# ENSAYOS DE CONTROL Y ESPECIFICACIONES DE CALIDAD PARA EL INTERFERON ALFA 2b HUMANO RECOMBINANTE.

Tania Currás, Miriela Gil, Raúl A. Poutou, Joel Ferrero, Eliana Pérez, Mayda Martínez, Galina Moya, Jorge L. López, Makis Tórres, Marlene Almazán, Regla Estrada, Marisel Quintana.

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

Recibido ennoviembre de 1993. Aprobado en febrero de 1994

Key words: IFN $\alpha$ 2b hum-rec., protein, quality control,

## SUMMARY

This work present the control techniques and the quality specifications that human recombinant alpha 2b interferon expresed and produced in Escherichia coli cells have to pass, in order to show its identity and security as a drug.

The results of 10 batches of Active raw material were shown as an apirogenic and steril product, with a specific activity higher than 1 x $10^8$ UI/mg of proteins, levels of host strain contaminants (E. coli) under the limits established by international organizations for recombinant products and levels of purity higher than 97%. Besides, the results from 10 batches of three million unit, each of the final liofilized product, are shown here.

## RESUMEN

Este trabajo presenta las técnicas de control y las especificaciones de calidad a cumplimentar para demostrar la identidad y seguridad en el uso como medicamento del interferón alfa 2b humano obtenido por vía recombinante, expresado en Escherichia coli.

Se presentan los resultados de 10 lotes de materia prima activa que mostraron un producto apirogénico, estéril, con una actividad específica superior a 1 x $10^8$ UI/mg de proteína, niveles de contaminantes de la cepa hospedera (E. coli) por debajo de los límites establecidos internacionalmente para productos recombinantes y niveles de pureza por encima del 97%. Además se muestran los resultados de 10 lotes de tres millones de unidades del producto terminado en forma liofilizada.

## INTRODUCCION

El interferón alfa humano constituye una familia de cerca de 13 subtipos de interferones diferentes (1) con actividad antiviral, inmunomoduladora y antiproliferativa (2). Las herramientas de la ingeniería genética han permitido la obtención de interferones humanos recombinantes, biológicamente activos, expresados en microorganismos y células de organismos superiores.

En nuestro proceso de purificación, el interferón alfa 2b humano recombinante (IFN $\alpha$ 2b hum-rec.) aparece asociado al debris celular, desde donde es solubilizado y renaturalizado después de un protocolo de lavado del pellet celular. Este proceso incluye el uso de anticuerpos monoclonales específicos que reconocen el interferón $\alpha$ 2b humano activo de las formas no activas (3). El IFN $\alpha$ 2b hum-rec. obtenido a través de este proceso tiene una actividad específica superior a 1 x $10^8$ UI/mg de proteína total, es una cadena polipeptídica simple de 18 kDa conteniendo 4 residuos de cisteína (4).

Para demostrar la consistencia y la pureza tanto del ingrediente activo (materia prima activa) como del producto final liofilizado se realizan diferentes análisis de identificación, potencia, pureza y seguridad, avalados por las técnicas establecidas internacionalmente, validados y calibrados contra patrones de referencia, y recogidos en procedimientos patrones de operación (PPO).

## MATERIALES Y METODOS

### Reactivos

Todos los reactivos usados en estas técnicas fueron calidad analítica, obtenidos de MERCK, BDH, Aldrich, GIBCO, OXOID, Sigma y Boehringer.

### Ensayos de Identificación

- Cuantificación de interferón alfa 2b humano recombinante por un ELISA tipo sandwich. Se efectúa según la técnica reportada por Pérez et al. (5).

Se utilizó un patrón de trabajo de IFN purificado, calibrado contra el patrón internacional de IFN $\alpha$ 2b hum-rec. Ga 23-902-530 (6).

### - Control de pureza por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-RP)

Se efectúa según la técnica reportada por Moya et al. (7).

### - Análisis de aminoácidos por intercambio iónico

Se efectúa según la técnica reportada por Morera et al. (8).

