ESTUDIOS DE EXTRACCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO EN CREMAS DE INTERFERÓN HUMANO (α-2B RECOMBINANTE Y LEUCOCITARIO)

✉ Idalmis Reverón,[1] Alberto Agraz[1] y Luis C Pérez[2]

[1]*División de Desarrollo Biofarmacéutico,* [2]*Departamento de Estudios Clínicos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 8675; E-mail: desarrollo@cigb.edu.cu*

ABSTRACT

Extraction and quantitation studies of the active ingredient from an hydrophilic (potassium estearate)cream prepared either with recombinant or leukocyte human interferons, were done. The cream samples were treated with different extraction solutions including acids, alkali, surfactants and organic solvents. Recombinant alpha interferon (IFN) was best extracted using acetone (1-5 %) or using a two phase extraction system composed by diethyl ether: H_2O (1:1). With this solutions about 80 % of the active ingredient was recovered from the cream. In the case of leukocyte IFN, the two phase extraction system using diethyl ether: H_2O (1:1) extracted up to 95 % of the IFN. In addition other cream bases were assayed for the formulation of the IFNs creams. High recovery (99 %) of the active ingredient was obtained using diethyl ether: H_2O (1:1) for the following creams: a) Potasium estearate, b) base composed of polysorbate 80 (0.83 %), propylenglycol (10 %), cetilyc alcohol (1.14 %), glyceride monoestearate (6.67 %), methylparabene (0.18 %), propylparabene (0.02 %), H_2O: csp, combined with carbopol 940 gel to 0.5 %, and c) the same as b) without carbopol 940.

Key words: extraction, cream, quantitation, recombinant alpha IFN, leukocyte IFN, base

Biotecnología Aplicada 1998;15:93-97

RESUMEN

En el presente trabajo se realiza el estudio para el establecimiento de un protocolo en la determinación del interferón (IFN) humano (α-2b recombinante y leucocitario) presente en la crema (ungüento hidrófilo con base de estearato de potasio). Los ensayos de extracción fueron realizados con cremas preparadas a diferentes concentraciones 50, 100, 200, 300 y 400 ng IFN/g crema. Fueron probados diferentes medios de extracción, entre ellos: ácidos, álcalis, detergentes y solventes. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear el sistema de dos fases dietil éter: H_2O (1:1) o una solución de acetona entre 1 y 5 % como solución de extracción, y se lograron del 70 al 80 % de recuperación de la molécula de IFN α-2b Hu-r, mientras que en el caso del IFN leucocitario se obtuvo una recuperación de más del 95 % cuando se empleó el sistema de dos fases dietil éter: H_2O (1:1). Se evaluaron otras bases como posibles alternativas para la formulación del principio activo y se realizaron extracciones con diferentes agentes. Se logró un recobrado analítico del 99 % con el sistema de 2 fases dietil éter: H_2O (1:1), para las siguientes bases: a) base de estearato de potasio, b) base compuesta por polisorbato 80 (0,83 %), propilenglicol (10 %), alcohol cetílico (1,14 %), monoestearato de glicerilo (6,67 %), metil parabeno (0,18 %), propil parabeno (0,02 %), H_2O: csp combinada con gel de carbopol 940 al 0,5 %, y c) sin gel carbopol 940 e incorporándole polisorbato 80.

Palabras claves: extracción, crema, cuantificación, IFN α-2b Hu-r, IFN leucocitario, base

Introducción

A partir de su descubrimiento por Isaacs y Lindenmann (1) los interferones han sido proteínas de gran interés sobre todo por su capacidad de encontrarse a la vanguardia en el sistema de defensa del organismo.

De acuerdo con sus propiedades antigénicas, biológicas y químicas, los interferones se dividen en tres grupos: interferón α leucocitario y linfoblastoide, interferón β fibroblastoide e interferón γ inmune (2).

