REPORTES ESPECIALES/ SPECIAL REPORTS

EL PAPEL DEL CONTROL DE CALIDAD EN PRODUCTOS RECOMBINANTES DE INTERES FARMACEUTICO

Marisel Quintana

Subdirección de Calidad, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, C.P. 10600 Cuba.

Recibido en septiembre de 1993. Aprobado en noviembre de 1993

Keys words: Safety, potency, identity, stability, sterility, quality control, recombinant protein

SUMMARY

Quality control of industrial products obtained by recombinant DNA technology links the traditional techniques derived from conventional pharmaceutical processes with the most recent advances in analytical chemistry and molecular biology. According to the current international regulations related to this technology, it is necessary to carry out the production control from the source materials (producer organisms) up to the full characterization of the active purified material. Assays such as Security, Potency, Identity and Stability are required for these products.

RESUMEN

El control de calidad de productos obtenidos por la tecnología del ADN recombinante ofrece la oportunidad de unir las técnicas tradicionales derivadas de procesos farmacéuticos convencionales con los avances más actuales en la química analítica y la biología molecular. De acuerdo con las regulaciones internacionales vigentes con relación a esta tecnología, es necesario llevar el control de la producción desde los materiales de partida (organismos productores), hasta la caracterización completa del material purificado activo. De igual forma los ensayos de seguridad, potencia, identidad y estabilidad son exigidos para estos productos.

INTRODUCCION

El concepto básico de la producción utilizando la tecnología del ADN recombinante (ADNr) es simple, aunque su proceso es sofisticado, ya que requiere de conocimientos de muchas áreas: biología molecular, microbiología, inmunología, bioquímica e ingeniería, entre otras. La tecnología del ADN recombinante da lugar a un ADN híbrido, formado por combinación de fragmentos de ADN de diferentes organismos. Las bacterias, levaduras y células de mamíferos actúan como hospederos del material genético para obtener productos de interés terapéutico, diagnóstico e industrial (1-2).

Estos productos incluyen proteínas de origen humano y péptidos como son las hormonas (insulina, hormona del crecimiento humano, eritropoyetina), productos de la sangre (factor VIII, activador tisular del plasminógeno), citocinas (interferones, interleucinas), antígenos virales y bacterianos usados como nuevas vacunas. Todos ellos son expresados por genes naturales en hospederos extraños y pueden diferir estructural, biológica e inmunológicamente de su equivalente natural. Estas diferencias pueden deberse a modificaciones post-transcripcionales, post-traduccionales u ocurrir durante el proceso de fermentación y/o purificación para dar lugar al producto activo (3).

Las regulaciones internacionales para los productos recombinantes de interés terapéutico son similares a las de producciones biológicas convencionales obtenidas de bacterias y virus, con la adición de requerimientos específicos derivados de los productos biotecnológicos. Los requerimientos generales están descritos en el Título 21, del Código de Regulaciones Federales (CFR) de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), de los Estados Unidos), partes 600-680 (4), así como en las guías establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (5-6) y la Comunidad Económica Europea (CEE) (7-9). En todos los casos estas regulaciones internacionales enfatizan el control de calidad de los productos recombinantes hacia tres áreas principales:

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

1. Control de los materiales de partida (organismos productores).
2. Control del proceso de manufactura (fermentación y purificación).
3. Caracterización del material activo purificado.

La formulación final, ya sea en suspensión o liofilizada, debe ser analizada a través de ensayos que demuestren la potencia, seguridad, ausencia de sustancias pirogénicas, identidad y esterilidad. Al mismo tiempo, los estudios de estabilidad acelerada y a tiempo real son necesarios para garantizar la confiabilidad de estos productos (10-11).

1.- CONTROL RELACIONADO CON LOS ORGANISMOS PRODUCTORES

La producción debe estar basada en un sistema de lote semilla o lote de partida que comprende: el Banco de Células Primarias (BCP), y el Banco de Células de Trabajo (Working Cell Bank).

El BCP, es un lote semilla que contiene la información genética que codifica para la proteína de interés, y a partir del cual todos los lotes semilla son preparados. Este consiste en un conjunto de alícuotas homogéneas de un cultivo puro, que se almacena en condiciones que garanticen su estabilidad genética (-70°C o nitrógeno líquido). Cada cierto tiempo el banco es testado para demostrar que mantiene las características genéticas y bioquímicas (12-13).

