CONTROL ANALITICO Y ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO HUMANO RECOMBINANTE USADO COMO MATERIA PRIMA ACTIVA EN FORMULACIONES FARMACEUTICAS

Mayda Martínez, Tania Currás, Eliana Pérez, Alfonso Acosta, Ingrid Rojas, Marlene Almazán, Galina Moya, Luis C. Pérez

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

Key words: h-rec EGF, specifications of quality, methods of control

SUMMARY

In this work we describe several reproducible, precise and easy to perform techniques for the quality control recombinant human Epidermal Growth Factor as active raw material and also in the different final formulations for clinical use. The quality specifications of this substance are discussed, taking into account diferents techniques for the analysis.

RESUMEN

Se describen un conjunto de técnicas analíticas, precisas, reproducibles y de fácil ejecución, utilizadas en el control de calidad del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano Recombinante, que garantizan la calidad del producto tanto como materia prima activa, como formulado en diversas formas farmacéuticas de gran aplicación clínica. Se presentan y discuten las especificaciones de calidad de esta sustancia considerando diferentes técnicas de análisis.

INTRODUCCION

El auge de la tecnología del ADN recombinante ha hecho posible la producción a gran escala del Factor de Crecimiento Epidérmico humano-recombinante (FCE h-rec). Esta proteína resulta de mucho interés por su aplicación clínica. El FCE h-rec se aisló inicialmente de glándulas submaxilares de ratón macho adulto (Cohen, 1962); se ha encontrado en el hombre en fluidos corporales como la orina, el calostro, la saliva y el líquido amniótico; teniendo gran importancia debido a sus efectos estimulantes en el crecimiento y diferenciación de numerosos tipos celulares en cultivo y algunos tejidos *in vivo*. Su efectividad ha sido reconocida en el tratamiento de quemaduras, cicatrización y otras lesiones degenerativas de la piel. Para el control de los procesos de obtención de esta proteína se requiere de técnicas analíticas que garanticen la calidad de la materia prima activa así como de las diferentes formas farmacéuticas conteniendo FCE h-rec. El objetivo del presente trabajo es describir una metodología de rigor para el control analítico del FCE h-rec. como principio activo en formulaciones farmacéuticas.

MATERIALES Y METODOS

La materia prima activa de FCE h-rec fue suministrada por la división de producción del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB); esta se purificó por cromatografía de intercambio iónico según Cinza et al. (1989) Los reactivos utilizados en las técnicas de control son de calidad para análisis de la firma Merck (Alemania), excepto aquellos que estén especificados.

Procedimiento de las técnicas analíticas

Procedimiento de inmunoensayo (ELISA) para el análisis cuantitativo del FCE h-rec

Los anticuerpos monoclonales CB EGF 1 y CB EGF 2 -Peroxidasa (conjugado) utilizados en el ELISA (Freyre et al.,1989), fueron suministrados por la División de inmunotecnología y diagnóstico del CIGB. Este inmunoensayo es un ELISA de tipo **sandwich** de dos sitios según Pérez et al. (1990). Los pocillos de las microplacas (Nunc, Dinamarca) se recubrieron con 100 μL del anticuerpo monoclonal CB EGF 1 (Freyre et al., 1989) disuelto en solución tampón de Na_2CO_3 (0.1 M) y $NaHCO_3$ (0.1 M), pH 9.6 durante 3 h a 37°C. Posteriormente se realizó un lavado con solución detergente de Tween 20 al 0.05% en agua. Se aplicaron 100 μL (por duplicado) de cada punto de la curva patrón, los controles y las muestras previamente diluídas en el tampón de ensayo (tampón fosfato-salino y leche deslipidizada al 0.5%). Se incubó la placa durante 1 h a 37°C; se lavó 5 veces con solución de lavado. Se aplicaron 80 μL de conjugado (anticuerpo monoclonal CB EGF 2-Peroxidasa) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de 8 lavados se aplicaron 100 μL de la solución de sustrato cromogénico para dicha enzima, que contenía orto-fenilendiamina (0.04%) y H_2O_2 (0.04%) en tampón fosfato-citrato, pH 5.5. Al cabo de 20 min se detuvo la reacción con H_2SO_4 2M (50 μL) y se leyó la densidad óptica a 492 nm. Los datos se procesaron con un programa de ajuste lineal por el método de los mínimos cuadrados. Se calcularon la pendiente y el intercepto de la recta de mayor ajuste que se utilizó en la estimación de la concentración de las muestras problemas. El criterio de aceptación del ensayo fue una potencia de correlación $r^2 \geq 0.98$ y un valor del estadígrafo "F" de Fisher ≥ 500.

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

Tabla 1
Oligonucleótidos empleados como cebadores y sondas en la P.C.R.

