀₁N₂₂₉O₂₄₀S₅ 18 236,06 Da (secuencia de aminoácidos)

DEFINICIÓN

La Epoetina es la forma recombinante de la eritropoyetina humana. Es una glicoproteína de 165 aminoácidos fabricada usando tecnología de ADN recombinante. La presencia de impurezas, ADN de células huésped y proteína de células huésped en la Epoetina es específica del proceso y se controla mediante el proceso de purificación. Los niveles de impurezas se determinan mediante métodos validados y límites aprobados por la autoridad reguladora competente. Tiene una potencia de no menos de 140 000 y no más de 200 000 unidades internacionales (UI) por unidad de absorbancia (UA) a 280 nm.

IDENTIFICACIÓN

- **A. VALORACIONES BIOLÓGICAS DE ERITROPOYETINA (124):**
Cumple con los requisitos.
- **B. MAPEO DE PEPTIDOS**
Solución A: Ácido trifluoroacético y agua (1,5: 1000)
Solución B: Acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua (900: 1,2: 100)
Fase móvil: Ver la *Tabla 1*.

Tabla 1

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	90	10
30,0	78	22
110,0	58	42
130,0	35	65
130,1	10	90
140,0	10	90
140,1	90	10

Solución salina amortiguadora de fosfato: Cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, fosfato ácido disódico 8,1 mM y fosfato diácido de potasio 1,47 mM

Solución amortiguadora A: Citrato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 100 mM de pH 6,9, que se prepara según se indica a continuación. Disolver 5,80 g de citrato de sodio dihidrato, 0,057 g de ácido cítrico y 5,84 g de cloruro de sodio en 800 mL de agua y mezclar. Ajustar con ácido clorhídrico a un pH de 6,9 y diluir con agua hasta 1 litro. Pasar a través de un filtro de nailon con un tamaño de poro de 0,2 µm.

Solución para detener la digestión: Clorhidrato de guanidina 8 M

Solución amortiguadora madre para digestión: Solución de tris(hidroximetil)aminometano 1,0 M. Ajustar con ácido clorhídrico a un pH de 7,3.

Solución madre de Lys-C: Disolver lisil endopeptidasa (Lys-C), que contenga aproximadamente 4,5 UA/mg, en *Solución amortiguadora madre para digestión* a una concentración final de 2 mg/mL. La caducidad de Lys-

C reconstituida es de 2 años a $-70 \pm 10^\circ$ y de 1 día a $5 \pm 3^\circ$.

Solución de Lys-C para digestión: Agregar 20 µL de *Solución madre de Lys-C* a 180 µL de *Solución amortiguadora madre para digestión*. La caducidad es de 1 día cuando se almacena en hielo o a $5 \pm 3^\circ$.

Solución estándar: 100 µg de ER Eritropoyetina USP en 50 µL de agua. Realizar un intercambio del amortiguador por la *Solución amortiguadora A* mediante un método adecuado. Agregar 5 µL de *Solución de Lys-C para digestión* a 50 µL de ER Eritropoyetina USP, con la solución amortiguadora intercambiada. Incubar a 37° durante 30 minutos. Agregar 50 µL de *Solución para detener la digestión* y mezclar.

Solución muestra: 100 µg de Epoetina en 50 µL de *Solución salina amortiguadora de fosfato*. Si fuera necesario, realizar un intercambio del amortiguador por la *Solución amortiguadora A*, mediante un método adecuado. Agregar 5 µL de *Solución de Lys-C para digestión*. Incubar a 37° durante 30 minutos. Agregar 50 µL de *Solución para detener la digestión* y mezclar.

Solución blanco: 50 µL de *Solución salina amortiguadora de fosfato*. Agregar 5 µL de *Solución de Lys-C para digestión*. Incubar a 37° durante 30 minutos. Agregar 50 µL de *Solución para detener la digestión* y mezclar.

Sistema cromatográfico

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

Modo: HPLC

Detector: UV 214 nm

Columna: 3,0 mm × 25 cm; relleno L7 de 5 µm

Temperatura de la columna: 30°

Velocidad de flujo: 0,2 mL/min

Volumen de inyección: 50 µL

Aptitud del sistema

Muestra: *Solución estándar*

Requisitos de aptitud: Deben observarse 10 picos principales, según se muestra en el cromatograma de referencia provisto con el lote de ER Eritropoyetina USP usado. El cambio en los tiempos de retención para cada uno de los picos 5; 8 y 9 es no más de 1,2 minutos, cuando se compara con la primera inyección en tres inyecciones repetidas. El cociente entre los porcentajes de altura relativa (RRH%) para cada pico 8 y pico 9 en las inyecciones de la *Solución estándar* debe estar entre 94%–106%.