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

### - Características organolépticas

En la materia prima activa se verificó a contraluz la transparencia y la ausencia de sólidos en suspensión.

Para el producto final liofilizado se verificaron tamaño y color de la pastilla de liofilización, además, añadiendo diluyente a 5 bulbos de la muestra de ensayo se verificaron a contra luz la transparencia y color de la solución.

## Ensayos de Potencia

### - Determinación de la actividad antiviral por hemaglutinación

Se efectuó según la técnica reportada por Ferrero et al. (9) para cuantificar el título (actividad biológica) de la materia prima activa y el producto final liofilizado del IFN $\alpha$ 2b hum-rec.

### - Determinación de la Actividad Específica

La actividad específica se calculó como el cociente entre la actividad antiviral (en unidades internacionales) y la cantidad de proteínas totales presentes en la preparación.

### - Determinación de la concentración de proteínas

Se efectuó según la técnica reportada por Lowry et al. (10).

Se utilizó como patrón de referencia una preparación de Suero de Albúmina Bovina (BSA) (MERCK, Alemania), con un 90% de pureza, y con el contenido conocido de nitrógeno proteico de acuerdo al método de Kjeldahl (11). Las alícuotas del patrón (conservadas a 4°C) fueron procesadas simultaneamente con las muestras.

## Ensayos de pureza

### - ELISA para cuantificar las proteínas contaminantes de la cepa hospedera en la materia prima activa del IFN $\alpha$ 2b humano recombinante

Este inmunoensayo permitió cuantificar las proteínas contaminantes de la cepa hospedera en la materia prima activa del IFN $\alpha$ 2b hum-rec. El método se basa en la cuantificación inmunológica de proteínas utilizando antisueros específicos contra el patrón de proteínas de la célula hospedera. El reconocimiento de las proteínas contaminantes se detectó por marcaje enzimático del anticuerpo conjugado con peroxidasa, en presencia de un sustrato.

Los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno Maxisorp (Nunc, Alemania) se recubrieron durante 16 h a 4°C con 100 $\mu$L del anticuerpo policlonal anti proteínas de E. coli, disuelto en solución tampón de 0.1 M $Na_2CO_3$ y 0.1M $NaHCO_3$, pH 9.6 a una concentración previamente determinada en un ensayo de titulación. Este anticuerpo se obtuvo por el método de inmunización por cascada y se purificó por afinidad. La placa se lavó con SSTF conteniendo 0.05% Tween-20. El bloqueo se realizó durante 1 h a 37°C en 200 $\mu$L por pozo de 1% leche deslipidizada en SSTF. A continuación se adicionaron 100 $\mu$L del patrón, los controles y las muestras previamente diluidas en 0.05% Tween-20 en SSTF y se incubó a 37°C durante 1 h, al cabo de la cual se realizaron 3 lavados con SSTF y Tween-20. Se adicionaron 70 $\mu$L por pozo del conjugado (anticuerpo policlonal anti proteínas de E. coli-peroxidasa) diluido convenientemente en 1% de leche deslipidizada y 0.05% de Tween-20 en SSTF y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, al cabo de la cual se repitieron 6 lavados. La reacción se desarrolló con 100 $\mu$L de 0.04% de ortofenilendiamina y 0.04% de $H_2O_2$ en tampón fosfato-citrato, pH 5.5, en oscuridad durante 20 min y se detuvo con 50 $\mu$L de una solución de 2 M $H_2SO_4$ y se leyó la densidad óptica a 492 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan (Flow Laboratories, Alemania).

### - ELISA para la determinación cuantitativa de inmunoglobulinas de ratón (12, 13)

Este es un ensayo inmunoenzimático de fase sólida, tipo sandwich, donde el anticuerpo contenido en la muestra es capturado por un anticuerpo policlonal contra la IgG de ratón en conejo/carnero, acoplado a la fase sólida (placas de microtitulación de poliestireno Maxisorp [Nunc, Alemania]). El reconocimiento de las IgG de ratón se detectó por marcaje enzimático del anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa en presencia de un sustrato.