CEBADORES		
Número	**Secuencia 5' - 3'**	**Posición en HIV1**
SK 100	ATCAAGCAGCCATGCAAAT	1377-139
SK 104	CCTTTGGTCCTTGTCTTATGTC	1646-166
SK 38	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT	1551-157
SK 39	CCTTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC	1646-166
SONDAS		
Número	**Secuencias 5' - 3'**	
PA 1	ATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAAT	
PA 2	GTAGGGCTATACATTCTTACTATTTTAT	

SK38/SK39, que pertenecen a la región del gag que codifica para la p24 y amplifican una banda de 115 pb, y SK100/SK104, que son oligonucleótidos cebadores del gag de la región que codifica para la p24 y amplifican una banda de 291 pb (tabla 1). El volumen de reacción fue de 100 μL y los ciclos empleados se describen en la tabla 2.

B) Detección del producto amplificado

La detección del producto amplificado se realizó mediante una electroforesis horizontal de ADN en gel de agarosa al 1%(8), corrida en solución tampón TBE 1X a 120 volts. Posteriormente se realizó una hibridación líquida (9).

Tabla 2
Ciclos empleados en la P.C.R.

Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
95	1 minuto	3
55		
72		
95	1 minuto	30
55	30 segundos	
72	1 minuto	
72	5 minutos	1

Se marcaron 50 ng de los oligonucleótidos PA1 y PA2, sondas específicas de ADN de HIV1 (tabla 1), en 3 μL de solución PNK (0.5 M de Tris-HCl pH = 7.6, 0.1 M de $MgCl_2$, 0.05 M de DTT, 1 M de espermidina y 0.1 M de EDTA pH 8), 50 μCi de [γ-^{32}P]ATP y 10 U de enzima PNK (Heber Biotec), el volumen final de reacción fue de 30 μL y se incubó a 37°C durante 1 h, la reacción se detuvo con solución de parada (0.5% de SDS, 0.1 M de NaCl y 0.025 M de EDTA).

Posteriormente se mezclaron 5 μL de la sonda con 10 μL de cada producto amplificado por la PCR, se desnaturalizó 5 min a 95°C y se incubó a 56°C durante 2 h. Seguidamente se añadieron 5 μL de solución tampón de aplicación (bromofenol azul 0.2%, glicerol 10%) a cada reacción y se corrió una electroforesis vertical de ADN en gel de acrilamida al 20%, en solución tampón TBE 1X a 200 volts. Una vez concluida la electroforesis se expuso el gel a un film de rayos X a temperatura ambiente durante 4 h.

C) Origen de las muestras y controles empleados

Controles positivos:

ADN total de células Jurkat infectadas con la cepa MN de HIV1

1- MN 1 μg

2- MN 0.25 μg

3- MN 0.1 μg

4- MN 0.1 μg

Controles negativos:

5- ADN de linfocitos de pacientes seropositivos al HIV2 (1 μg),

6- ADN de linfocitos de una paciente con leucemia de células T, infectadas con HTLV1 (1 μg)

7- Leuferón: 46 μg de proteína (Lote 2004 de IFN leucocitario liberado de ADN de HIV1, producido por el Centro de Investigaciones Biológicas de Cuba),

8- Control de Reactivo (mezcla de los reactivos que intervienen en el análisis)

9- ADN de células CEM (1 μg).

10- Control de Reactivo (mezcla de los reactivos que intervienen en el análisis)

Muestras:

Las muestras A, B y C corresponden a 1 μg de ADN de linfocitos de pacientes seropositivos al HIV1. Las muestras D, E y F son 1 μg de ADN de linfocitos de donantes sanos. Todas estas muestras forman parte del panel de muestras positivas y negativas del Laboratorio de Referencia de SIDA de Cuba, previamente evaluadas con los oligonucleótidos cebadores SK38/SK39 de la Perkin Elmer Cetus por el Ministerio de Salud y Bienestar Social de Canadá.

D) Diseño del experimento de validación

Para determinar la repetibilidad del método se realizaron dos PCR con cada uno de los juegos de oligonucleótidos cebadores (SK38/SK39 y SK687/SK69), manteniendo las mismas condiciones de reacción y el juego de muestras completo. La especificidad del método se evaluó utilizando diferentes controles negativos y positivos, como resultado del ensayo se tomó el de la hibridación líquida de los productos de la PCR.

El límite de detección se determinó realizándole la PCR a diferentes diluciones del control positivo, equivalentes a 1, 0.25, 0.1, 0.0001 μg del ADN blanco (HIV1).

RESULTADOS Y DISCUSION

De los experimentos realizados con los oligonucleótidos cebadores SK38/SK39 y SK100/SK104, con cada uno de los controles positivos y negativos y cada una de las muestras, se comprobó que la PCR es un método repetible, no encontrándose contradicción en los resultados obtenidos con cada uno de los juegos de oligonucleótidos cebadores (figura 1, resultado tipo).

Todas las diluciones realizadas al ADN de MN fueron amplificadas por PCR y detectadas por hibridación líquida con ambos juegos de oligonucleótidos cebadores, pudiéndose detectar con claridad y exactitud la última dilución probada que correspondía a 100 pg de ADN total de MN (figura 1).

