



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE TIOLES LIBRES EN FILGRASTIM
VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR FREE THIOLS QUANTIFICATION IN FILGRASTIM

A. Guillén-García¹, A.V. Hernández-Moreno², V. Pérez-Medina-Martínez², M.P. Miranda-Hernández², N.O. Pérez², C.A. López-Morales², L.F. Flores-Ortiz², F. Villaseñor-Ortega^{*1*}, E. Medina-Rivero^{2*}

¹Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y Antonio García Cubas s/n Celaya, Guanajuato, México. C.P.38010.

²Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed S.A. de C.V., Cruce de carreteras Acatzingo-Zumpahuacán s/n, Tenancingo, Estado de México, México. C. P. 52400.

Recibido 23 de diciembre de 2015; Aceptado 21 de abril de 2016

Resumen

Los puentes disulfuro son modificaciones postraduccionales que proporcionan estabilidad conformacional a las proteínas y son relevantes para sus funciones biológicas. En este estudio se validó el método colorimétrico para la cuantificación de tioles libres con el reactivo de Ellman para demostrar que el Filgrastim, contenido en el medicamento Filatil[®], muestra el mismo contenido de puentes disulfuro que su medicamento de referencia, tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes-reductoras. La validación del método demostró ser adecuado para su uso intencionado. El ejercicio de comparabilidad para este atributo entre los dos medicamentos mostró que no existen diferencias significativas ($p=1.000$; α , 0.05) en el contenido de cisteínas libres entre los dos productos evaluados. Estos resultados aportan evidencia de similitud para este atributo, que de manera colectiva con otras características fisicoquímicas que deben evaluarse en un ejercicio de comparabilidad extendido, contribuyen a la demostración de similitud entre las propiedades fisicoquímicas y funcionales, definidas como atributos críticos de calidad para Filgrastim de acuerdo con las guías emitidas por las agencias regulatorias.

Palabras clave: puentes disulfuro, tioles libres, reactivo de Ellman, filgrastim, biocomparabilidad.

Abstract

Disulfide bonds are post-translational modifications that provide conformational stability to proteins relevant to perform their biological functions. In this study, the quantification of free thiols by using Ellman's reagent was validated to demonstrate, that the Filgrastim contained in the Filatil[®] exhibits the same amount of disulfide bonds than its reference product under both native and denaturing-reducing conditions. The validation exercise demonstrated to be suitable for its intended use. The comparability exercise for this attribute showed no significant differences ($p=1.000$; α , 0.05) in free cysteines content among the two evaluated products. These results provide evidence of similitude for this attribute, which along with an extended comparability exercise for other physicochemical characteristics, contribute to the demonstration of similarity among the physicochemical and functional properties set as critical quality attributes for Filgrastim according to the regulatory guidelines.

Keywords: disulfide bond, free thiols, Ellman's reagent, filgrastim, biosimilarity.

1 Introducción

Desde mediados de la década de 1970s se comenzaron a desarrollar biofármacos que han sido evaluados y autorizados para el tratamiento de diferentes enfermedades crónicas y degenerativas. Entre estos biofármacos se encuentran proteínas recombinantes tales como hormonas, citocinas, anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión, sin

embargo, su asequibilidad en la mayoría de los casos está limitada por el presupuesto de los pacientes o de los sistemas de salud.

Con el vencimiento de las patentes de los medicamentos biotecnológicos innovadores a nivel mundial se han desarrollado medicamentos denominados biosimilares, los cuales han demostrado

* Autor para la correspondencia. E-mail: francisco.villasenor@itcelaya.edu.mx; emilio.medina@probiomed.com.mx

mediante la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, así como de estudios pre-clínicos y clínicos (European Medicines Agency, 2012; Food and Drug Administration, 2012) que son comparables al medicamento biotecnológico establecido como referencia por las entidades regulatorias (por lo general el medicamento innovador) en términos de calidad, seguridad y eficacia. En México estos medicamentos se denominan “medicamentos biotecnológicos biocomparables” (Diario Oficial de la Federación, 2013) mismos que han resultado ser una alternativa viable para extender la cobertura de salud ya que han promovido la disminución de los costos en los tratamientos.