El efecto biológico de esta proteína está dado primeramente por su acción antiviral al interactuar con receptores específicos en la superficie de la célula, que provocan reacciones en cadena y síntesis de ciertas enzimas, que intervienen en la inhibición de la replicación viral. También son reportadas sus propiedades antitumorales, así como su efecto inmunomodulador en el organismo (2).

Su eficacia terapéutica ha sido demostrada con resultados exitosos, en la aplicación terapéutica de algunas enfermedades virales como por ejemplo: dengue hemorrágico, virus tipo II (3), hepatitis virales fulminantes y crónicas (4), en neoplasia del pulmón (5). Se ha aplicado con éxito en enfermedades cutáneas como el herpes zóster (6) y en pacientes con verrugas plantares (7), entre otras.

✉ Autor de correspondencia

1. Isaacs A, Lindenmann J. Virus Interference. Proc Soc London 1957;Ser B147: 258-267.

2. Cantell K. Una gota de agua en un océano: ideas sobre los interferones. Interferón y Biotecnología 1984;1:1-10.

3. Limonta M, Alemañy J, Peláez O, López-Saura P, Aguilera A, Más P *et al.* Tratamiento local con interferón leucocitario en la conjuntivitis hemorrágica aguda. Memorias I Seminario cubano sobre Interferón 1983;87-108.

En el siguiente trabajo se describe la evaluación de diferentes medios para la extracción del interferón (IFN) humano (α-2b recombinante y leucocitario) de una crema medicamentosa con el fin de establecer un protocolo que permita la cuantificación de la molécula y pueda ser utilizado como método analítico para el control de calidad.

En general para el caso de semisólidos se requieren pasos adicionales de extracción del principio activo. Cremas a base de interferones han sido utilizadas para el tratamiento de varias enfermedades. En ellas, el interferón ha sido extraído mediante etanol ácido o con el medio de ensayo de interferón. También se reporta la liberación del IFN de la crema traspasándolo al medio mediante incubación durante algunas horas, a 37 °C (2).

Materiales y Métodos

Procedencia del principio activo (IFN α-2b Hu-r e IFN leucocitario)

Se utilizó IFN α-2b Hu-r purificado, obtenido mediante clonaje y expresión del gen en *Escherichia coli* (8) e IFN leucocitario purificado, producido a partir de donaciones de sangre, por el método de Cantell (9).

Composición de la base de estearato de potasio utilizada en la formulación del IFN α-2b Hu-r

Composición: ácido esteárico 18 %, carbonato de potasio anhidro 0,05 %, metil parabeno 0,18 %, propil parabeno 0,02 %, glicerina 5 %, agua purificada 76,3 % y principio activo 20 000 UI/g (100 ng/g).

Composición de las diferentes bases evaluadas como posibles alternativas para la formulación del IFN

Todas las bases evaluadas constituyen una emulsión de aceite en agua y su composición está referida al porcentaje de cada componente en el agua.

Base No. 2

Constituida por: PEG 4000 (32 %), PEG 400 (68 %) y H_2O: csp.

Base No. 3

Constituida por: glicerina (5 %), ácido esteárico (15 %), carbonato de potasio (0,6 %), metil parabeno (0,18 %), propil parabeno (0,02 %) y H_2O: csp.

Base No. 4

Constituida por: polisorbato 80 (0,83 %), propilenglicol (10 %), alcohol cetílico (1,14 %), monoestearato de glicerilo (6,67 %), metil parabeno (0,18 %), propil parabeno (0,02 %) y H_2O: csp, carbopol 940 al 0,25 %.

Base No. 5

Constituida por: laurilsulfato de sodio (1 %), petrolato blanco (25 %), alcohol estearílico (25 %), propilenglicol (12 %), metil parabeno (0,025 %), propil parabeno (0,025 %) y H_2O: csp.

