



Simposio Internacional
sobre **Interferón**
y **Citoquinas**

International Symposium
on **Interferon**
and **Cytokines**

La Habana, Cuba.
Diciembre 2-5, 2001

Havana, Cuba.
December 2-5, 2001

Establecimiento de tecnologías para la obtención de citoquinas, modificaciones y desarrollo de nuevas formulaciones para nuevas aplicaciones. Evaluación en modelos animales y en humanos.

Establishment of technologies for production of cytokines, modifications and development of new formulations for new applications. Evaluation in animal models and humans.

**NUEVA GENERACIÓN
DE CITOQUINAS**

Intellectual Property in Pharmaceutical/Biotechnology Inventions: A Perspective on Neuroscience	39
Design and Potential of Microspheres for the Delivery of Neurotrophic Factors	39
The Challenge for the Delivery of Biotech Compounds: The Potential of Biodegradable Polymer Particles	40
Polymeric Hydrophilic Nanoparticles as Carriers of Drugs	40
Desarrollo de formulaciones de liberación rápida de interferón α 2b libre de albúmina humana	41
Analyses of N-linked Glycans of Recombinant DNA-derived Human Erythropoietins Produced Under Different Culture Conditions: Relationships Between N-glycan Structures and Biological Activities	41
Refolding of Inclusion Body Proteins by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography and Affinity Partitioning	42
L-Glutamin and Vitamin B6 Enhance the Porcine β -Interferon Production in PLA Cells	42
Inactivación de virus ADN en la 1ª etapa de purificación del proceso de producción de HEBERÓN ALFA N	43
Purificación del interferón alfa humano leucocitario mediante cromatografía de afinidad, Tiofil	43
Estudio de estabilidad del interferón alfa leucocitario en crema	44
Effect of Seed Cell Density and Presence of Antibiotics on Specific Growth Rate Using CHO Cells as Model	44
Estudio preliminar de la estabilidad de una línea celular CHO modificada genéticamente	45
Estudio de diferentes condiciones para la elución de la eritropoyetina humana recombinante de una columna de interacciones hidrofóbicas	45
Influencia de una matriz hidrofóbica sobre la formación de agregados solubles de eritropoyetina	46
Seguridad, eficacia y efectividad de la eritropoyetina humana recombinante	46
Influencia del bicarbonato de sodio en la formulación del medio D-MEM para el cultivo de células CHO	47
Influencia de la concentración de suero fetal bovino del medio de cultivo en la expresión de la proteína de interés de una línea CHO manipulada genéticamente	47
Implementación de un medio de cultivo químicamente definido (MCQD) para la fermentación incrementada del FCE-hr a escala de banco	48
Evaluaciones de seguridad realizadas a la IL-2 recombinante en ratas SD	48

Obtención de valores óptimos de pH y temperatura para la obtención de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (FCE-hr) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
Estudio de penetrabilidad y liberación del FCE a partir de diferentes formulaciones semisólidas	49
Implementación a escala productiva del proceso de obtención del IFN gamma humano recombinante en la planta de producción del CIGB	50
Development and Characterization of the Production Process of Recombinant Interferon Alpha 2b Human in New Conditions	50
Estudio de un nuevo método de renaturalización para el IFN alfa 2b humano recombinante obtenido en el CIGB	51
Production of Recombinant Human Interferon Alpha 2b in <i>E. coli</i> , Using the Expression Vector pKDUA	51
Factors that Influence on the Immunogenicity of Human Recombinant Interferon Alpha-2 β in mice	52
Bioequivalency Study of Two Recombinant Interferon Alpha 2b Liquid Formulations in Healthy Male Volunteers	52
Mejoras en la elaboración del formulado Heberón alfa 2b Hu-r	53
Efecto de la viscosidad en la estabilidad y la liberación del IFN alfa 2b	53
Influence of Polyethylene Glycol Molecular Weight on IFN Alpha 2b Stability	54
Estabilidad del IFN alfa recombinante en tampones ácido-orgánicos	54
Polymer-based Controlled-release System for Potential Delivery of Alpha-interferon	55
Evaluación de un proceso de purificación y caracterización del factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante (G-CSF)	55
Selection of the Fermentation Process from the G-CSF Production	56
Estudios que demuestran la seguridad y eficacia del factor estimulador de colonias de granulocitos, producido por el CIGB	56
Establecimiento de los límites de aceptación del producto purificado final del proceso de producción de la IL-2 humana recombinante	57
El uso de aminoácidos puede incrementar la estabilidad de la IL-2 en solución	57
Tween 80 High Concentrations Reduce the IL-2 Stability in Solution	58
Uso de un sistema de inmutioafinidad en batch para la purificación de biomoléculas formuladas en semisólidos	58