En 2014 el subcomité de evaluación de productos biotecnológicos (SEPB) de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios de México (COFEPRIS) estableció guías a seguir para la demostración de biocomparabilidad de productos biotecnológicos que contienen Filgrastim (Secretaría de Salud, 2014); entre las pruebas analíticas requeridas para este fin, se incluye la determinación de la estructura a través del mapeo y evaluación de la integridad de los puentes disulfuro del fármaco, mediante la estimación de los tioles libres provenientes de las cisteínas no enlazadas.

La formación de puentes disulfuro es una modificación post-traducciona considerada como un atributo crítico de calidad, CQA por sus siglas en inglés, debido a que son indicativos de la estabilidad estructural de una proteína, la cual es crucial para que lleve a cabo su función biológica (Antonio-Pérez y col., 2014; Eon-Duval y col., 2012; Kosuri y col., 2012; Lara, 2011; Qin y col., 2015). La cuantificación de puentes disulfuro es una manera indirecta de verificar la adecuada conformación espacial durante la manufactura de una proteína de interés biofarmacéutico, así como para determinar posibles cambios estructurales que podrían ocurrir durante su tiempo de vida de anaquel. Dichos cambios estructurales llevarían a la modificación de la carga eléctrica y polaridad de la molécula, pudiendo inducir su agregación, así como la pérdida de su actividad biológica (Eon-Duval y col., 2012; González-Valdez y col., 2014; López-Morales y col., 2015; Zhang y col., 2012).

Una técnica espectrofotométrica comunmente usada para la determinación de tioles libres está basada en la reacción de Ellman (Ellman, 1959), cuyo principio se fundamenta en una reacción de óxido-reducción entre los tioles libres y el compuesto 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) o DTNB, que produce

1 mol de ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB) por cada mol de tioles libres (-SH). El anion TNB genera una coloración amarilla detectada a 412 nm de longitud de onda y que puede ser utilizada para cuantificar la cantidad de grupos -SH presentes en una proteína (Hermanson, 2013). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada como parte de la plataforma de métodos analíticos utilizados para caracterización de proteínas de interés farmacéutico, en el caso de Filgrastim se utiliza como prueba de identidad y de estabilidad estructural.

En el presente trabajo presentamos la validación de un método espectrofotométrico para la cuantificación de sulfhidrilos o tioles libres en la proteína recombinante humana Filgrastim conocida como factor humano estimulante de colonias de granulocitos (Lara, 2011), G-CSF, por sus siglas en inglés, que se prescribe para el tratamiento de la neutropenia crónica congénita o neutropenia de pacientes que han recibido quimioterapia. Esta molécula en su estado nativo contiene 2 puentes disulfuro y un grupo tiol libre (Hill y col., 1993; Levy y col., 2014). Una vez validado, este método se utilizó como parte de la batería de pruebas analíticas empleadas para demostrar la comparabilidad entre el medicamento Filatil® que contiene Filgrastim y su medicamento referencia.

2 Materiales y métodos

2.1 Reactivos y muestras

L-Cisteína HCl monohidratada grado biotecnológico y Reactivo de Ellman se obtuvieron de Thermo Scientific (Cincinnati, OH, USA). Azida de sodio, fosfato de sodio monobásico y dibásico fueron obtenidos de J. T. Baker (Center Valley, PA, USA). Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA), ditiotreitól (DTT), clorhidrato de guanidina (GdnHCl), dimetil sulfóxido (DMSO) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Estándar farmacopeico de Somatropina CRS (Lote 3.0, Código: S0947000, Id: 00VJY5) fue obtenido de la European Directorate for Quality of Medicines (Strasbourg, Francia). Filatil® (Filgrastim) lotes 1050160, 1048836, 1047460, Acetato de glatiramer (AG) lote AGPD14005 e Interferón β -1a (IFN β -1a) lote 03-0515-0218 fueron obtenidos de Probiomed S.A. de C.V. Neupogen® (Filgrastim) lotes 5432130402, 5432131005, 5432130804 fue obtenido de Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA, USA). Las columnas NAPTM-5 fueron obtenidas de GE Healthcare

(Buckinghamshire, UK). Las unidades de filtración para centrifuga Centricon® de 3 kDa fueron obtenidas de EMD Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2 Selección de controles

Se utilizó Acetato de Glatiramer (AG) como control negativo, ya que es un polipéptido sintético que no contiene cisteínas libres ni puentes disulfuro en su estructura (Ziemssen and Schrempf, 2007). Como control positivo en condiciones nativas se utilizó Interferón β -1a (IFN β -1a) debido a que en su estado nativo tiene una cisteína libre en su estructura (van Beers y col., 2011); mientras que para las condiciones desnaturizantes-reductoras se utilizó como control positivo Somatropina, rhGH por sus siglas en inglés, debido a que tiene dos puentes disulfuro en su estructura nativa, mismos que deberían reducirse bajo estas condiciones reductoras (Reh and Geffner, 2010).