Los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno Maxisorp (Nunc, Alemania) se recubrieron durante 16 h a 4°C con 100 $\mu$L de anticuerpo policlonal contra la IgG de ratón, disuelto en solución tampón de 0.1 M $Na_2CO_3$ y 0.1 M $NaHCO_3$, pH 9.6 a una concentración previamente determinada en un ensayo de titulación. La placa se lavó con SSTF conteniendo 0.05% Tween- 20. El bloqueo se realizó durante 30 min a 37°C en 100 $\mu$L por pozo de 1% leche deslipidizada en SSTF. A continuación se adicionaron 100 uL del patrón, los controles y las muestras previamente diluídas en 1% de leche deslipidizada y 0.05% Tween-20 en SSTF y se incubó a 37°C durante 1 h, al cabo de la cual se realizaron 4 lavados con SSTF y Tween-20. Se adicionaron 100 $\mu$L por pozo del conjugado (anticuerpo policlonal contra la IgG de ratón-peroxidasa) diluido convenientemente en 1% de leche deslipidizada y 0.05% de Tween-20 en SSTF y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, al cabo de la cual se repitieron 4 lavados. La reacción se desarrolló con 100 $\mu$L de 0.04% de ortofenilendiamina y 0.04% de $H_2O_2$ en tampón fosfato-citrato, pH 5.5, en oscuridad durante 15 min, se detuvo con 50 $\mu$L de una solución de 2 M $H_2SO_4$ y se leyó la densidad óptica a 492 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan (Flow Laboratories, Alemania).

Para el cálculo de la concentración de IgG presente en la muestra se utilizó el programa Symphony (Lotus Development Corporation, USA), donde se realizó un ajuste parabólico a la curva de calibración.

### - Detección de ADN de E.coli por la técnica de hibridación

Se aplicó sobre un filtro de nylon Hybond N (Amersham, Inglaterra), utilizando un equipo Manifold (BioRad, USA), ADN de E. coli purificado según Sambrook et al. (14) para la curva patrón (1 ng, 500 pg, 250 pg, 125 pg, 62 pg, 31 pg, 16 pg, 8 pg), 100 $\mu$g de proteína de la muestra a ensayar, y 100 $\mu$g de BSA Fracción V como control negativo, previamente desnaturalizadas durante 5 min a 95°C en un bloque térmico. El filtro de nylon se trató con una solución desnaturalizante de 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH, durante 5 min a temperatura ambiente y se dejó secar 30 min al aire antes de exponerlo a luz UV, (envuelto en saranwrap), en un transiluminador (Bioblock, Francia) a 320 nm durante 3 min. Se colocó el filtro con solución prehibridadora (0.9 M NaCl, 0.12 M Citrato de Sodio, 0.1% Ficoll 400, 0.1% Polivinilpirrolidona, 1 mg/mL BSA Fracción V, 0.5% SDS, 50% Formamida) y 100 $\mu$g/mL de $t_{RNA}$ de levadura, durante 2 h a 42°C. La hibridación se realizó utilizando una sonda marcada con $^{32}P$ (CIGB, Cuba) a razón de $10^6$ cpm/mL, en la solución de prehibridización durante 14-16 h a 42°C. El filtro se lavó

dos veces durante 15 min con solución de lavado conteniendo 0.3 M NaCl, 0.04 M Citrato de Sodio, 0.1% SDS y dos veces con 0.03 M NaCl, 0.004 M Citrato de Sodio, 0.1% SDS. El filtro se expuso, (envuelto en saranwrap) a un film de rayos X a -70°C durante 48 h. La cantidad de ADN contaminante presente en la muestra se determinó comparando la intensidad de su señal con los diferentes puntos de la curva de ADN de E. coli.9

### - Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Se efectuó según la técnica reportada por Laemmli et al (15), en sistema vertical con SDS en un gel de poliacrilamida del 12.5%, a corriente constante de 30 mA y voltaje inicial de 120 V. Se aplicaron 20 $\mu$g de proteína en condiciones de reducción y no reducción para los geles teñidos usando el método de tinción con Coomassie (16, 17) y 10 $\mu$g de proteínas en condiciones de reducción y no reducción para los geles teñidos usando el método de tinción con nitrato de plata (18). Se utilizaron patrones de peso molecular calibrados contra un patrón de proteínas (Sigma) y un patrón de trabajo de IFN $\alpha$ 2b hum-rec. (0192) preparado en el CIGB. Se evaluaron los geles teñidos con azul de Coomassie por densitometría (Laser 2202 Ultroscan, LKB- Bromma, Suecia).

## Ensayos de seguridad

### - Prueba de pirógenos

La prueba de pirógenos en conejos se realizó según los requerimientos de la USP XXII/90 (19), tanto a la materia prima activa como al producto final liofilizado de IFN $\alpha$ 2b hum-rec. Se aplicó una dosis de 1.5 x 105 UI/Kg de peso del animal.

### - Prueba de Esterilidad

La prueba de esterilidad se realizó según los requerimientos de la USP XXII/90 (19), tanto a la materia prima activa como al producto final liofilizado de IFN $\alpha$ 2b hum-rec.

### - Prueba de Toxicidad Anormal

La inocuidad se determinó según la Farmacopea Británica (BP-88) (20). Se evaluó cualitativamente la toxicidad mediante una dosis única de 6 x 105 UI/animal. Se utilizaron ratones de la línea OF-1 con 203 g y curieles con 250-350 g de peso.

**Tabla 1**

Pruebas, especificaciones de calidad y resultado de 10 lotes de materia prima activa de IFN $\alpha$ 2b hum-rec.

| PRUEBAS Y ESPECIFICACIONES | LOTES | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3027 | 3028 | 3029 | 3030 | 3031 | 3032 | 3033 | 3034 | 3035 | 3036 |
| **Características Organolépticas** Líquido incoloro, Libre de partículas en suspensión | CUMPLE | | | | | | | | | |
| **Inmunoidentificación** Identificado | IDENTIFICADO | | | | | | | | | |
| **Actividad Específica** Actividad biológica/ Lowry $\geq 1 \times 10^8$ UI/mg | 1.7 | 2.2 | 2.1 | 2.8 | 1.8 | 1.8 | 1.1 | 1.0 | 1.0 | 1.5 |
| **Composición de aminoácidos** Correspondiente con la secuencia aminoacídica conocida. | CUMPLE | | | | | | | | | |
| **RP-HPLC** Pico mayoritario correspondiente al IFN$\alpha$2b hum-rec., en el tiempo de retención esperado | CUMPLE | | | | | | | | | |
| **Determinación de IgGcontaminante** ≥ 100 ppm | 15 | 23 | 19 | 23 | 22 | 22 | 15 | 14 | 13 | 15 |
| **Determinación de ADN contaminante** ≤ 10 pg/dosis | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| **Determinación de proteínas contaminantes de** E. coli ≤ 100 ng/dosis | 18 | 6 | 5 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 |
| **Pureza por SDS-PAGE** 97% de pureza, ≤ 3%oligómeros, sin degradación. | 98 | 100 | 100 | 99 | 97 | 99 | 97 | 98 | 97 | 98 |
| **Esterilidad** Pasa la prueba. | PASA LA PRUEBA | | | | | | | | | |
| **Pirógenos** Pasa la prueba | PASA LA PRUEBA | | | | | | | | | |