Base No. 6

Estas bases varían su composición en el contenido de polisorbato 80, pero son similares en los siguientes compuestos:

- Propilenglicol (10 %), alcohol cetílico (2,27 %), monoestearato de glicerilo (13,33 %), metil parabeno (0,18 %), propil parabeno (0,02 %) y H_2O: csp.
- Base (6.a) constituida además por 1,65 % de polisorbato 80.
- Base (6.b) constituida además por 3,3 % de polisorbato 80.
- Base (6.c) constituida además por 5 % de polisorbato 80.

Forma de preparación de las cremas

Se prepararon cremas a diferentes concentraciones de IFN natural y leucocitario: 50, 100, 200, 300 y 400 ng IFN/g crema.

Una vez definidos los gramos de crema necesarios para cada ensayo, se le añade el principio activo de acuerdo a la concentración a la cual se desea preparar y se agita vigorosamente a una temperatura de 4 °C por espacio de 1 min.

Procedimiento para la extracción

Se preparó la crema a razón de 100 ng IFN/g crema (20 000 UI IFN/g crema). Para cada extracción se tomaron 2 g de crema, y se disolvieron en 20 mL de solución.

Los medios de extracción utilizados fueron: ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), etanol 90 %, tween 80, dodesilo hidrógenosulfato sal sódica (SDS) (Merck, Alemania), acetonitrilo, acetoña, éter de petróleo, dietil éter y cloroformo (Fluka, Suiza), tampón salino de potasio (PBS) y acetato de sodio 0,1 M (Merck, Alemania).

Seguidamente se procedió a la homogenización de la crema y la solución de extracción durante 1 min. En algunos casos se probó el uso de agentes mecánicos durante la homogenización: dispersor (tipo politrón, IKA, Alemania) y ultrasonido (B. Braun, Alemania).

Todos los ensayos de extracción se realizaron a 4 °C.

Una vez realizada la extracción, las muestras son centrifugadas a 16 000 rpm durante 10 min. La fase acuosa fue colectada y sometida a análisis para la cuantificación de la molécula de IFN mediante el uso de las técnicas de titulación antiviral (10) y ELISA (11).

4. Visco G. Experiencias clínicas con interferones en hepatitis viral fulminante y crónica. Memorias I Seminario Cubano sobre Interferón y Biotecnología 1983; 301-308.

5. Selman E. Monopeizoble lung cancer treatment using leukocytes interferon and radiaction therapy obtained in the first 10 cases. Interferón y Biotecnología 1986;3:142.

6. Díaz R. Usos del interferón alfa en herpes zóster. Interferón y Biotecnología 1988;5:47-52.

7. Sagaró B. Uso del interferón leucocitario humano en verrugas plantares. Interferón y Biotecnología 1988;5:59-65.

8. Quiñones Y, Agraz A, Silva A, Padrón GJ, Mella C, Díaz R *et al.* High purity recombinant human alpha-2 interferon free from oligomeric forms in *E. coli*. Highlights Modern Biochem 1989;2: 1237-1246.

9. Cantell K, Hirvonen S, Koistinen V. Partial purification of human leucocyte interferon on a large scale. Methods in Enzymology 1981;499-504.

10. Barcelona S. Determinación de la actividad de interferón. Memorias I Seminario Cubano sobre IFN 1983;4-6.

11. Cruz S, Duarte C, Ferrá E, Fontirroche G, Vázquez J, Martínez L *et al.* Cuantificación de interferón α-2b humano recombinante mediante anticuerpos monoclonales Biotecnología Aplicada 1990;7:132-141.

Cada ensayo de extracción fue realizado con dos réplicas.

Los porcentajes de extracción en la crema fueron determinados teniendo en cuenta la cantidad de IFN extraído al utilizar el método descrito anteriormente, en relación con la cantidad que se adiciona a la crema en la preparación de cada muestra.

El procedimiento empleado en cuanto a la forma de preparación y extracción es válido para las restantes cremas preparadas a 50, 200, 300 y 400 ng IFN/g.

Actividad biológica

La actividad biológica del IFN α-2b Hu-r fue determinada a través de la inhibición del efecto citopático del Mengovirus en células Hep 2 (10).