2.3 Preparación de muestras

Se prepararon soluciones stock independientes de muestra problema, sustancia de referencia, control positivo y control negativo a una concentración de 10 mg/mL mediante filtración en unidades de filtración para centrifuga de 3 kDa con una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 8.0, previamente desgasificada.

2.4 Muestras para validación en condiciones nativas

A partir de las soluciones stock se prepararon, por sextuplicado, muestras a una concentración de 2.0 mg/mL de proteína en solución de fosfatos 100 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, previamente desgasificada.

2.5 Muestras para validación en condiciones desnaturizantes-reductoras

Se prepararon, por sextuplicado, muestras a una concentración de 0.5 mg/mL de proteína en solución de fosfatos 100 mM, EDTA 5 mM, GdnHCl 5 M, DTT 10 mM, previamente desgasificada. Las muestras se incubaron durante 15 min a 99 °C, posteriormente se eliminó el agente reductor (DTT) reemplazando la solución amortiguadora con una solución de fosfatos 100 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, previamente desgasificada, mediante columnas de exclusión molecular NAPTM-5.

2.6 Cuantificación de tioles libres por colorimetría

El sistema de reacción para la cuantificación de tioles de las muestras se llevó a cabo a una concentración final de 0.5 mM de DTNB; las muestras se incubaron durante 1 hora a 30 °C en agitación constante a 500 rpm (Pérez Medina Martínez y col., 2014). Finalmente, se realizaron lecturas de absorbancias en celdas de cuarzo QS de 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro Beckman DU640 a 412 nm.

2.7 Cálculos de razón molar Tioles/Proteína

Los tioles libres se calcularon, tanto para condiciones nativas como para desnaturizantes-reductoras, mediante una curva estándar del aminoácido L-cisteína en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 8.0. Las absorbancias de las muestras registradas a 412 nm fueron interpoladas en la curva de cisteínas. Cada cisteína contiene un grupo tiol, por lo que la cantidad de cisteínas se calcula con base en la cuantificación de tioles libres presentes en la muestra. Con base en lo anterior, en este trabajo la cantidad de cisteínas presentes en la molécula fue calculada como la relación de nanomoles de cisteínas que reaccionan con el DTNB (C) entre los nanomoles de proteína que se utilizaron en la cuantificación (P), es decir, como la razón molar (C/P) (Habeeb, 1972).

2.8 Validación del método de cuantificación de tioles libres por colorimetría

El método se validó considerando los atributos de medición sugeridos por las guías internacionales Q2(R1) de la Conferencia Internacional para la Armonización, ICH por sus siglas en inglés (International Conference on Harmonisation, 2005) como sigue:

Adecuabilidad del sistema

Se establecieron los siguientes criterios de aceptación:

1. El valor promedio de la razón molar (C/P) del sextuplicado de rhGH deberá ser 4.0 ± 0.5 en la condición desnaturizante-reductora.
2. El valor promedio de la razón molar (C/P) del sextuplicado de la muestra negativa (AG) deberá ser ≤ 0.05 .
3. El valor promedio del sextuplicado de la lectura de absorbancia a 412 nm del blanco deberá ser ≤ 0.01 Unidades de Absorbancia (UA).

4. La curva estándar de cisteína, deberá tener un valor de coeficientes de correlación (R^2) de ≥ 0.98 .
5. El coeficiente de variación (CV) de la razón molar (C/P) de las muestras deberá ser $\leq 15\%$ para la condición nativa y $\leq 12\%$ para las condición desnaturizante-reductor. Esto porque la cuantificación de cisteínas libres en estado desnaturizante-reductor es cinco veces mayor que en su estado nativo, lo que disminuye la dispersión de las mediciones.

Exactitud

Se determinó por la respuesta analítica de los controles positivos y estableciendo que la C/P deberá estar en un valor de 1.0 ± 0.5 para la condición nativa con Interferón β -1a; mientras que para la condición desnaturizante-reductor de 4.0 ± 0.5 empleando rhGH.

