



COMPARACIÓN BIOQUÍMICA DE rHuG-CSF COMERCIALES FILATIL® Y NEUPOGEN®

Norma A. Valdez-Cruz¹, Noberto Cruz², Octavio Tonatiuh Ramírez¹, Jaime Uribe²

¹ Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Cuernavaca Mor. 62250, México. Fax: 777-3138811; adri@ibt.unam.mx

² PROBIOMED S.A. de C.V., PLANTA TENANCINGO. Cruce de Carret. Acatzingo-Zumpahuacan SN, C.P. 52400, Tenancingo Edo. de México. Tel 0155-11662279.

Palabras clave: Filgrastim, espectrometría de masas, biogénicos

Introducción. El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citoquina que regula la producción, maduración y liberación de neutrófilos desde la médula ósea (1). Se compone de 175 aminoácidos, presenta una O-glicosilación en el aminoácido 133 que le confiere estabilidad pero no es esencial para la actividad biológica. Además, la molécula es estabilizada por 2 puentes disulfuro entre las cisternas 37 y 43 y las cisternas 65 y 75 (2). Su peso molecular sin la O-glicosilación en su forma reducida es de 18,802.85 Da. Actualmente, se produce industrialmente de forma recombinante (rHuG-CSF) en *E. coli* (3). El rHuG-CSF presenta los 174 aminoácidos idénticos a la proteína humana, además una metionina en el extremo amino-terminal y no está glicosilada (3). El objetivo de este trabajo fue determinar la identidad de estructura primaria y molecular entre los productos Filatil® (Probiomed) y Neupogen® (Roche).

Metodología. Los medicamentos Filatil® y Neupogen® fueron comparados por cromatografía en gel SDS-PAGE. Los principios activos (PA) fueron purificados por cromatografía de alta resolución en fase reversa por HPLC usando una columna C-4 analítica, Phenomenex Jupiter. El gradiente utilizado fue de 50 a 90% de acetonitrilo con 0.1% de TFA, en 60 min. Los componentes en estudio, fueron desalados y posteriormente fueron reconstituidos a una concentración final de 1 mg/mL en 50% de acetonitrilo con 1% de ácido acético y, directamente fueron aplicados en un espectrómetro de masas Finnigan (San José, CA) LCQduo IT, usando una jeringa MS como sistema de bombeo de entrega. La prueba presenta ± 1 de error.

Resultados y discusión. Los PA separados por cromatografía se muestran en la figura 1. Ambos G-CSF, presentaron el mismo tiempo de retención (13.8 min) lo que indica una conformación altamente similar con base en sus características moleculares. Por otro lado, el peso molecular de ambas proteínas fue determinado. En la figura 2, se muestran los espectros obtenidos de los PA de Filatil® (fig. 2A) y Neupogen® (fig. 2B) analizados por espectrometría de masas. El peso molecular obtenido del PA de Filatil® fue de 18,798 Da, y el del PA de Neupogen® fue de 18,799 Da. Ambos pesos moleculares fueron obtenidos de PA en su forma nativa, por lo cual ambos pesos moleculares coinciden con el peso molecular teórico, al adicionar los 4 H⁺ de la forma reducida. La identidad de peso molecular indica la identidad de la secuencia primaria. Ambos G-CSF presentan el mismo punto isoelectrónico así como actividad (datos no mostrados).

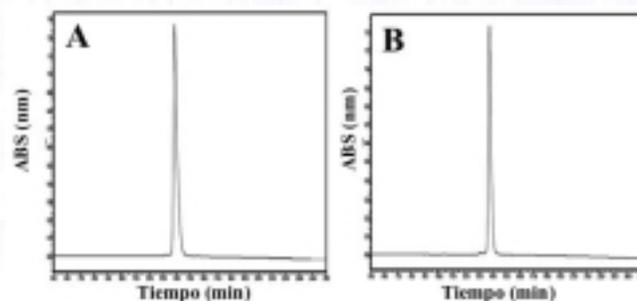


Figura 1. Separación de los PA purificados de Filatil® (A) y Neupogen® (B), mediante HPLC en fase reversa usando una columna analítica.

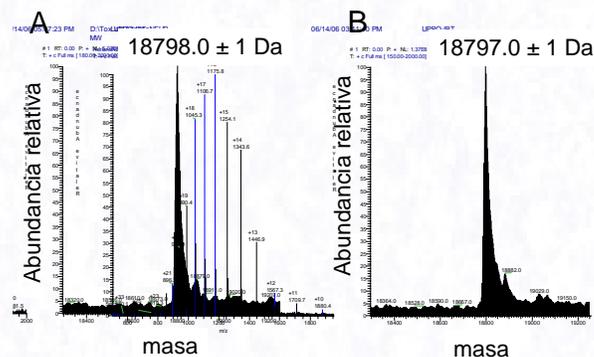


Figura 2. Determinación de peso molecular por electrospray de PA purificados de Filatil® (A) y Neupogen® (B).

Conclusiones. El tiempo de retención de los PA de ambas formulaciones es idéntico lo que indica que ambas proteínas presentan características conformacionales similares. El peso molecular de ambas moléculas es similar y corresponde con el peso molecular teórico calculado en el programa “peptide mass” de lo que podemos concluir que ambas moléculas son idénticas en cuanto a peso molecular y que además poseen similitud en la secuencia primaria.

Bibliografía

- 1.- Demetri GC, Griffin JD (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 78:2791.
- 2.- Hill CP, Osslund TD, Eisenberg D (1993) The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5167.
- 3.- Hernan AC, Boone TC, Lu H S. (1996) Characterization, formulation and stability of Neupogen (Filgrastim) a recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Ed. Plenum Press, New York.*