ELISA

Las determinaciones por ELISA se realizaron utilizando un sistema de dos anticuerpos monoclonales según método descrito por Cruz, 1990 (11).

Los datos son procesados por un análisis de regresión y correlación.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de extracción del IFN α-2b Hu-r presente en la crema cuando se utilizaron como medios de extracción: Tween 80, acetonitrilo 50 %, NaOH 0,02 M + etanol 50 %, etanol 90 %, PBS, NaOH 0,01 M y HCl 0,01 M. Durante la homogenización se emplearon ultrasonido y dispersor. Las muestras procedentes de las extracciones fueron dializadas en PBS 1X, con el objetivo de adecuar el medio para la posterior cuantificación empleando la técnica del ELISA (11). En todas las variantes probadas se observó un bajo recobrado de la molécula de interés.

Del análisis de los resultados anteriores se descartó el uso de agentes mecánicos externos durante la homogenización de la crema, así como la homogenización y diálisis de las muestras con posterioridad a la extracción al quedar demostrado que estos factores no influyen en el recobrado del principio activo.

En posteriores estudios se emplearon para la extracción detergentes y otras soluciones de solventes orgánicos (Tabla 2). Con los detergentes se obtuvieron por cientos bajos en la extracción del principio activo, sin embargo al realizar extracciones con soluciones de acetona preparadas a diferentes porcentajes, se logró un aumento en la recuperación del principio activo. Se obtuvo entre 70 y 80 % de extracción de la molécula con acetona al 5 %, así como con el sistema de dos fases dietil éter: H_2O (1:1); para lo anterior se empleó el ELISA (11) como método analítico (Tabla 2) y se realizaron varias réplicas en ambos casos.

Resultados similares se obtuvieron con cremas de estearato de potasio preparadas a diferentes concentraciones de IFN α-2b Hu-r (50, 100 y 400 ng IFN/g crema), extraídas con acetona al 5 % y con el sistema

Tabla 2. Extracción del IFN α-2b Hu-r de las cremas utilizando diferentes agentes. La concentración de la molécula de IFN se determinó por el sistema ELISA.

Solución de extracción	Porcentaje de extracción
Tween 80 (0,1 %)	28
Tween 80 (0,5 %)	16
Tween 80 (1,0 %)	10
SDS (1,0 %)	10
Acetona (0,5 %)	75
Acetona (1,0 %)	79
Acetona (2,0 %)	74
Acetona (3,0 %)	59
Acetona (5,0 %)	79
Dietil éter: H_2O (1:1)	80

Tabla 1. Extracción del IFN α-2b Hu-r de las cremas utilizando diferentes soluciones. La concentración de IFN se determinó por ELISA.

	Recobrado (%) ELISA					
Solución de extracción	A	B	C	D	E	F
NaOH (0,01M)	24	25	20	10	14	10
HCl (0,01 M)	<4	<4	<4	<4	<4	<4
PBS	<4	<4	<4	<4	<4	<4
Etanol (90 %)	<4	<4	<4	<4	<4	<4
NaOH (0,02M)+Etanol (50 %)	10	10	10	10	10	10
Tween 80 (0,05 %)	10	27	10	10	10	10
Acetonitrilo (50 %)	10	10	10	10	10	10

Variantes; A: homogenización de la crema y la solución de extracción utilizando ultrasonido. B: homogenización de la crema y la solución de extracción de forma manual. C: homogenización de la crema y la solución de extracción utilizando dispersor. D: diálisis de la muestra después de emplear la variante A. E: diálisis de la muestra después de emplear la variante B. F: diálisis de la muestra después de emplear la variante C.

de dos fases dietil éter: H_2O (1:1) (Figura 1). Esto confirma los resultados del estudio anterior realizado en cremas preparadas a 100 ng y demuestra la posibilidad de aplicación del método a un amplio rango de concentración del principio activo. En esta figura se presentan los resultados al emplear la titulación antiviral (10) y el ELISA (11) como técnicas analíticas de cuantificación de la molécula de IFN. Como se observa en la figura los recobrados obtenidos para cremas preparadas a diferentes concentraciones de IFN son mayores cuando se cuantifican por el sistema ELISA, en comparación con los obtenidos al utilizar la titulación antiviral, esto pudiera deberse a la posible inactivación del IFN con la acetona o por toxicidad del medio de extracción en el cultivo celular utilizado para la determinación, aunque las muestras, posteriormente a la extracción, fueron dializadas en PBS 1x durante 12 h.