Precisión-repetibilidad

Se prepararon por sextuplicado la muestras problema y sustancia de referencia de Filgrastim a una concentración final de 2.0 y 0.5 mg/mL para la condición nativa y desnaturizante-reductor, respectivamente. El coeficiente de variación debe ser $\leq 15\%$.

Especificidad

Se analizaron blancos, controles positivos y negativos para evaluar la especificidad del método. Se esperaba una razón molar (C/P) promedio de acuerdo con la adecuabilidad del sistema: absorbancia de blancos menores a 0.01 UA en todas las condiciones, C/P de 4.0 ± 0.5 para rhGH en condición desnaturizante-reductor, C/P de 1.0 ± 0.5 para IFN β -1a en condición nativa, y C/P menor o igual a 0.05 para AG en todas las condiciones.

Linealidad

Se realizó una curva estándar por triplicado y de manera independiente, considerando 6 concentraciones de cisteínas, entre 3 y 200 μM . Se prepararon soluciones madre de cisteínas con 1.5 mM de L-Cisteína HCl monohidratada, a partir de las cuales se prepararon por dilución cada una de las concentraciones de la curva, para luego ser tratadas con DTNB y analizadas espectrofotométricamente a 412 nm. El criterio de aceptación fue coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.98$ y pendiente $\neq 0$, así como que la media de cada nivel de la curva se encontrara dentro del intervalo de confianza del $100 \pm 30\%$ para condición nativa, y dentro del $100 \pm 24\%$ para la curva estándar en condición desnaturizante-reductor. Esto, por la dispersión de las cuantificaciones de cisteínas,

que como ya se mencionó, se relaciona con el estado de plegamiento de la proteína.

Intervalo de medición

Se seleccionó el intervalo de medición en el cual se cumplen con los parámetros de linealidad con un coeficiente de variación menor al 15% para las condiciones nativas, y un CV menor al 12% para la condición desnaturizante-reductora.

Análisis estadístico y comparabilidad del atributo

Se analizaron por triplicado tres lotes de Filatil® y tres lotes de medicamento de referencia para la cuantificación comparativa de tioles libres en condiciones nativas. El análisis estadístico para determinar comparabilidad se realizó con el software JMP v.12.1.0. (SAS Institute Inc. Cary, NC) Primero se realizó una prueba inferencial probabilística de la homogeneidad de la varianza para el atributo de tioles libres en condición nativa medido con respecto de ambos productos, por la prueba de Levene. Posteriormente se realizó una prueba de t para medias con varianzas iguales con un nivel de confianza del 95% (α , 0.05) utilizada para evaluar la comparabilidad entre el medicamento de referencia y Filatil®.

3 Resultados y discusión

3.1 Validación del método

Linealidad

La linealidad del método se determinó con una curva estándar dentro de los intervalos previamente establecidos. El método de cuantificación de tioles libres demostró ser lineal en el intervalo de 3 μM a 200 μM de cisteína para el análisis de las

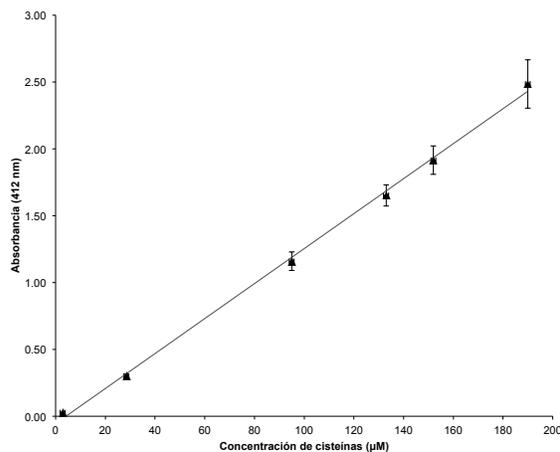


Fig. 1. Curva estándar de cisteínas para las condiciones nativa y desnaturizante-reductora.

Tabla 1. Resultados de validación del método analítico para cuantificación de tioles libres en Filgrastim.