Intellectual Property in Pharmaceutical/Biotechnology Inventions: A Perspective on Neuroscience

Becerril N

Becerril Coca & Becerril, SC. Apartado Postal 265, Col. Centro Del. Cuantemoc, México.

Generation of technology through science has been a world trend in order to create the future in benefit of humanity, and in the meantime, intellectual property has become an essential piece in the whole process.

Patent protection promotes the progress of science since it allows inventors an exclusive right to commercially exploit their inventions for a limited time. After a patent expires, the public receives the benefit of that exclusive knowledge and is free to make, use, sell, improve, and to obtain patent protection for said improvements.

These principles of the generation of technology have made Pharmaceutical/Biotechnological research one of the key world industries with one of the strongest technology productivity and innovation index.

The Decade of the Brain has opened us the door for answering questions focused on the function of the CNS, as well as on all its relationships with the human body. Hence, with the rising of research in psychoneuroimmunology, scientists have reached to the conclusion that Cytokines are key ingredients in this psychoneuroimmunology formulation.

Particularly, research has focused the study of cytokines to the way they influence sleep regulation. This area is vast and a very fertile ground for studying the way cytokines collaborate in this very complex set of metabolic pathways.

How can intellectual property protect these kinds of inventions? What has the development of patent law been in order to protect biotechnological and pharmaceutical inventions in an adequate manner?

Design and Potential of Microspheres for the Delivery of Neurotrophic Factors

Benoît JP

INSERM ERIT-M 0104, Université d'Angers, 10 rue André Boquel, 49 100 Angers, France.

Drug delivery to the central nervous system remains a challenging area of investigation for both basic and clinical neuroscientists. Numerous drugs are excluded from blood to brain transfer due to negligible permeability across the brain capillary endothelial wall, which constitutes the blood brain barrier *in vivo*.

For several years, we have explored the potential applications of the microencapsulation of therapeutic agents to provide local controlled drug release in the central nervous system. Due to their size, these microparticles can be easily implanted by stereotaxy in discreet, precise and functional areas of the brain, without damaging the surrounding tissue. This type of implantation avoids the inconvenient insertion of large implants by open surgery and can be repeated if necessary.

We have established the compatibility of poly(lactide-co-glycolide) microspheres with brain tissues. This approach has been demonstrated to be safe and is nowadays used in humans for the treatment of brain tumors, using 5-fluorouracil-loaded microspheres. Recently, we have designed microspheres containing neurotrophic factors for brain delivery. Microencapsulation circumvents many of the problems posed by these proteins, including: an inherently short half-life, an inability to cross the

blood-brain barrier and a wide spectrum of activity, requiring their delivery to a precise area of the brain. Studies with nerve growth factor (NGF) and glial-cell derived neurotrophic factor (GDNF) are reported as examples.

The best characterized trophic molecule, NGF, has a spectrum of effects on peripheral and central neurons. It has received particular attention as a potential treatment for Alzheimer's disease. The long-term bioactivity of NGF released from the microspheres was evaluated on two animal models: the septohippocampal pathway axotomy model and the striatal excitotoxic lesion model, both in rats.

GDNF is a powerful factor which has been shown to enhance the activity, survival and regeneration of the dopaminergic neurons (cells which degenerate in Parkinson's disease). GDNF-loaded microspheres were assessed in a rat model of Parkinson's disease.

Effects of GDNF released from the microspheres were assessed by classic methods such as amphetamine-induced rotating behavior and tyrosine hydroxylase immunoreactivity. In addition, these effects were assessed by quantitative autoradiography using a specific ligand of the dopamine transporter.