Entre los controles que se le realizan al BCP tenemos: chequeo de marcadores fenotípicos y genotípicos, análisis de proteínas celulares, mapeo por restricción del vector de expresión, verificación de la secuencia nucleotídica del gen y de la regulación de la expresión, número de copias plasmídicas, estabilidad plasmídica, pureza microbiana y viabilidad. Además, se hace necesaria la evaluación de los bancos con relación a las características cinéticas de crecimiento, así como la determinación de los niveles de expresión del producto de interés.

En todos los casos, los estudios de estabilidad en tiempo real de estos BCP son una garantía para la consistencia en los procesos productivos.

En el caso de una construcción integrada al cromosoma de la célula hospedera, se hace difícil caracterizar por secuenciación el ADN clonado, por lo que se prefiere comprobar la secuencia de la proteína expresada para cada BCP. En este caso se utilizan las técnicas de mapeo peptídico y espectrometría de masas, para asegurar que el ADN no ha sido mutado y de que no ha ocurrido ningún cambio en la secuencia de la proteína (14). Como controles de rutina se realiza la verificación del patrón de integración mediante técnicas de Southern blot y la verificación del gen mediante técnicas de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) (15-16).

A partir del BCP se obtiene el Banco de Células de Trabajo, al que se le verifica su viabilidad y pureza. Debe asegurarse la estabilidad genética de la célula productora mediante controles tales como: chequeo de marcadores fenotípicos y genotípicos, estabilidad plasmídica, mapeo por restricción del vector de expresión. En el caso de células de organismos superiores se realizan ensayos como el control de isoenzimas, auxotrofía, resistencia a antibióticos y cariología.

Los Bancos de Células de Trabajo son evaluados a nivel productivo (volumen fermentativo de trabajo) y su análisis conlleva la caracterización total del material activo purificado, en este caso se debe demostrar la identidad e integridad molecular del producto.

2.-CONTROL DEL PROCESO DE MANUFACTURA

2a. Control de calidad del proceso fermentativo.

En este caso se deben realizar controles de procesos que nos aseguren una estabilidad genética, productiva y ausencia de contaminantes (17).

Entre los aspectos importantes a tener en cuenta en un proceso fermentativo tenemos:

A. Control de los medios utilizados.

B. Control de los productos utilizados como inductores.

C. Pureza Microbiana.

D. Estabilidad del proceso y de las células productoras. Esto se realiza a través del chequeo de los siguientes parámetros: características fenotípicas y genotípicas de la célula, velocidad específica de crecimiento, actividad específica del producto, número de copias del plásmido, purificación y estudio por restricción del vector de expresión, así como la verificación de la secuencia del gen, esto último debe controlarse al menos una vez por cada BCP.

Para el control del proceso fermentativo se deben establecer parámetros que demuestren la consistencia de la productividad de este paso y se deben definir los criterios de rechazo.

Los antibióticos como la penicilina y otros β-lactámicos no deben ser usados en los pasos del proceso productivo, ya que pueden provocar respuestas de hipersensibilidad (3). Similarmente otras sustancias como los inhibidores de proteasas, β-propiolactona, formaldehído, y otros reactivos químicos pueden derivar en productos que produzcan respuestas inmunes indeseables (8).

2b. Control de calidad del proceso de recobrado y purificación

El recobrado de la proteína se basa en la utilización de técnicas de alta eficiencia como son: gel filtración, intercambio iónico, isoelectroenfoque, cromatografía de afinidad y el uso de anticuerpos específicos. El proceso de recobrado comienza con el aislamiento de la proteína deseada, a menudo en un estado muy impuro. Los cultivos de células y algunas levaduras que excretan el producto al medio de cultivo tienen mayor ventaja, ya que con un primer paso de separación de las células del cultivo se facilita la purificación (18). En el caso de los productos derivados de *E.coli* se necesita romper las células bacterianas para recobrar la proteína. En todos los casos es muy importante desarrollar rápidamente la purificación, pues tanto los lisados de la bacteria como los cultivos de células y levaduras liberan proteasas que pueden degradar el producto deseado. En la figura 1, se muestra la evaluación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (FCE h. rec.) obtenido en levaduras, don de observa la degradación por la presencia de proteasas. En el cromatograma aparecen dos picos que corresponden con el FCE de 1 a 51 aminoácidos, con pérdidas de Leu-Arg y el FCE de 1 a 52 con pérdida de la Arg, ambos por el carboxilo terminal (19).