Atributos de medición	Criterios de aceptación		Resultados del método	
	Nativa	DN-Reductora	Nativa	DN- Reductora
Precisión-Repetibilidad	CV <15%		SR: 6% MP:10%	SR:2% MP:2%
Linealidad	$R^2 \geq 0.98$ $m \neq 0$		0.99 0.0131	0.99 0.0125
Especificidad	La diferencia de C/P entre la MP y la SR < 0.5		SR: 1.4 MP: 1.4	SR: 4.6 MP: 4.4
	Lectura del blanco ≤ 0.01 UA		0.01	0.00
	C/P del control negativo ≤ 0.05		0.02	0.03
Exactitud	C/P del control positivo 1.0 ± 0.5 .	C/P del control positivo 4.0 ± 0.5 .	0.7	3.5
	Recobro de C/P de INF β -1a (100 ± 30 %, IC al 95 %)	Recobro de C/P de rhGH (100 ± 24 %, IC al 95 %)	74% IC:72 a 75%	87% IC: 84 a 90%
Intervalo de medición	IC al 95%, 100 ± 30 %, CV<15 %.	IC al 95%, 100 ± 24 % CV <12 %.	3 μ M a 200 μ M IC: 94 a 95% CV: 0.2%	3 μ M a 200 μ M IC: 94 a 95% CV: 0.2%

SR: Sustancia de referencia, MP: Muestra problema, DN: Condiciones desnaturizantes, , C/P: Razón molar de Cisteínas/Proteína, , IC: Intervalo de confianza, CV: Coeficiente de variación, m: pendiente.

condiciones nativa y desnaturizante-reductor (Fig. 1) obteniendo coeficientes de correlación mayores a 0.98 y pendientes diferentes de 0 (Tabla 1).

Precisión

La repetibilidad del método se determinó con la preparación de muestras problema y sustancia de referencia por sextuplicado, donde los coeficientes de variación para las tres condiciones resultaron ser menores al 15% establecido como criterio de aceptación. El coeficiente de variación en condiciones nativas y desnaturizantes-reductoras fue no mayor al 10% y 2%, respectivamente (Tabla 1). Esta diferencia en el coeficiente de variación se relaciona a la concentración del analito de interés; es decir, en condiciones nativas la proteína expone la Cys₁₈ no enlazada, además de aquellas que pudiesen liberarse durante su vida de anaquel. Mientras que el tratamiento desnaturizante-reductor expone las cinco cisteínas totales que contiene la secuencia de Filgrastim.

Especificidad

El método demostró ser específico para el analito de interés, debido a que las matrices de cada condición no interfirieron con las lecturas para el análisis de blancos mostrando lecturas de absorbancia promedio menores a 0.01 para los blancos. Como control positivo se obtuvieron las razones molares promedio esperadas, 0.7 para Interferón β -1a (condición nativa), 3.5 para rhGH (condición desnaturizante-reductor), mientras que para el control negativo las razones molares promedio fueron menores a 0.05 para las dos condiciones (Tabla 1).

Exactitud

Las recuperaciones obtenidas de 74% para IFN β -1a en condición nativa y 87% para rhGH en condición desnaturizante-reductor, demostraron la exactitud del método al cumplir con los criterios establecidos dentro del intervalo de confianza del $100 \pm 30\%$ en codición nativa y $100 \pm 24\%$ en condición desnaturizante-reductor (Tabla 1). El intervalo de confianza fue más amplio para las condiciones nativas que para las condiciones desnaturizantes reductoras, al igual que los resultados de precisión esta amplitud se debe a las concentraciones del analito en cada condición (Tabla 1).

Las características evaluadas durante el ejercicio de validación: exactitud, precisión y repetibilidad, especificidad, linealidad e intervalo de medición, mostraron que el método de cuantificación de tioles libres bajo las condiciones nativas y desnaturizantes-reductoras es adecuado para su uso intencionado.

3.2 Identidad de Filgrastim

Esta prueba consistió en determinar que el contenido de cisteínas totales de Filgrastim corresponda con el de su secuencia teórica de cisteínas, como una prueba de identidad, en condición desnaturizante-reductor.

El resultado de C/P de cisteínas en Filgrastim fue de 4.4 ± 0.09 SD, que corresponde a las cinco cisteínas totales, Cys₁₈, Cys₃₇, Cys₄₃, Cys₆₅, Cys₇₅, de la secuencia teórica, siendo las Cys₃₇-Cys₄₃ y Cys₆₅-Cys₇₅ aquellas en las que se forman los dos puentes disulfuro requeridos para mantener su