The Challenge for the Delivery of Biotech Compounds: The Potential of Biodegradable Polymer Particles

Sánchez A, Vila A, Alonso MJ

Dept. Pharm. Technology. University of Santiago de Compostela. Spain

Nowadays is broadly accepted that the adequate exploitation of the new biotech pharmaceutical compounds as drugs and vaccines largely depends on the development of efficient delivery systems. Two different delivery approaches have received an important consideration: (i) injectable controlled release microspheres, which are intended to prolong the residence time of the associated macromolecule in the organism, and (ii) biodegradable nanoparticles specifically designed as carriers for the transport and delivery of proteins following mucosal administration.

The main problem to be faced while designing biodegradable microspheres as controlled release systems has been the stabilization of the encapsulated protein. We have succeeded overcoming this problem by specifically tailoring the inner structure and composition of the microspheres.

For example, microspheres made of a blend of PLGA and poloxamer allowed us to control the release of proteins, i.e. tetanus

toxoid and interferon, in their active form. With respect to the second approach, we have developed two types of nanoparticles that are useful protein carriers for either nasal or oral administration. More specifically, PEG-PLA nanoparticles have shown a capacity to overcome the nasal and intestinal mucosa and deliver the encapsulated protein, tetanus toxoid, to the immune system.

On the other hand, CS nanoparticles have also exhibited a promising behavior as nasal carriers for enhancing the systemic absorption of proteins, i.e. insulin. Consequently, these systems offer great promise for improving the efficacy of macromolecular compounds, simply by providing their adequate delivery to the body.

The goal of this paper is to present the features and potential of biodegradable microspheres and nanoparticles as delivery systems intended either for parenteral or mucosal administration of biotech compounds.

Polymeric Hydrophilic Nanoparticles as Carriers of Drugs

Ghosh PK

Ministry of Science & Technology, Department of Biotechnology, CGO Complex Block-2, CGO Complex, Lodi Road, New Delhi-110 003.

Hydrophilic polymeric nanoparticles have attracted attention because of their potential usefulness as drug-carriers in target specific cells, tissues or nucleus. They are expected to be used through injectable, oral, nasal or ocular routes. Hydrophilic nanoparticles have been prepared that are hydrophilic on the surface as well as inside the core; particles have also been made that are hydrophilic on the outer surface but are hydrophobic within the core. External stimuli responsive hydrophilic nanoparticles are yet another new

addition to the spectra of new materials in drug delivery.

Both water soluble as well as water insoluble drugs can be entrapped into these polymers by adjusting the hydrophilicity or the hydrophobicity of the core of the particles. The requirements that these hydrogel nanoparticles must meet to be effective in drug delivery, and the importance of the preparative methods for controlling their sizes below 100nm, with narrow size distribution are discussed.

Desarrollo de formulaciones de liberación rápida de interferón α 2b libre de albúmina humana

Hardy E, Ruiz LI, Reyes N

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba. E-mail: ehardy@cigb.edu.cu

Indicaciones del IFN alfa 2b ($C_{856}H_{1351}O_{253}N_{229}S_{10}$): Hepatitis C y B, condiloma acumulado, herpes zóster y genital, querato conjuntivitis, queratitis herpética, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, leucemia, y otras.

Vía de administración más usada: parenteral.

Forma farmacéutica: inyectables liofilizados con HSA como estabilizante.

Desventajas: Formación de inmunocomplejos; aumento de la inmunogenicidad; necesidad de HSA certificada (GMP), sin riesgo de contaminantes virales o patógenos; el proceso de liofilización encarece el producto y aumenta la complejidad del proceso de fabricación del medicamento; el producto no se obtiene listo para el uso, sino que existe la necesidad de disolver el liofilizado de IFN antes de ser aplicado al paciente; otros inconvenientes ocasionales limitan la calidad de la presentación y originan el rechazo de los

lotes de producción: (i) volumen en exceso; (ii) volumen incompleto, (iii) cambio de coloración, (iv) pastilla consumida, (v) pastilla con cavidades (vi) pastilla fragmentada, (vii) escamas.

Los inconvenientes anteriores han impulsado las investigaciones, en el ámbito mundial, dirigidas a obtener formulaciones parenterales de IFN líquidas y libre de albúmina.

Objetivos específicos que cubre esta presentación:

1. Resultados de la reformulación del IFN alfa producido en el CIGB, y comercializado por HEBER Biotec. Diseño y desarrollo de una formulación parenteral líquida de IFN alfa sin albúmina.
2. Demostración de la estabilidad prolongada (por al menos 30 meses) del nuevo producto.
3. Establecer las bases para solucionar con la nueva formulación la mayoría de los inconvenientes regulatorios y tecnológicos descritos anteriormente.