Los niveles de pureza establecidos para productos recombinates son de 95% o más (5), utilizando diferentes métodos. La pureza depende de un número de factores,

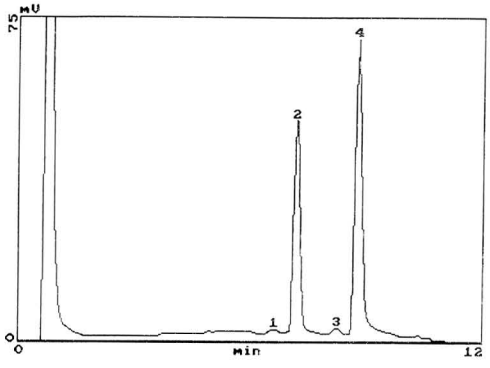

Fig 1. RP-HPLC del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante obtenido en Levaduras. Los picos 2 y 4 corresponden al FCE 1-51 y FCE 1-52, con sus respectivas formas oxidadas (picos 1 y 3).

se debe subrayar que los productos para uso crónico tienen normalmente requerimientos mayores de pureza que aquellos utilizados en dosis única o poco frecuente.

Los productos biotecnológicos tienen ciertas impurezas que es necesario minimizar o eliminar en el proceso de purificación. Entre ellas están los virus, los ácidos nucleicos, y los materiales antigénicos indeseables.

Eliminación del ADN contaminante

Los productos recombinantes deben cumplir con niveles de 10 pg o menos de ADN por dosis. La capacidad de eliminar el ADN durante el proceso de recobrado y purificación debe validarse (20).

Eliminación de antígenos de la célula hospedera

Se aceptan niveles entre 10 y 100 ng por dosis, para el contenido de impurezas de proteínas de hospedero (8), aunque ya aparecen en la literatura concentraciones más bajas, dadas en partes por millón (PPM) (21).

Eliminación o inactivación de agentes indeseables

Debe validarse la capacidad de eliminarlos por el proceso, estos agentes son bacterias, hongos, micoplasmas y virus (22-23).

Cromatografía de afinidad

Los anticuerpos monoclonales utilizados en esta cromatografía deben controlarse como materia prima y entre las especificaciones de calidad para este producto están el nivel máximo permitido de ADN de ratón que es de 10 pg por mg de proteína y la ausencia de contaminación por agentes extraños entre los que están los virus (24-25).

Eliminación de IgG de ratón

Se exigen bajos niveles; los valores dependen de los requerimientos aprobados por las autoridades nacionales de cada país, generalmente los niveles están en el orden de las partes por millón en el preparado final (26-27).

3.- CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL ACTIVO PURIFICADO

Deben mostrarse evidencias de identidad, pureza, potencia e integridad molecular del material activo en comparación con preparaciones de referencia.

3a. Pruebas para identidad y pureza

a) Análisis de aminoácidos. Se deben realizar como mínimo 3 análisis comparativos con la composición teórica del equivalente natural. El análisis de aminoácidos detecta solamente cambios sustanciales entre un 10 y un 30% en la estructura primaria proteica. La detección de metionina oxidada o aminoácidos residuales que se conoce que no deben aparecer en esa preparación puede indicar

degradación o contaminación. El método no debe ser utilizado como criterio de pureza, ya que presenta problemas con su exactitud (28-29).

b) **Mapeo peptídico.** El mapeo peptídico puede demostrar diferencias discriminatorias entre un producto obtenido por la vía del ADNr y una muestra auténtica del producto natural. Unido a la composición y análisis de secuencia de cada péptido, el mapeo peptídico puede dar evidencias precisas de la identidad de una proteína. Esta técnica puede ser usada para verificar la presencia incorrecta de los puentes de disulfuro en la muestra final y alteraciones o mutaciones en aminoácidos de la secuencia (30).

c) **Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).** Esta técnica permite separar proteínas individuales y polipéptidos de acuerdo con el peso molecular (31).