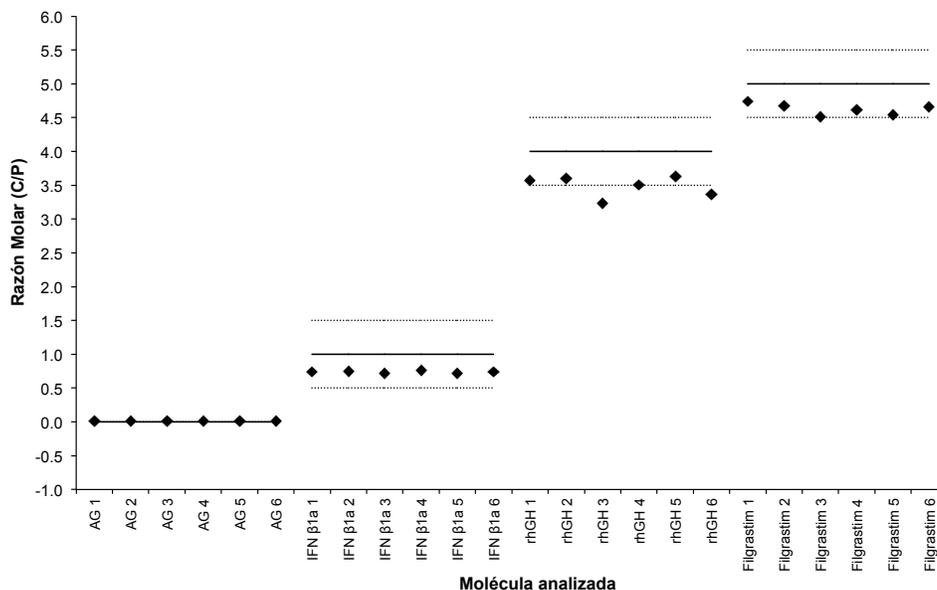


Fig. 2. Razón molar para los controles y las muestras problema. Los tioles fueron cuantificados en condiciones nativas para Acetato de Glatiramer (AG) e Interferón β -1a (IFN β -1a), mientras que para Somatotropina (rhGH) y Filgrastim se cuantificaron en condiciones desnaturalizantes-reductoras. Las líneas punteadas representan a los intervalos de medición, las líneas continuas representan el valor teórico de tioles y los diamantes representan las mediciones experimentales.

Tabla 2. Resultados de comparabilidad de tioles libres en condición nativa de Filatil[®] y su medicamento de referencia.

	Lote	Razón molar (C/P)
Filatil [®]	5432130402	0.7 ± 0.007
	5432131005	1.0 ± 0.013
	5432130804	0.9 ± 0.011
Medicamento de referencia	1050160	0.8 ± 0.015
	1048836	1.0 ± 0.020
	1047460	0.6 ± 0.003

p=1.000; α , 0.05

estabilidad estructural, mientras que la Cys₁₈ tiene a su sustituyente tiol libre (Hill y col., 1993). Los resultados de razón molar para las muestras problema y los controles se muestran en la Fig. 2.

Ejercicio de comparabilidad

Los resultados de comparabilidad evaluados para tres diferentes lotes de Filatil[®] y del medicamento de referencia en condiciones nativas, mostraron que la razón molar C/P fue \approx 1 en ambos productos; el análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas (p=1.000; α , 0.05) en el contenido de cisteínas libres entre los dos productos analizados (Tabla 2). Este resultado demuestra la comparabilidad de Filatil[®], con respecto a su referencia, en términos

de su estabilidad estructural que pudiera impactar en su funcionalidad.

Conclusiones

Debido al impacto que tienen los puentes disulfuro en la correcta configuración estructural y funcionalidad de las proteínas, se resalta la relevancia de contar con una metodología analítica capaz de demostrar de manera precisa, exacta y reproducible este atributo de calidad. En este estudio se demostró que el método espectrofotométrico utilizado para la cuantificación de cisteínas libres en proteínas recombinantes es adecuado tanto para estimar la cantidad de cisteínas

libres presentes en Filgrastim bajo condición nativa, así como para cuantificar la cantidad de cisteínas totales bajo condición desnaturalizante-reductor; esto según los atributos de medición evaluados de linealidad, precisión, exactitud y especificidad que cumplieron con los criterios de aceptación pre-establecidos. Así mismo, este método fue útil para demostrar que dos medicamentos que contienen Filgrastim producidos por fabricantes distintos, son comparables para el atributo evaluado; lo que sugiere que mantienen la misma conformación estructural en condiciones nativas, por lo que es de esperarse que su estabilidad y funcionalidad sean también similares. Sin embargo, debe notarse que para que un medicamento pueda denominarse biocomparable con respecto a su referencia, debe ser evaluado mediante un ejercicio completo que demuestre comparabilidad para aquellos atributos físicos, químicos y funcionales que impactan en su calidad.