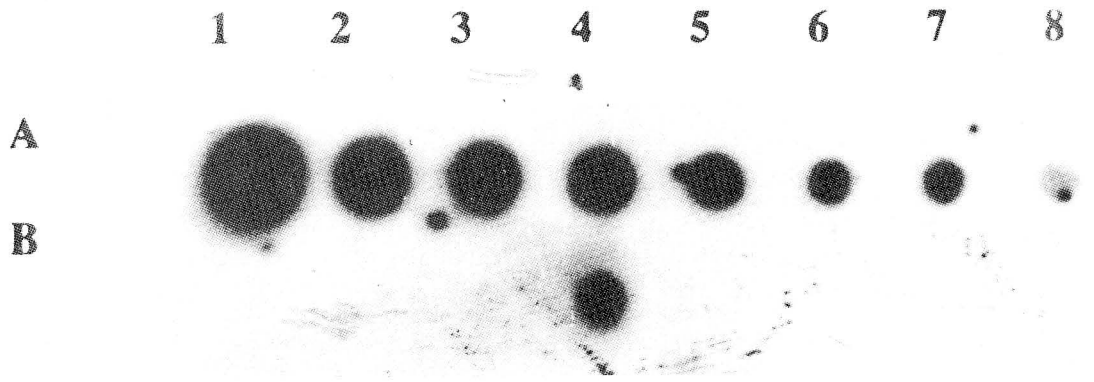


**Fig. 1**: Dot-blot para la detección de trazas de ADN contaminante por hibridación, empleando el marcaje con fósforo radiactivo ($^{32}P$). A- Curva patrón ADN de E.coli (1- 1 ng, 2- 500 pg, 3- 250 pg, 4- 125 pg, 5- 62 pg, 6- 31 pg, 7- 16 pg, 8- 8 pg). B- Muestra aplicada 100 $\mu$g de proteína (6.6 dosis de IFN $\alpha$ 2b hum-rec.).

### Otros análisis

**- Determinación de pH**

Se efectuó según los requerimientos de la USP XXII/90 (19), tanto para el ingrediente activo como para producto final liofilizado.

**- Determinación de humedad**

Se procedió según lo establecido en la Farmacopeia Británica BP- 88 (20) utilizando un equipo marca Karl Fisher (Radiometer, Dinamarca).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran los ensayos que se le realizan a la materia prima activa de IFN $\alpha$ 2b hum-rec. y las especificaciones de calidad que rigen la aprobación de los lotes, para fabricar la forma terminada del medicamento.

Además se muestran los resultados de 10 lotes de producción que permiten constatar la consistencia del proceso productivo y la calidad de los ingredientes activos, líquidos incoloros, libres de partículas en suspensión, apirogénicos y estériles, reconocidos por el sistema de anticuerpos específicos para el IFN $\alpha$ 2b hum-rec., con una actividad específica superior a 1 x $10^8$ UI/mg de proteína, niveles de contaminantes de la cepa hospedera (*E. coli*) por debajo de los límites establecidos internacionalmente para productos recombinantes (figura 1), con niveles de pureza por encima del 97% (figura 2), un peso molecular aproximado de 18 kDa (comprobado por SDS-PAGE) y una composición aminoacídica correspondiente con la secuencia establecida para el interferón.

En la tabla 2 se muestran los diferentes ensayos que se le realizan al producto final liofilizado de IFN $\alpha$ 2b hum-rec. y las especificaciones de calidad que rigen la aprobación de los lotes para su aplicación como