Teniendo en cuenta el estudio anterior y los resultados obtenidos para la extracción de la molécula de IFN α-2b Hu-r de las cremas, se prepararon cremas de estearato de potasio con IFN leucocitario (Leuferón, CIGB). Para las extracciones se probaron algunos solventes orgánicos como: acetona, éter de petróleo, cloroformo y dietil éter.

Los resultados que aparecen en la Tabla 3 muestran una alta recuperación del principio activo cuando se empleó como medio de extracción el sistema de dos fases dietil éter: H_2O (1:1).

Se realizaron además experimentos de extracción de cremas de estearato de potasio preparadas a diferentes dosificaciones del principio activo y se determinó la molécula de IFN por titulación antiviral (10) (Figura 2). Se obtuvo una correspondencia entre los valores de actividad biológica (10) de la molécula en las cremas testadas respecto a los valores de título con que fueron preparadas inicialmente.

Como posibles alternativas para la formulación del principio activo se estudiaron diferentes tipos de bases. En la Tabla 4 se presentan los resultados de las extracciones realizadas con algunos solventes orgánicos.

Las bases evaluadas fueron: base de polietilenglicol, base de estearato de potasio, base similar a la utilizada en la formulación No. 4, a la cual se incorporó gel carbopol 940 al 0,5 % en proporción 1:1, base cuya constitución es una modificación del ungüento hidrófilo y tres bases similares en composición a la base No. 4, variando el contenido de polisorbato 80.

Las extracciones con el sistema de dos fases dietil éter: H_2O (1:1) de las bases 3, 4 y 6.c resultaron ser las de mejores recobrados del principio activo, y se lograron valores cercanos al 100 %. Aunque los resultados no se muestran, la cuantificación y recobrado del IFN por actividad biológica coincide con los resultados que se obtuvieron por ELISA.

Este resultado da la posibilidad del uso de nuevas bases para la formulación de la molécula de IFN, además de utilizar el protocolo de extracción aquí descrito como método analítico para la cuantificación de la molécula.

Tabla 3. Extracción del IFN leucocitario utilizando diferentes agentes.

Agente	Recobrado (ELISA)
Acetato de sodio 0,1M, pH 4,5	2 %
Acetona 5 %	70 %
Éter de petróleo 30 %	46 %
Cloroformo 30 %	12 %
Dietil éter: H_2O (1:1)	97 %

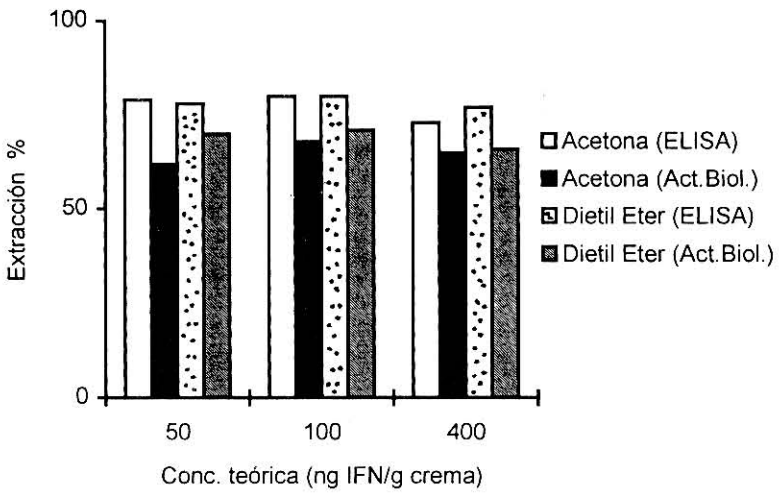

Figura 1. Resultados de la extracción del principio activo en cremas de IFN humano-recombinante empleando acetona al 5 % y el sistema de 2 fases dietil éter: H_2O (1:1). La concentración del principio activo fue determinada por ELISA y por actividad biológica.