El SDS disocia, solubiliza y desnaturaliza proteínas contenidas en una mezcla heterogénea, y cada polipéptido adquiere una carga constante por unidad de masa. Las muestras se preparan en condiciones desnaturalizantes con y sin agentes reductores, esto permite detectar la presencia de agregados en la preparación.

En el paso de revelado, se recomienda utilizar dos formas de tinción, por lo que las muestras se preparan por duplicado. La tinción con azul de coomassie, se utiliza para medir con un densitómetro el por ciento de pureza, los posibles agregados y material degradado de la preparación. La tinción con plata es considerada más sensible, apropiada para ver pequeñas cantidades de proteínas y es útil para revelar materiales no proteicos como: ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (32). En la figura 2, se muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, mediante la cual se detecta la presencia de material degradado utilizando muestras de estreptoquinasa recombinante que ha sido sometida a variaciones de pH y degradación enzimática.

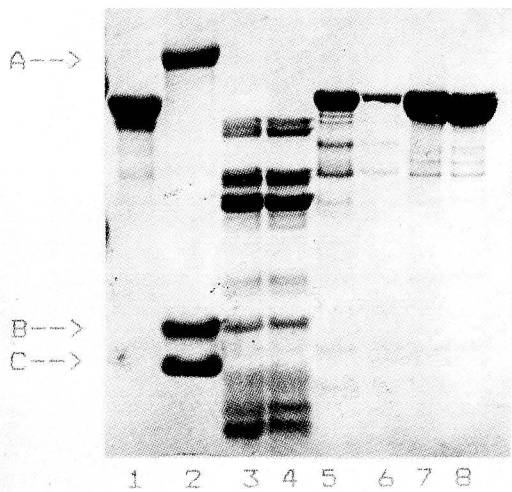

Fig 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y tinción con azul de Coomassie. 1) Patrón de estreptoquinasa recombinante; 2) Marcadores de peso molecular (A: Albumina 67000 Da, B: Interferón alfa 2b humano recombinante 18,400 Da, C: Lisozima 14.300 Da.; 3-8) Muestras de Estreptoquinasa recombinante sometida a variaciones de pH y degradación enzimática.

d) **Isoelectroenfoque.** Es una técnica electroforética que separa las proteínas sobre la base de la carga. Este método es empleado para conocer la identidad y para asegurar la homogeneidad de una proteína, comparando con el patrón de bandas definido por el punto isoeléctrico (PI). También puede ser usada para evaluar la estabilidad de los productos biológicos. Estas técnicas se realizan con marcadores de calibración para PI o preparaciones de referencia.

e) **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).** Este método es usado para determinar la pureza de una proteína o péptido, detecta la presencia de modificaciones como acetilación, degradación y bajo ciertas circunstancias confirma su identidad. El HPLC puede ser utilizado en el mapeo peptídico y en la caracterización y cuantificación de impurezas específicas en el producto final (33-34).

f) **Espectrometría de masas.** La espectrometría de masas con ionización por bombardeo con átomos acelerados (FAB-MS) es un método establecido para el análisis de péptidos y proteínas. Mediante esta técnica es posible conocer la presencia de modificaciones post-traduccionales como son: acilación, glicosilación, formación incorrecta de puentes disulfuro y degradación de las proteínas, entre otras (35).

g) **Dicroismo circular y dispersión rotatoria óptica:** Suministra información sobre la conformación estructural en comparación con la molécula natural o preparaciones de referencia (36).

h) **Dot-blot:** La determinación de trazas de ADN residual en estos productos se realiza mediante técnicas de hibridación usando sondas radiactivas derivadas del ADN de la célula hospedera. La sensibilidd del ensayo determinada por el límite de detección visual está de 10 a 250pg. Este método solo reconoce ADN complementario a la sonda radiactiva, por lo que otros tipos de ADN no son detectados (37).

i) **Inmunoensayos:** Constituyen un gran grupo de ensayos que dependen de la reacción antígeno-anticuerpo. Estos ensayos incluyen los

radioinmunoensayos (RIA) y los ELISA, estos últimos presentan la ventaja de no utilizar sustancias radioactivas en su desarrollo. Los ELISA tienen una sensibilidad desde 1 hasta 100 ppm y se aplican para detectar las impurezas que están presentea a bajas concentraciones y que no se obtienen por SDS-PAGE (38)

Estos métodos son utilizados para la identificación y cuantificación de las proteínas de interés, así como, la cuantificación de impurezas que son incorporadas durante el proceso de producción. La cuantificación de proteínas que provienen de célula hospedero se realiza mediante un ELISA multiantigénico, el cual requiere de un material de referencia representativo de estas impurezas. En este caso es importante producir los anticuerpos utilizando una corrida de producción sin la presencia del producto (39).