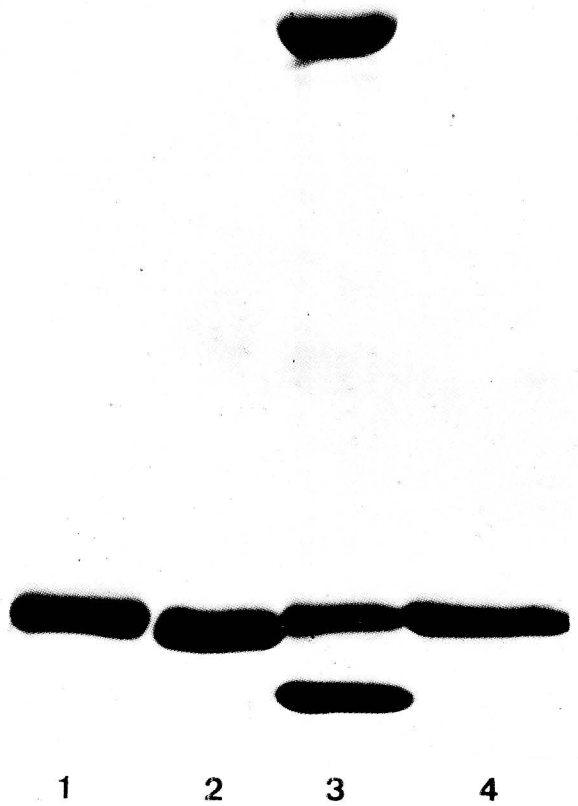


**Fig. 2**: Electroforesis en gel de poliacrilamida (12.5%) en presencia de SDS. Tinción con azul de Coomassie brillante. Cantidad de proteína aplicada 20 $\mu$g. 1-IFN $\alpha$ 2b hum-rec. reducido, 2-IFN $\alpha$ 2b hum-rec. sin reducir, 3- Patrón de pesos moleculares (67 kDa, 18 kDa, 14 kDa), 4-Patrón de IFN $\alpha$ 2b hum-rec. (18 kDa).

**Tabla 2:**
Pruebas, especificaciones de calidad y resultados de 10 lotes de Producto final liofilizado de 3 millones de unidades de IFN $\alpha$ 2b hum-rec.

| PRUEBAS Y ESPECIFICACIONES | LOTES | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3301 | 3302 | 3303 | 3305 | 3306 | 3307 | 3308 | 3309 | 3310 | 3311 |
| **Características Organolépticas.** Pastilla uniforme de color blanco que se disuelve fácilmente y no presenta rasgos de formación de espuma durante el proceso de liofilización. | CUMPLE | | | | | | | | | |
| **Inmunoidentificación** Identificado | IDENTIFICADO | | | | | | | | | |
| **Actividad biológica** 1 M UI 0.5-2 x$10^6$ UI/mL 3 M UI 1.5-6 x$10^6$ UI/mL 10 M UI ≥7 x$10^6$ UI/mL | 3.0 | 3.2 | 3.2 | 3.0 | 3.2 | 3.0 | 3.6 | 3.4 | 3.2 | 3.6 |
| **Esterilidad** Pasa la prueba. | PASA LA PRUEBA | | | | | | | | | |
| **Pirógenos** Pasa la prueba | PASA LA PRUEBA | | | | | | | | | |
| **Toxicidad anormal** Pasa la prueba | PASA LA PRUEBA | | | | | | | | | |
| **Humedad** ≤ 5% | 1.4 | 3.1 | 1.4 | 1.1 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | 0.9 | 0.4 | 0.0 |
| **pH** 6.8-7.2 | 6.8 | 6.9 | 6.8 | 6.9 | 6.9 | 6.8 | 7.6 | 6.9 | 6.8 | 6.9 |

medicamento en humanos. Además, se muestran los resultados de 10 lotes del producto terminado de tres millones de unidades, que presentan las siguientes características: pastillas uniformes de color blanco, de fácil disolución, apirogénicos, estériles e inocuos, reconocidos por el sistema de anticuerpos específicos para el IFN $\alpha$ 2b hum-rec, con una actividad biológica superior a los 3 x $10^6$ UI/mL, una humedad por debajo de 5% y un pH entre 6.8-7.2.

**Resultados de la validación de las técnicas analíticas**

Las técnicas usadas en el control de los lotes del IFN $\alpha$ 2b hum-rec. fueron validadas para demostrar que dichos métodos son confiables y específicos para su uso.

**- Cuantificación de IFN $\alpha$ 2b hum-rec. por un ELISA tipo sandwich**

El ensayo fue preciso y exacto (coef. variación interensayos 11.62% e intraensayos 8.08%) con porcientos de recuperación de 81.35-101.9%. El coeficiente de correlación lineal fue 0.99 y el ensayo altamente específico al dar valores en el orden del fondo de la placa frente a una muestra de interferón gamma.