Relación señal-ruido: No menos de 3 para el pico 6

Análisis

Muestras: *Solución estándar*, *Solución muestra* y *Solución blanco*

inyectar la *Solución blanco* después de cada inyección de la *Solución estándar*. Registrar el tiempo de retención y la respuesta (altura del pico) de cada uno de los 10 picos principales de la *Solución estándar* y de la *Solución muestra*.

Calcular el porcentaje de la altura relativa del pico (RH%) para el pico 8 y el pico 9, en comparación con el pico 5 para la inyección inicial de la *Solución estándar* y para la *Solución muestra* tomada:

$$\text{Resultado} = (r_u/r_s) \times 100$$

r_u = altura del pico 8 ó 9

r_s = altura del pico 5

Calcular el cociente RRH% para el pico 8 y el pico 9:

$$\text{Resultado} = (RH_x/RH_s) \times 100$$

RH_x = RH% del pico 8 ó 9 de la *Solución estándar*

RH_s = RH% del pico 8 ó 9 de la *Solución muestra*

Criterios de aceptación: El perfil cromatográfico de la inyección inicial de la *Solución muestra* es similar al de la *Solución estándar*. La diferencia absoluta entre los

2 Epoetina

tiempos de retención de los picos 5; 8 y 9 de la *Solución muestra* debe estar dentro de los 1,2 minutos en comparación con la inyección inicial de la *Solución estándar*. El RRH% para cada pico 8 y pico 9 de la *Solución muestra* debe estar entre 94%–106%, en comparación con la *Solución estándar* inicial. No deben presentarse picos nuevos con alturas mayores a la del pico 6 en la *Solución muestra* que no estén presentes en la inyección de la *Solución estándar*.

VALORACIÓN

• VALORACIONES BIOLÓGICAS DE ERITROPOYETINA (124)

Criterios de aceptación: Cumple con los requisitos. Tiene una potencia de no menos de 140 000 y no más de 200 000 UI/UA a 280 nm.

IMPUREZAS

• LÍMITE DE PROTEÍNAS DE ALTO PESO MOLECULAR

Fase móvil: Citrato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 100 mM de pH 6,9, que se prepara según se indica a continuación. Disolver 5,80 g de citrato de sodio dihidrato, 0,057 g de ácido cítrico y 5,84 g de cloruro de sodio en 800 mL de agua y mezclar. Ajustar con ácido clorhídrico a un pH de 6,9 y diluir con agua hasta 1 litro. Pasar a través de un filtro de nailon con un tamaño de poro de 0,2 µm.

Solución de aptitud del sistema: 2 mg/mL de ER Eritropoyetina USP en *Fase móvil*. Calentar a 80° durante 30 minutos y usar inmediatamente.

Solución muestra: 2 mg/mL de Epoetina

Sistema cromatográfico

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

Modo: HPLC

Detector: UV 230 nm

Columna: 7,8 mm × 30 cm; relleno L20

Temperaturas

Muestreador automático: 2°–8°

Columna: 25°

Velocidad de flujo: 1,0 mL/min

Volumen de inyección: 40 µL

Tiempo de corrida: 30 min

Aptitud del sistema

Muestra: *Solución de aptitud del sistema*

[NOTA—Los tiempos de retención relativos para el agregado es aproximadamente 0,7.]

Requisitos de aptitud: El tiempo de retención del monómero debe estar dentro de los 8–10 minutos para las inyecciones de la *Solución de aptitud del sistema*. Los tiempos de retención relativos para el dímero y el monómero son aproximadamente 0,9 y 1,0, respectivamente.

Desviación estándar relativa: La precisión del área del pico del monómero debe ser <2%.

Análisis

Muestra: *Solución muestra*

[NOTA—Acondicionar el *Sistema cromatográfico* con la *Solución estándar*. Inyectar la *Solución estándar* por duplicado antes, y una única inyección después (single bracket), de que se inyecten todas las *Soluciones muestra*.]

Registrar el cromatograma y medir las áreas del pico principal y de los picos que eluyen cerca del pico principal, excluyendo los picos de disolvente.