Otras técnicas que utilizan la reacción antígeno-anticuerpo son el western blot y el inmuno-dot, los cuales pueden ser utilizados para la determinaci'on cualitativa y semicuantitativa de contaminantes en el material purificado activo, como son agregados y sustancias de degradación derivados del propio producto.

Las técnicas de western-blot, inmuno-dot, y ELISA son utilizadas para medir el nivel de contaminantes en el material purificado activo; ya sean contaminantes de la célula hospedera, agregados y productos de degradación derivados del propio producto como los niveles de anticuerpos de ratón cuando utilizamos en el proceso de purificación de los anticuerpos monoclonales.

3b. Pruebas para la caracterización biológica del material activo

a) Actividad biológica. La actividad biológica se expresa por dosis o unidad. El ensayo debe ser realizado en comparación con un estándar de referencia internacional (40-41). En el trabajo de rutina se utilizan preparaciones de referencia de laboratorio calibradas con el estándar internacional. La determinación de la actividad específica es utilizada como criterio de pureza e integridad molecular.

b) Inmunogenicidad. Si el producto se va a usar como vacuna, la potencia debe testarse en términos de inmunogenicidad en animales experimentales adecuados. En este caso es necesario referir el valor de la potencia de la vacuna, a una vacuna estándar. Esto significa que ambas vacunas estándar y muestras se someten a ensayo bajo las mismas condiciones (42).

Los ensayos biológicos en animales de experimentación adolecen de poca precisión y exactitud. Por tal motivo, se realizan estudios de correlación entre los resultados obtenidos con estos ensayos y los obtenidos con pruebas fisicoquímicas y bioensayos realizados *in vitro* e *in vivo*, con el fin de sustituirlos en los análisis de control de calidad (43-44).

4.- PRUEBAS DE SEGURIDAD PARA BIOLOGICOS

a) Esterilidad. Tanto el material activo purificado como la preparación final son inoculados directamente en medio tioglicolato (30-35°C) y medio digerido de caseína y frijol de soya (20-25°C) e incubados por un período de 14 días a las temperaturas indicadas. El número de viales que se toman en el muestreo depende del tamaño del lote producido, un número de 20 viales para cada medio es recomendado por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXII/90). Las muestras son seleccionadas de forma representativa durante el proceso de llenado. Para el caso del material activo se inoculan no menos de 10 mL de muestra (45).

Tabla 1.
Ensayos realizados a los productos obtenidos por la tecnología del ADN recombinante.

Tipo de Ensayo	Ensayos Requeridos [a]		
	Para todos los lotes	Por cada No. de lotes	Por cada BCP
Actividad biológica	+		
Actividad específica	+		
Identidad	+		
SDS-PAGE	+		
RP-HPLC	+		
Aminoterminal	●	+	
Análisis de Aminoácidos	+		
Mapeo peptídico	●	+	
Puente SH_2			+
Secuencia proteíca		●	+
Carbohidratos	+		
Composición de Carbohidratos		●	+
ADN	+		
Proteína hospedera	+		
Estructura conformacional			
Esterilidad	+		
Pirógeno	+		
Inocuidad	+		

[a] +: requeridos

● Acordado; va a depender de las características del producto y la necesidad del proceso productivo

Para que un producto sea considerado aceptable, no debe aparecer turbidez en los tubos de medio inoculados con las muestras. Si se observa un crecimiento microbiano, la prueba debe repetirse con el doble del número de viales, si no aparece turbidez la prueba es satisfactoria. Un método alternativo para determinar la esterilidad es la filtración por membrana, resultando útil para líquidos y sólidos solubles con propiedades antimicrobianas, pues permite la separación de los posibles contaminantes de los inhibidores (46).