En el ensayo de especificidad se comprobó que los oligonucleótidos cebadores empleados sólo amplificaron las muestras positivas a HIV1 y la muestra de HTLV1, en la que apareció una banda a la altura de la amplificada en el control positivo en la electroforesis de agarosa (no se muestran los resultados), pero esta banda no apareció en la hibridación líquida con la sonda específica para HIV1 (figura 1). Esto se debe a que el HTLV1 es un retrovirus y tiene regiones de homología con los oligonucleótidos cebadores empleados en la PCR. La especificidad del método, dada por los oligonucleótidos cebadores empleados en la PCR y principalmente por la sonda empleada en la hibridación líquida, fue 100%.

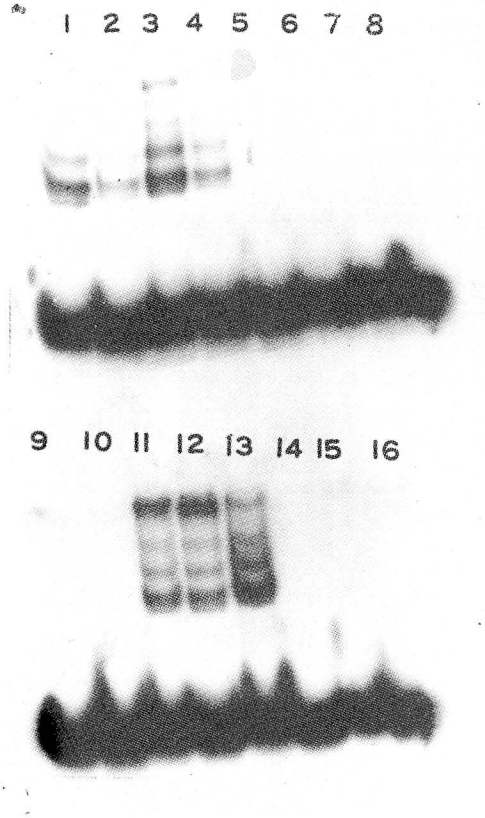

Fig. 1. Hibridación líquida de la PCR realizado con los oligonucleótidos cebadores SK100/104. 1-MN 1 μg, 2-MN 0.25 μg, 3-MN 0.1 μg, 4-MN 0.0001 μg, 5-HIV2 1 μg, 6-HTLV1 1 μg, 7-Leuferón: 46 μg de proteína, 8 y 10-CR, 9-CEM , 11-Muestra A 12-Muestra B, 13-Muestra C, 14-Muestra D, 15- Muestra E, 16-Muestra F.

En las muestras estudiadas los resultados encontrados coinciden con los esperados, por lo que consideramos que la PCR diseñado cumple con los requisitos de repetibilidad y especificidad (como método del grupo C) para la detección de ADN de HIV1, lo que permite su uso en el Control de Calidad de los productos derivados de la Sangre. En el experimento se detectaron 100 pg de ADN cromosomal, equivalentes a 0.3 fg de ADN blanco de HIV1, que fue la menor cantidad de ADN analizada, lo cual es considerado eficiente para la detección de ADN de HIV1 como contaminante en hemoderivados.

REFERENCIAS

1.- SAIKI, R.K.; D.H.GELFAND; S. STAFFEL; S.J. SCHORT; R. HIGUCHI; G.T. HORN; K.B. MULLIS and H.A. ERLICH, (1988). Primers directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**:487.

2.- ABBOTT, M.A.; B.J. PAISZ; B.C. BYRNE; S. KWOK; T.J. SNINSKY and G.D. ERLICH (1988). Enzymatic Gene Amplification: Qualitative and Quantitative Methods for detecting proviral DNA amplified in vitro. Journal of Infectious Diseases. **158**:1158.

3.- RAMPAZZO, P. (1990). Standarization and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. 807-815.

4.- GUERRA, J. (1986). Validation of analytical methods by FDA laboratories I, Pharm. Technol. **10(3)**:74-78.

5.- FINKELSAN, M.J. (1986). Validation of Analitical methods by FDA laboratories II, Pharm. Technol. **10(3)**:79-84.

6.- UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION (1990). Validation of compendial methods. USP XXII/NF XVII, Rockville.

7.-THE OFFICE OF OFFICIAL PUBLICATION OF THE EUROPEAN COMMUNITY INFORMATION SERVICE (1990). Analytical Validation. The rules governing medicinal products in the European Community Washington. D.C. 1-16.

8.- SAMBROOK, J.; E.F. FRISTSH and T. MANIATIS (1989). Molecular cloning a Laboratory Manual. Second edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

9.- CHARON, C. (1989). Use of drive blood spot especiment in the detection of human immunodeficience virus type I by the Polymerase Chain Reaction. Journal of Chemical Microbiology. **29(4)**:667-671.