Criterios de aceptación: Las impurezas totales (agregados y dímero) deben ser no más de 0,1%.

PRUEBAS ESPECÍFICAS

• PERFIL DE N-GLICANOS

Solución A: Agua. Desgasificar antes de usar.

Solución B: Disolver 41,0 g de acetato de sodio anhidro en 900 mL de agua. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 1 litro y diluir con agua a volumen.

Pasar la solución a través de un filtro de membrana de nailon con un tamaño de poro de no más de 0,45 µm y desgasificar antes de usar.

Solución C: Agregar 26 mL de solución de hidróxido de sodio al 50% (p/p) a 900 mL de agua. Diluir la solución con agua a un volumen final de 1000 mL. Pasar la solución a través de un filtro de membrana de nailon resistente a soluciones alcalinas con un tamaño de poro de no más de 0,45 µm y desgasificar antes de usar.

Fase móvil: Ver la *Tabla 2*.

Tabla 2

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	Solución C (%)
0	80	10	10
15	80	10	10
70	60	30	10
94	0	90	10
99	0	90	10
105	0	10	90
110	0	10	90
111	80	10	10
130	80	10	10

Solución de marcado con 2-AB: Agregar 150 µL de ácido acético glacial a 350 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) y mezclar. Agregar 110 µL de la mezcla de ácido acético–DMSO a un tubo que contenga 5 mg de colorante marcador 2-aminobenzamida (2-AB) y mezclar. Transferir toda la mezcla de ácido acético/DMSO/2-AB a un tubo que contenga 6 mg de cianoborohidruro de sodio y mezclar. Usar inmediatamente y proteger de la luz.

Solución amortiguadora A: Citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 100 mM de pH 6,9. Disolver 5,80 g de citrato de sodio dihidrato, 0,057 g de ácido cítrico y 5,84 g de cloruro de sodio en 800 mL de agua y mezclar. Ajustar con ácido clorhídrico a un pH de 6,9 y diluir con agua hasta 1 litro. Pasar a través de un filtro de nailon con un tamaño de poro de 0,2 µm.

DTT 0,5 M: Agregar 77 mg de ditioneitol a 1 mL de agua y mezclar. Usar inmediatamente.

Solución amortiguadora de reacción enzimática:

Fosfato de sodio 0,5 M de pH 7,5

Solución estándar: Reconstituir 100 µg de ER Eritropoyetina USP en 50 µL de agua. Si fuera necesario, realizar un intercambio del amortiguador por la *Solución amortiguadora A* mediante un método adecuado. Transferir todo el contenido a un tubo de polipropileno de 1,5 mL (o equivalente). Agregar 12,0 µL de *Solución amortiguadora de reacción enzimática*, 2,5 µL de DTT 0,5 M y 38,5 miliunidades de la Unión de Bioquímica Internacional (IUB, por sus siglas en inglés) de péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F). [NOTA—1 unidad de PNGasa F se define como la cantidad de enzima requerida para catalizar la liberación de oligosacáridos N-ligados de 1,0 nmol de ribonucleasa B desnaturalizada por minuto a un pH de 7,5 a 37° y es igual a 1 miliunidad de la IUB.] Diluir con agua a un volumen final de 100 µL, mezclar y centrifugar brevemente. Incubar a 37° durante 30 minutos. Centrifugar la muestra brevemente, luego congelar en hielo seco durante al menos 5 minutos. Después de congelar la muestra, destapar el tubo y colocarlo en un concentrador centrífugo y poner en funcionamiento al vacío sin calor durante aproximadamente 70–80 minutos o hasta que esté completamente seco.

Agregar 5,0 µL de *Solución de marcado con 2-AB*, mezclar en un mezclador de vórtice, centrifugar brevemente e incubar a 60° durante 3 horas. Después de la incubación, agregar 120 µL de agua, mezclar en un mezclador de vórtice y centrifugar la muestra.

Eliminar el exceso de 2-AB usando una columna para microcentrífuga rellena con una cantidad apropiada de fase estacionaria G-10 de filtración en gel para desalinizar una muestra de 75–150 µL. Para preparar la resina, agregar 0,5 mL de agua a la columna para microcentrífuga y dejar que aumente su volumen durante 15 minutos. Centrifugar a velocidad máxima durante 5–10 segundos. Repetir el lavado y eliminar el agua residual. Aplicar los glicanos marcados, colocar la columna en la microcentrífuga y centrifugar a 200 × g durante 1 minuto. Aplicar el eluato obtenido a una segunda columna y repetir la centrifugación. Transferir el eluato obtenido de la segunda centrifugación a un vial para HPLC para su análisis.