Referencias

- Antonio-Pérez A, Aldaz-Martínez LM, Meneses-Acosta A, Ortega-López J. (2014). Replegamiento de Lizosima asistida por chaperonas moleculares inmovilizados en celulosa: las condiciones operativas que afectan los rendimientos de replegamiento. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 83-91.
- Diario Oficial de la Federación. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
- Ellman GL. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77.
- Eon-Duval A, Broly H, Gleixner R. (2012). Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: An assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnology Progress* 28, 608-622.
- European Medicines Agency. (2012). Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies-non-clinical and clinical issues. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128686.pdf. Accesado: 27 Octubre 2015.
- Food and Drug Administration. (2012). Guidance for Industry. Scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf>. Accesado: 27 Octubre 2015.
- González-Valdez J, Mayolo-Delouis K, González-González M, Rito-Palomares M. (2014). Tendencias en Bioseparaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 19-27.
- Habeeb AFSA. (1972). [37] Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods in Enzymology* 25, 457-464.
- Hermanson GT. (2013). *Bioconjugate Techniques*. Academic Press. London, UK.
- Hill CP, Osslund TD, Eisenberg D. (1993). The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 5167-5171.
- International Conference on Harmonisation. (2005). ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Accesado: 25 Marzo 2015.
- Kosuri P, Alegre-Cebollada J, Feng J, Kaplan A, Inglés-Prieto Á, Badilla CL, Stockwell BR, Sánchez-Ruiz JM, Holmgren A, Fernández JM. (2012). Protein folding drives disulfide formation. *Cell* 151, 794-806.
- Lara AR. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 209-223.

- Levy M, Gucinski A, Sommers C, Ghasriani H, Wang B, Keire D, Boyne M, II. (2014). Analytical techniques and bioactivity assays to compare the structure and function of filgrastim (granulocyte-colony stimulating factor) therapeutics from different manufacturers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406, 6559-6567.
- López-Morales CA, Miranda-Hernández MP, Juárez-Bayardo LC, Ramírez-Ibáñez ND, Romero-Díaz AJ, Piña-Lara N, Campos-García VR, Pérez NO, Flores-Ortiz LF, Medina-Rivero E. (2015). Physicochemical and Biological Characterization of a Biosimilar Trastuzumab. *BioMed Research International* 2015, 1-10.
- Pérez Medina Martínez V, Abad-Javier ME, Romero-Díaz AJ, Villaseñor-Ortega F, Pérez NO, Flores-Ortiz L, Medina-Rivero E. (2014). Comparability of a three-dimensional structure in biopharmaceuticals using spectroscopic methods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2014, 1-11.
- Qin M, Wang W, Thirumalai D. (2015). Protein folding guides disulfide bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11241-11246.
- Reh CS, Geffner ME. (2010). Somatotropin in the treatment of growth hormone deficiency and Turner syndrome in pediatric patients: a review. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* 2, 111-122.
- Secretaría de Salud. (2014). Guía para establecer la biocomparabilidad de los medicamentos biotecnológicos, que contengan como biofármaco Filgrastim. Disponible en: [http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Guias/Gu%C3%ADa de Biocomparabilidad_Filgrastim.PDF](http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Guias/Gu%C3%ADa%20de%20Biocomparabilidad_Filgrastim.PDF). Accesado: 27 Octubre 2015.
- van Beers MC, Sauerborn M, Gilli F, Brinks V, Schellekens H, Jiskoot W. (2011). Oxidized and Aggregated Recombinant Human Interferon Beta is Immunogenic in Human Interferon Beta Transgenic Mice. *Pharmaceutical Research* 28, 2393-2402.
- Zhang T, Zhang J, Hewitt D, Tran B, Gao X, Qiu ZJ, Tejada M, Gazzano-Santoro H, Kao Y-H. (2012). Identification and Characterization of Buried Unpaired Cysteines in a Recombinant Monoclonal IgG1 Antibody. *Analytical Chemistry* 84, 7112-7123.
- Ziemssen T, Schrempf W. (2007). Glatiramer Acetate: Mechanisms of Action in Multiple Sclerosis. *International Review of Neurobiology* 79, 537-570.