**- Control de pureza por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-RP)**

El método fue selectivo para diferentes formas de la molécula y degradaciones de éstas (7). El coeficiente de variación para el porciento del área del pico principal fue 0.4% por día y menor que 0.5% entre días. Ambos parámetros fueron menores que 0.4% para los tiempos de retención, no existiendo diferencias significativas entre analistas. El método fue lineal entre 20 y 120 $\mu$g de proteínas con pendiente 1.45 y coeficiente de correlación 0.996.

**- Análisis de aminoácidos por intercambio iónico**

El coeficiente de variación para este ensayo fue 6.52%, con una recuperación composicional de un 95.03%.

**- Determinación de la actividad antiviral por hemaglutinación**

La exactitud del método la determinó el uso en cada placa de titulación del patrón de laboratorio calibrado contra el patrón internacional. La especificidad de la técnica se estudió realizando varios ensayos de actividad antiviral del interferón, utilizando células de distintas especies (Hep-2, WISH y un cultivo primario de prepucio fetal de origen humano, Vero de mono, RK- 13 de conejo, BHK-21 de hamster, L-929 de ratón, cultivo primario de embrión de pollo y MDBK bovina). La precisión del método se determinó a través de los criterios de repetibilidad y reproducibilidad, al titular una muestra de IFN alfa leucocitario crudo colocado a ciegas entre las muestras de control de la producción de cada día por un período de un año.

**- Determinación de la concentración de proteínas. (Método de Lowry)**

Los parámetros de la validación que caracterizan la curva patrón para este ensayo son: el rango lineal entre 10-500 $\mu$g/mL , el coeficiente de regresión para la curva de rango bajo (10 $\mu$g-100 $\mu$g) 0.998 y para la curva de rango alto (100 $\mu$g-500 $\mu$g)0.996, la exactitud del método está entre un 98-103%, el límite de detección es de 10 $\mu$g/m y el de cuantificación es de 20 $\mu$g/mL, la precisión exige no menos de 2 réplicas por concentración o muestra, los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad están caracterizados por un coeficiente de variación de un 5% y una desviación estandard de 0.04.

**- ELISA para cuantificar las proteínas contaminantes de la cepa hospedera en la Materia Prima Activa del IFN $\alpha$ 2b hum-rec.**

El ensayo fue preciso y exacto (coeficientes de variación interensayos menores de 15% para los tres controles) con porcientos de recobrado entre 80-120%. La relación entre las concentraciones de la curva patrón y las absorbancias se describió mediante un modelo lineal de primer orden (r = 0.995). Se demostró además la linealidad de la dilución para garantizar la condición de exceso de anticuerpos que se requiere en este tipo de ensayo, analizando tres lotes de ingrediente activo a diferentes diluciones, evidenciando que la respuesta fue directamente proporcional a la concentración del analito.

**- ELISA para la determinación cuantitativa de inmunoglobulinas de ratón**

Los parámetros de la validación que caracterizan la curva patrón para este ensayo son: el rango de la pendiente entre 0.005603-0.0104506, los coeficiente de variación intraensayo 7.8 e interensayo 13.4, límite de cuantificación de 10.36 ng/mL y un coeficiente de correlación lineal 0.98.

**- Detección de ADN de E. coli por la técnica de hibridación.**

La especificidad de la técnica se estudió siendo de un 100%, con un límite de detección de 7 pg de ADN de *E. coli*.

**- Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)**

La sensibilidad para este ensayo es de 0.2 $\mu$g, con coeficiente de variación intraensayo de 2% e interensayo de 3.8%

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos concluimos que existe un cumplimiento de los requerimientos establecidos por organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) (21) para la producción del interferón por la tecnología del ADN recombinante.

Los valores obtenidos para cada ensayo se encuentran dentro de los límites establecidos para la aprobación de los lotes de producción.

El proceso productivo del IFN $\alpha$ 2b hum-rec. presenta una alta consistencia, partiendo de la homogeneidad que aporta cada uno de los ensayos practicados por lotes, garantizando de forma significativa la producción y comercialización del producto.