Solución muestra: Preparar según se indica en la *Solución estándar* usando 100 µg de Epoetina.

Blanco: Agua

Sistema cromatográfico

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

Modo: HPLC

Detector: Fluorescencia (longitud de onda de emisión a 330 y 420 nm)

Columnas

Guarda columna: 4,0 mm × 5 cm; relleno L46 de 10 µm

Columna analítica: 4,0 mm × 25 cm; relleno L46 de 10 µm

Temperaturas

Columna: 25°

Muestreador automático: 2°–8°

Velocidad de flujo: 0,5 mL/min

Volumen de inyección: 25 µL

Aptitud del sistema

Muestras: *Solución estándar* y *Blanco*

Requisitos de aptitud: El porcentaje de interferencia de la inyección del *Blanco* debe ser <1% del área total de los picos de la *Solución estándar* inicial. El cromatograma de la *Solución estándar* debe ser consistente con el cromatograma de referencia provisto con el lote de ER Eritropoyetina USP usado, incluyendo la presencia de los picos 1–7. [NOTA—El pico 5 puede dividirse o presentar un hombro, pero debe ser consistente para todas las inyecciones de la *Solución estándar* de una corrida.]

Desviación estándar relativa: La precisión del área total integrada de los picos debe ser no más de 1,5%, *Solución estándar*.

Análisis

Muestra: *Solución muestra*

Calcular el área de los picos de cada uno de los tres grupos de picos, disialilados (2 N), trisialilados (3 N) y tetrasialilados (4 N) [NOTA—Referirse al cromatograma de referencia provisto con el lote de ER Eritropoyetina USP usado]:

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

r_U = suma de las respuestas de los picos para cada uno de los tres grupos de picos, disialilados (2 N), trisialilados (3 N) y tetrasialilados (4 N)

r_T = suma de las respuestas de todos los picos para los tres grupos de picos, disialilados (2 N), trisialilados (3 N) y tetrasialilados (4 N)

Criterios de aceptación: Los porcentajes de N-glicanos deben estar dentro de los siguientes intervalos.

2 N: 4,5%–6,0%

3 N: 18%–25%

4 N: 69%–77%

• **DISTRIBUCIÓN DE ISOFORMAS**

Solución para cátodos: Pesar 0,31 g de L-histidina y diluir con agua a un volumen final de 10 mL.

Solución para ánodos: Acido sulfúrico 0,2 N

Iniciador: Pesar 0,072 g de persulfato de potasio y diluir con agua a un volumen final de 10 mL.

Gel: Preparar un gel único horizontal usando una placa de dimensiones 265 mm × 128 mm × 3 mm, con un gel de 0,5 mm de espesor, que se prepara según se indica a continuación. Combinar 9,0 g de urea, 5,9 mL de acrilamida (30%), 2,4 mL de bisacrilamida (2%), 450 µL de anfolito 3-10 y 1,1 mL de anfolito 3-5. Diluir con agua hasta 28 mL, mezclar minuciosamente y pasar la solución a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm. Agregar 2 mL de *Iniciador* y mezclar mediante inversión. Transferir la solución al casete para moldeado de gel.

Solución fijadora: Preparar una solución que contenga 200 mL de una mezcla que contenga ácido tricloroacético al 60% (p/v) y ácido 5-sulfosalicílico al 17,5%, 100 mL de ácido acético glacial, 400 mL de metanol absoluto y 300 mL de agua.

Solución de lavado del gel: Preparar una solución que contenga 400 mL de metanol absoluto y 100 mL de ácido acético glacial. Diluir con agua hasta 1 litro.

Solución de tinción: Disolver 1,25 g de Azul Brillante Coomassie R-250 en 1 litro de *Solución de lavado del gel*. Pasar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm.

Solución decolorante: Preparar una solución que contenga 75 mL de metanol absoluto y 100 mL de ácido acético glacial. Diluir con agua hasta 1 litro.