Analyses of N-linked Glycans of Recombinant DNA-derived Human Erythropoietins Produced Under Different Culture Conditions: Relationships Between N-glycan Structures and Biological Activities

Yuen C-T,¹ Storrington PL,¹ Cremata JA²

¹Nat. Inst. for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK.

²Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

Several preparations of recombinant DNA-derived human erythropoietins (rEPO), which had been produced under various culture conditions, were analysed for their N-glycan structures and bioactivities.

Profiling strategies were used to map the N-glycans, consisting of the release of the N-glycans by PNGase F digestion, fluorescent labelling with either 4-aminobenzoic acid (4ABA) or 8-amine-1,3,6 naphthalene trisulfonic acid (ANTS) and further analysis by HPLC or Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE).

The sensitivity of the method permits its use for the analysis of small amounts (2-30 μ g) of glycoproteins, as in the case of batches of low yield recombinant glycoproteins or of the dosage forms of therapeutic materials. The contents of biantennary and partially sialylated multiantennary glycans in the rEPOs studied were found to be related to their in-vitro bioactivities, and, in preliminary studies probably also, inversely related to their *in vivo* bioactivities. The N-glycan mapping procedure described here is easy to perform and can be adapted to the equipment available in most laboratories.

Refolding of Inclusion Body Proteins by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography and Affinity Partitioning

Zaveckas M,¹ Roenaite V,¹ Lukša V,² Bumelis V,² Pesliakas H²

¹Institute of Biotechnology, V.A. Graiciuno 8, 2028 Vilnius, Lithuania

²Biotechna UAB, V.A. Graiciuno 8, 2028 Vilnius, Lithuania

Currently, various steps and methods have been developed for the recovery and *in vitro* folding (renaturation) of inclusion body proteins. Among them, several chromatographic techniques (ion-exchange, hydrophobic interaction, immobilized metal ion affinity and size-exclusion) have been exploited as renaturation procedures, which primarily allowed to increase the yield of active protein and in some cases perform renaturation procedure at relatively high loading concentration of denatured protein.

Recently we have investigated in detail /M. Zaveckas, B. Baškeviciute, V. Lukša, G. Žvirblis, V. Chmieliauskaite, V. Bumelis, H. Pesliakas, J. Chromatogr., 904 (2000) 145-169/ refolding events of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF), its Ser-17 and (His)₆-tagged forms by means of immobilized metal ion affinity partitioning of inclusion body extracts in aqueous two-phase systems, containing metal ions chelated by dye Light Resistant Yellow 2KT-poly(ethylene glycol) (PEG). The most pronounced effect among correctly folded rhG-CSF forms gen-

eration was found in the presence of chelated Ni(II) and Hg(II) ions.

As a continuation of such studies here we report a comparative evaluation of rhG-CSF refolding efficiency when its inclusion body extracts were partitioned in the phase systems containing Ni(II) ions chelated by iminodiacetate (IDA)-PEG and a protein inclusion body solution in guanidinium hydrochloride (GdmCl) chromatographed on Ni(II)-IDA-Sepharose columns. More thorough studies of the refolding efficiency of rhG-CSF, its Ser-17 and (His)₆-tagged forms when their respective inclusion body solution in GdmCl were chromatographed on Ni(II)-IDA columns depending on the concentration of GdmCl and loading concentration of inclusion body solution were performed. This enabled to determine, that the relative amount of correctly folded (His)₆-tagged form of rhG-CSF recovered from Ni(II)-IDA column was less affected by loading concentration than rhG-CSF or its Ser-17 form, and practically did not change up to a load of about 6.0-6.5 mg/ml.

L-Glutamin and Vitamin B6 Enhance the Porcine β -Interferon Production in PLA Cells

Bratko F,¹ Srečko S,² Sandor T,³ Srečko K¹

¹Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, Zaloška 4, 1105 Ljubljana, Slovenia.

²Institute of Immunology, Rockefellerova 4, 10000 Zagreb, Croatia.

³Institute of Biotechnology, JATE University of Szeged, Temesvári krt 62, 6726 Szeged, Hungary.