Los medios de cultivo utilizados en este ensayo son chequeados previamente mediante la prueba de promoción de crecimiento utilizando cepas estándares.

b) Pirogenicidad. Trazas o agentes como los microbios, sustancias pirogénicas, ácidos nucleicos y agentes tóxicos, pueden afectar la seguridad de los productos biológicos. Hay dos caminos para determinar la pirogenicidad: el ensayo en conejos y la prueba del LAL (lisado de *limulus amebocitus,* específico para endotoxinas bacterianas). Este método se utiliza fundamentalmente para el producto en forma de Materia Activa Purificada (Bulk).

Para el ensayo de pirógeno en conejos, se suministra a tres conejos una muestra de acuerdo a la dosis del producto en cuestión con un volumen que no exceda de 10 mL/Kg de peso del animal. La temperatura es medida durante 3 h.

Se considera la muestra ensayada libre de pirógenos cuando no existe entre ambas temperaturas (la mínima inicial con la máxima final) una diferencia igual o superior a 0.6°C en los 3 conejos y la suma de las diferencias halladas en los 3 conejos no es superior a 1.4°C.

Si alguna de estas dos condiciones no se cumple se considera dudoso el ensayo y se procede a realizar una reprueba, en este caso se utilizan 5 animales más. Si de los 8 conejos (3 iniciales y 5 en reprueba), más de 3 alcanzan valores de incremento de temperatura superiores o iguales a 0.6°C o la suma total excede de 3.7°C se considera el ensayo positivo y se procede a rechazar el lote.

Hay productos biológicos que son pirogénicos en humanos, un método para saber si el producto produce una respuesta pirogénica en el hombre es cultivar el producto con células mononucleares de la sangre *in vitro* e inyectar el resultado del cultivo celular en conejos, un aumento de temperatura en el conejo indica que el producto actúa como un pirógeno.

c) Toxicidad anormal (seguridad). Este ensayo se realiza al preparado final y se lleva a cabo en dos especies animales: en ratones que pesan entre 17 y 22 g y en curieles entre 250 y 350 g, estos se mantienen en observación durante 7 días. Un lote final del producto pasa la prueba si no aparece ninguna de las siguientes situaciones: presencia de cualquier síntoma anormal o tóxico que no sea específico del producto o no se espere del mismo, decremento o mantenimiento de la masa total de los ratones en ensayo o de la masa individual de cada curiel, muerte de alguno de los animales (47).

d) Estabilidad. Es la vida media del producto en las condiciones de almacenamiento. Hay ocasiones en que se recomienda realizar ensayos de estabilidad como control para cada lote producido, manteniendo el producto por un tiempo a una determinada temperatura (37°C) y demostrar su estabilidad comparando los resultados de actividad biológica o potencia con el producto almacenado en condiciones óptimas (4°C), un ejemplo es la recomendación de la OMS para la producción de la vacuna antihepatitis B (48).

En la tabla 1 mostramos los ensayos de control de calidad realizados a los productos obtenidos por la tecnología del ADN recombinante. El tipo de ensayo y la frecuencia del análisis depende de las características del producto y su proceso productivo y es aprobado por la subdirección de calidad de la empresa productora.

CONCLUSIONES

A través de este trabajo hemos mostrado la diversidad de técnicas que se utilizan en el control de calidad de productos obtenidos por la tecnología del ADN recombinante de interés farmacéutico. Una combinación de ensayos que nos aseguren la potencia, pureza, identidad e integridad molecular del material activo purificado unido a pruebas de seguridad como: esterilidad, inocuidad y pirógeno garantiza la calidad de estos productos.

REFERENCIAS

1. WHO Consultation (1983). Quality Control of Biologicals produced by recombinant DNA techniques. Bulletin of the world Health Organization. **61**:897-911.
2. THOMAS, A.H. (1988). Quality Control in genetic engineering. Chemistry in Britanic: 1031-1035.
3. Guidelines for assuring the quality of pharmaceutical and biological products prepared by recombinant DNA technology. (1991). WHO Technical Report Series, N **814**:59-70.