Solución madre del estándar: 2 µg/µL de ER Eritropoyetina USP en agua

Solución estándar A: 0,13 µg/µL de ER Eritropoyetina USP, que se prepara diluyendo *Solución madre del estándar* en agua

Solución estándar B: 1,3 µg/µL de ER Eritropoyetina USP, que se prepara diluyendo *Solución madre del estándar* en agua

Solución muestra: 20 µg de Epoetina en 15 µL de agua

Sistema electroforético

Modo: Sistema electroforético horizontal con aparato de enfriamiento integrado capaz de mantener una temperatura de 2°–8°

Temperatura: Enfriar a 2°–8° antes de aplicar voltaje y mantener la temperatura durante la electroforesis.

Preenfoque: Preenfocar el gel durante 20–40 minutos a una potencia constante de 10 vatios (máximo de 3000 V y 50 mA).

Perfil de carga: Cargar 15 µL de *Solución estándar A*, *Solución estándar B* y *Solución muestra* en calles separadas del gel en el sitio del cátodo.

Enfoque: Enfocar el gel durante 2,5 horas a una potencia constante de 10 vatios (máximo de 3000 V y 50 mA).

Tinción: Incubar el gel en *Solución fijadora* dos veces, durante 15 minutos cada vez. Decantar e incubar el gel en *Solución de lavado del gel* durante por lo menos 30 minutos. Decantar e incubar el gel en *Solución de tinción* durante 15–60 minutos. Decantar y enjuagar el gel con *Solución decolorante*. Decantar e incubar el gel en *Solución decolorante* hasta que el fondo se torne transparente y se observe todavía la *Solución estándar A*.

4 Epoetina

Aptitud del sistema

Muestras: *Solución estándar A* y *Solución estándar B*
No se presenta ningún artefacto de tinción que interfiera con la visualización de las calles que contienen proteína y la ubicación e intensidad de las bandas son apropiadas en la *Solución estándar A* y la *Solución estándar B*. Se encuentran presentes las isoformas 10, 11, 12 y 13 en la *Solución estándar A* y la *Solución estándar B*. No se presentan bandas por debajo de la isoforma 9 en la *Solución estándar B*. Referirse a la imagen típica provista con el lote de ER Eritropoyetina USP usado.

Análisis

Muestra: *Solución muestra*

Escanear el gel con un densitómetro.

Usando los datos del escaneo densitométrico, calcular el porcentaje relativo de cada isoforma individual en la porción de *Solución muestra* tomada:

$$\text{Resultado} = (I/T) \times 100$$

I = intensidad de la banda individual

T = suma de las intensidades de todas las bandas en la *Solución muestra*

Criterios de aceptación: Las isoformas 10–13 deben estar presentes en los siguientes porcentajes.

Isoforma 13: No menos de 13%

Isoformas 12 + 13: 46%–72%

Isoformas 10 + 11: No más de 52%

Isoformas 10–13: No menos de 91%

Las isoformas 9 y 14 pueden estar presentes en la *Solución muestra*. No se observan isoformas por debajo de la isoforma 9 y cualquier banda menor presente en la *Solución muestra* también debe estar presente en la misma ubicación en la *Solución estándar B*. Referirse a la imagen típica provista con el lote de ER Eritropoyetina USP usado.

• CONTENIDO DE PROTEÍNA

Solución muestra: Epoetina, sin diluir

Blanco: Usar una solución amortiguadora apropiada consistente con la Epoetina en análisis.

Condiciones instrumentales

Modo: UV

Longitud de onda analítica: 280 nm

Celda: Cubeta de cuarzo

Análisis

Muestras: *Solución muestra* y *Blanco*

Calcular la concentración de proteína, en mg/mL, en la muestra tomada:

$$\text{Resultado} = (A/e) \times l$$

A = absorbancia a 280 nm, corregida por el *Blanco*

e = coeficiente de extinción, 0,74 mL/mg · cm⁻¹

l = longitud de paso (cm)

- **PRUEBAS DE ESTERILIDAD <71>:** Cumple con los requisitos.
- **PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS <85>:** Contiene no más de 2,5 Unidades USP de Endotoxina/mL.

REQUISITOS ADICIONALES

- **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO:** Conservar en envases de etileno propileno fluorado (FEP) o equivalentes, entre 2° y 8°. Proteger de la luz.
- **ETIQUETADO:** Etiquetar indicando que el material es producido mediante tecnología de ADN recombinante.
- **ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP <11>**

ER Eritropoyetina USP

• (Pospuesto el 01-may-2018) • (BR 01-may-2018) ▲ USP41