Los resultados de los ensayos realizados (identificación, potencia, pureza y seguridad) garantizan la efectividad del producto y la seguridad para su aplicación en humanos.

## REFERENCIAS


1- DAVIS, J.M., M.A. NARACHI, H.L. LEVINE, N.K. ATTON and T. ARAKAWA (1987). Conformation and stability of two recombinant human interferon-alpha analogs. Int. J. Peptide Protein Res. **29**:685-691.

2- EICHMANN, E., V.A. MAJAROV, A.T. KOZHICH, F. NOLL and V.P. ZAV'YOLOV (1990). Biological activities of synthetic peptides of the sequence of human interferon-alpha. Immunology Letters, **24**:233-236.

3- QUIÑONES, Y., A. AGRAZ, A. SILVA, G. PADRON, C. MELLA, R. DIAZ, M. QUINTANA, M. GONZALEZ, V. BESADA, C. DUARTE, G. SIERRA, J. FERNANDEZ, R. UBIETA, J. MORALES, L. CASTELLANOS, V. MORERA, G. FURRAZOLA, M. MONTERO, A. SANTOS, A. DIAZ and L. HERRERA (1989). High purity Recombinant Human Alfa - 2 Interferon free from oligomeric forms in E.coli . High Lights Model. Biochemistry **2**:1237-1246.

4- PADRON, G., V. BESADA, A. AGRAZ, Y. QUIÑONES, L. HERRERA, Y. SHIMONISHI and T. TAKAO (1989). Mass Spectrometric analysis of Recombinant Human-2 Interferon. Analitica Chimica Acta **223**:361-369.

5- PEREZ, E.M., L.C. PEREZ, V. MARAÑON y C.M. MELLA (1991). Tratamientos analíticos de muestras de IFN alfa 2b h-rec. para su cuantificación por ELISA. Biotecnología Aplicada **8(3)**:392-399.

6- NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, National Institutes of Health, Freeza-Dried Reference Human Interferon Alpha [HUIFN-ALPHA (LEUKOCYTE/SENDAI)] (1984). Research Reference Reagent Note No. 29, Bethesda, Maryland 20205, January.

7- MOYA, G.M., L.C. COSTA and E.M. GONZALEZ (1993). Estudio de una preparación de Interferón Alfa Humano por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en fase reversa. Validación del método. Biotecnología Aplicada **11**:.

8- MORERA, V., I. NAZIMOV, V. CHEMYAKIN y L. CASTELLANOS (1989). Caracterización Química del interferón alfa 2 humano recombinante. Interferón y Biotecnología **6**:41-45.

9- FERRERO J., M.E. OCHAGAVIA, A. AGUILERA y S.P. LOPEZ (1993). Titulación de la actividad antiviral de Interferón utilizando el sistema de equipos "SUMA". Biotecnología Aplicada **11**:34-42.

10- LOWRY, O.H., N.J. ROSEMBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951). Protein measurement with the foling-phenol reagent, J. Biol. Chem, **193**:265-275.
11- HERNDOR, V.A. (1981). Kjeltec system II manual, Inc.
12- ENGVALL, E. and P. PERLMANN (1972). Enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochemistry **8**:871.
13- NAKANE, P.K. and G.B.PIERCE (1966). Enzyme labelled antibodies: Preparation of antigen, J. Histochem. and Citochem. **14**:929.
14- SAMBROOK J., E. F. FRISTSCH and T. MANIATIS (ed) (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
15- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavege of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature **227**:680-685.
16- Hoefer Scientific Instruments. Catalog 1988-1989.
17- HAMES B. D. and D. RICKWOOD (1981). Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. IRL Press.
18- WRAY W., T. BOULIKAS, V. P. WRAY and R. HANCOCK (1981). Analytical Biochemistry **118**:197-203.
19- USP XXII/ NFXVII, (1990). United State Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
20- BRITISH PHARMACOPEIA, LONDON, U.K. (1988). BP-88.
21- WHO (1988). Technical Report Series 771.