4. Code of Regulations (1992). Title 21. Subpart 600-680. (U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.).
5. Requirements of Human Interferon made by Recombinant DNA techniques (1988). WHO Technical Report Series N **771**:158-179.
6. WHO expert committee on specifications for pharmaceutical Preparations (1992). WHO Technical Report Series N **823**:1-128.
7. EEC Regulatory Document (1991). Production and Quality Control of Human Monoclonal Antibodies. Biologicals **19**:133-138.
8. Commonwealth Department of Health (1986). Guidelines for Manufacture and Quality Control of Therapeutic Goods produced by Recombinant DNA Technology: 1-8.
9. SAVER, F. (1989). EEC guidelines on medicinal products derived from modern biotechnological process. Journal of Biological Standarization **17**:201-202.
10. BACHMAYER H. (1988). Quality Control of Protein Drugs. Drug. Res. **38**(4):590-591.
11. GARNICK, R.L; M.J. ROSS y R.A. BAFFI (1991). Characterization of Proteins from Recombinant DNA Manufacture. In Drug Biotechnology Regulation. Edited Chen, Y-y. H.; Grengwan, J.L. Marcel Dekker, Inc: 263-300.
12. SIMONE, Jr, F.P. (1992). Key Issues relating to the Genetic Stability and Preservation of Cells and Cell banks. Journal of Parenteral Science and Technology **46**(6):226-232.
13. AMADOR, E.; M. ALMAZÁN y M. QUINTANA (1992). Preparation and Stability of the Master Cell Bank (MCB) used for the production of human rec. 2 b alfa interferon.In: Advances in modern biotechnology, Book of short Reports of the Congress. Biotechnology, Havana'92, 23.2.
14. GARNICK, R.L; N.J. SOLLI and P.A. PAPA (1988). The Role of Quality Control in Biotechnology: An Analytical Perspective. Anal. Chem. **60**:2546-2556.
15. GIBBS, R.A. (1990) DNA amplification by the Polymerase Chain Reaction. Anal. Chem. **62**:1202-1214.
16. VAN BRUNT, J. (1990). Amplifying Genes: PCR and its alternatives. Biotechnology **8**:291-294.
17. CHEN Y-y. H. (1988). Validation of the Fermentation process for the Production of Recombinant DNA drugs. Pharmaceutical Technology. 132-138.
18. LOMBARDERO, J.; A.M. CINZA; M. QUINTANA; R. PERÉZ y A. LAGE (1988). Purificación del Factor de Crecimiento Epidérmico. Su escalado. Revista CENIC, **19**:102-109.
19. CINZA, A.M.; M. QUINTANA; J. LOMBARDERO; R. POUTOU; E. PÉREZ; L.C. PÉREZ; C.M. MELLA; V. BESADA; G. PADRÓN; L. CASTELLANOS; R. ESTRADA y J. MORALES-GRILLO (1991). Establecimiento de un cultivo discontinuo para la producción del Factor de Crecimiento Humano en levaduras. Biotecnología Aplicada **8**(2):166- 173.
20. HAGEMAN, T.C. (1991). An Analysis of Clearance Factor and Measurements Performed by Spiking Experiments. Biopharm 39-41.
21. CHEN A.B.; A.A. CHAMPIONSMITH; J. BLANCHARD; J. GOSELL; B.A. NUPILT; M.M. FEDERICK; J. FORMENTO y V.V. SINICROPI (1992). Quantitation of E.coli Proteins Impurities in Recombinant Human Interferon Gamma. Applied Biochem. and Biotech. **36**:137-152.
22. WHITE, E.M.; J.B. GRUN; C.S. SUN and A.F. SITO (1991). Process Validation for virus removal and inactivation. Biopharm **4**:34-39.
23. GRUN, J.B.; E.M. WHITE and A.F. SITO (1992). Viral Removal/Inactivation by Purification of Biopharmaceuticals. Biopharm **5**:22-30.
24. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for Human use (1987). Office of Biologicals Research and Review Center for Drugs and Biologic, FDA.
25. Guidelines on the production and Quality Control of monoclonal antibodies of murine origin intended for use in man (1988). Commission of the European Communities, Notes to applicants for marketing authorizations. TIBTECH **6**:5-8.
26. LUCAS, C.; C. NELSON; M.L. PETERSON; S. FRIL; D. VELTERLEN; T. GREGORY and A.B. CHEN. (1988). Enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) for the determination of contaminants resulting from the immunoaffinity purification of Recombinant protein. Journal of Immunological Methods **113**:113-122.
27. ANICETTI, V.R.; B.A. KEYT y W.S. HANCOCK (1989). Purity analysis of protein pharmaceuticals produced by recombinant DNA technology. TIBTECH **7**:342-348.
28. CASTELLANOS, L.R. (1993). Aminoacid Analysis in Quality Control: A critical Discussion. Biotecnología Aplicada **10**(1):51-56.
29. GEISOW, M.J. (1991). Characterizing Recombinant Proteins. Biotechnology **9**:921-924.
30. GARNICK, R.L. (1992). Peptide mapping for detecting variants in Protein Products. Develop. Biol. Standard **76**:117-130.
31. LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
32. RIGGIN, R.M. and N.A. FARID (1990). Analytical Chemistry of therapeutical Proteins. ACS Symposium Series **434**: 113-126.
33. Regnier, E.F. (1983). High Performance Liquid Chromatography of Proteins. In High Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides, Eds (Academic Press, New York): 137-190.
34. BESADA, V.; W. ANTUCH; A. CINZA; I. ROJAS; M. QUINTANA; G. PADRÓN; T. TAKAO and Y. SHIMONISHI (1990). Chemical Characterization of recombinant human epidermal growth factor. Anal. Chem. Acta **239**:301-305.
35. BESADA, V.; W. ANTUCH; R. RODRÍGUEZ; L. GONZÁLEZ; G. CHINEA y G. PADRÓN (1992). Mass Spectrometry in Protein Analysis. Biotecnología Aplicada **9**(1):1-15.
36. SUTHERLAND, J.C.; A. EMRICK; L.I. FRANCE; D.C. MONTELEONE and J. TRINK (1992). Circular Dichroism user Facility at the National Syndrotron Ligrit Source. Estimation of protein secondary Structure. BioTechniques **13**(4): 588-590.
37. BRIGGS, J. y P. R. PAUFELI (1991). Quantitation of DNA and Protein Impurities in Biopharmaceuticals. Anal. Chem. **63**(9): 850-859.
38. ANICETTI V. R.; E.F. FELISKENS; B.R. REED; A.B. CHEN; P. MOORE; M.D. GEIER and A.J.S. JONES (1986). Immunoassays for the detection of E.coli proteins