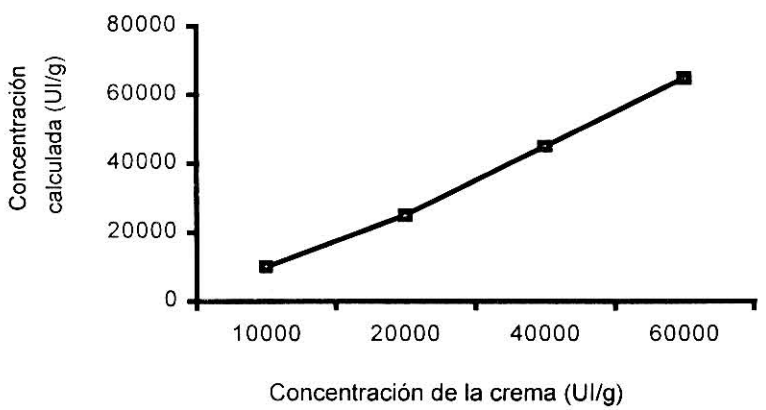

Figura 2. Resultados de la extracción con dietil éter: H_2O (1:1) de cremas con IFN leucocitario preparadas a diferentes dosificaciones. La concentración del principio activo fue determinada por actividad biológica.

Tabla 4. Extracción del IFN leucocitario en diferentes formulaciones. La concentración del principio activo fue determinada mediante el sistema ELISA.

Formulación	Recobrado analítico (%)		
	Acetona 5 %	Éter de petróleo: H_2O	Dietil éter: H_2O
2	8	8	8
3	75	45	98
4	75	50	99
5	15	15	15
6.a	75	52	85
6.b	40	25	60
6.c	65	82	99

Conclusiones

El método desarrollado permite extraer del 70-80 % del principio activo presente en cremas de IFN α-2b Hu-r utilizando el sistema de dos fases dietil éter: H_2O (1:1) o soluciones de acetona al 5 %.

En el caso de las cremas preparadas con IFN leucocitario se logra una recuperación de más del 95 % al emplear el sistema de 2 fases dietil éter: H_2O (1:1).

Se demuestra la posibilidad de utilizar diferentes bases para la formulación del IFN humano, y se han logrado recuperaciones del 99 % con el sistema de 2 fases dietil éter: H_2O (1:1) para las formulaciones 3, 4 y 6.c.

De acuerdo a estos resultados el protocolo extractivo aquí descrito puede ser utilizado para un ensayo de recuperación y control de la actividad del principio activo de cremas que contienen IFN.

Recibido en septiembre de 1997. Aprobado en octubre de 1997.

REDBIO'98

III ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
3RD. LATIN-AMERICAN MEETING ON PLANT BIOTECHNOLOGY

La Habana, Cuba, del 2 al 5 de junio de 1998
Havana, Cuba, on June 2-5, 1998

"Seguridad Alimentaria y Biotecnología en América Latina y el Caribe"

Incluye conferencias plenarias, simposios, talleres, mesas redondas y sesiones de posters. Sesionará una feria comercial, se promoverán encuentros para la promoción de negocios y alianzas estratégicas y se celebrarán cursos y tours pre y post encuentro.

Para más información dirigirse a:

Secretaria Técnica
Dra. María Cristina Pérez
Agencia de Ciencia y Tecnología
CITMA, La Habana, Cuba
Teléfono: (53-7) 81 6245
Fax: (53-7) 33 9460
E-mail: redbio98@bioca.cigb.edu.cu