in recombinant DNA derived human growth hormone. Journal of Immunological Methods **91**:213-224.

39. ANICETTI, V.R. (1990). Improvement and Experimental Validation of protein impurity Immunoassays for Recombinant DNA products. ACS Symposium Series Analytical Biotechnology.
40. FEDERECI, M.M.; R.L. GARNICK y G. GEIGERT (1991). A perspective on Reference Standard and Reference Materials in Biotechnology derived Pharmaceutical Protein Products. Pharmaceutical Forum, 2683-2687.
41. WHO Expert Committee on Biological Standarization (1992). WHO Technical Report Series N **822**:1-80.
42. Vrankx, R.P.H.L. (1983). Potency test for Hepatitis B Virus Vaccines in Laboratory Animals. Develop. Biol. Standard **54**:63-70.
43. RIGGIN, R.M.; C.J. SHARR; G.K. DOULLA; D.S. LEFEBEr y D.J. MINER (1988). High Performance Size-Exclusion Chromatographic determination of the potency of Biosynthesis Human Growth Hormone products. Journal of Chromatography **435**:307-318.
44. GENERAL INFORMATION (1992). BioTechnology Derived Articles [1045] Severth Supplement USP-NF 3149-3158.
45. REQUIREMENTS FOR BIOLOGICAL SUBSTANCES AND OTHER SETS OF RECOMMENDATIONS (1973). WHO Technical Report Series N **530**:40-61.
46. USP XXII/NF XVII (1990). United States Pharmacopeial Convention, Rockville, M.D. 1483-1488.
47. SCHIFF, L.J.; W.A. MOORE; J. BROWN and M.H. WISHER (1992). Lot release. Final Product Safety testing for Biologics. Biopharm 36-39.
48. REQUIREMENTS FOR HEPATITIS B VACCINES MADE BY RECOMBINANT DNA TECHNIQUES (1989). WHO technical Report Series N **786**:38-71.