The influence of L-Glutamin and Vitamin B6 on the production of Porcine β Interferon (IFN) was studied in PLA (Adult pig kidney) cell line. IFN was induced by Sendai virus. PLA cells were cultivated on 10 cm Petri dishes in Eagle's medium + 8% of (Serum replacement) SR-2.05 in a density that enable the appearance of the monolayer after 18 hours.

On next day, the priming with 50 I.U./ml of HuIFN α for 2 hours was performed. After that, 200 HAU of Sendai virus was added and the incubation was continued for 20 hours. After that the second induction with Sendai virus was performed and the supernatant containing β IFN was harvested.

In the parallel experiments, during the priming period L-Glutamin (5 mM) and after the Sendai virus addition (20 minutes) the Vitamin B6 were added.

The antiviral activity of IFN- β was tested on WISH cell line with the VSV as challenge virus, and PoIFN- β (500 I.U./ml) as standard.

The average increase of the IFN production after the addition of the L-Glutamin and Vitamin B6 was approximately 6x (120.00 versus 20.000).

The obtained IFN was partially purified by CPG (Control Pore Glass) and analysed by PAG-SDS electrophoresis.

Inactivación de virus ADN en la 1^{ra} etapa de purificación del proceso de producción de HEBERÓN ALFA N

Noa E,¹ Ruibal I,¹ Porrero F,² Álvarez G,¹ Barrios R,² Lobaina L¹

¹Laboratorio de Investigaciones del SIDA, AP 23031, Marianao 14, Ciudad de la Habana, Cuba,
E-mail: cicdc@infomed.sld.cu

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.

El HEBERÓN ALFA N (Interferón μ Leucocitario Humano) es un hemoderivado cubano que se obtiene de los leucocitos sanguíneos con más de 20 años de producción y uso clínico.

Al hacer una valoración del riesgo de contaminación viral de un producto biológico siempre es necesario tener en cuenta la selección del donante, el pesquaje que se realiza a las donaciones y el proceso de producción como tal, que incluye la validación de la capacidad de este para inactivar los posibles contaminantes virales. En este trabajo se valida la capacidad de la primera etapa de purificación para inactivar virus ADN empleando como modelos el virus herpes porcino tipo 1 (virus envuelto, de tamaño mediano y moderada resistencia a los agentes físicos-químicos) y el parvo

virus canino (virus no envuelto, de pequeño tamaño y de muy alta resistencia a los agentes físicos-químicos).

El factor de reducción total para los virus ADN envueltos fue de 10.07 log y para los virus ADN no envueltos de 8.83 log, siendo las etapas de tratamiento con tiocianato de potasio 5 M-pH 3.8 y la de precipitación con etanol 94%- pH 8 las más seguras.

Estos valores de aclaramiento viral le confieren al proceso de producción del HEBERÓN ALFA N un adecuado margen de seguridad para inactivar los posibles virus ADN contaminantes de las fuentes de materia prima, de los cuales sólo para el virus de la hepatitis B se realizan estudios de marcadores virales en los bancos de sangre.

Purificación del interferón alfa humano leucocitario mediante cromatografía de afinidad, Tiofil

Sánchez Álvarez K, Páez R, Rodríguez A, López L, Quintana A

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

El Interferon Alfa Leucocitario Humano es una preparación compleja de proteínas, entre las que se encuentran al menos 14 subtipos, altamente homólogos que difieren en su eficacia antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. En el proceso de producción de este fármaco, obtenido en Cuba desde 1982 a partir de leucocitos humanos de sangre periférica de donantes sanos, se observa un 28% de recuperación, además de un bajo grado de pureza (1 %), mientras que con la aplicación de los actuales métodos cromatográficos de purificación, la pureza de este producto puede homologarse a la de los IFN recombinantes.

Proceso de obtención de los lotes de IFN Alfa Humano Leucocitario parcialmente purificado: La producción del crudo y purificación parcial del Interferón, se llevó a cabo según la metodología descrita por K. Cantell (1981) y este fue el material inicial, parcialmente purificado (PIF), que se utilizó en los diferentes procesos cromatográficos. Para obtener los lotes de crudo se utilizaron leucocitos humanos provenientes de concentrados leucocitarios frescos, con menos de 24 horas de producidos y obtenidos de donaciones de sangre voluntarias, analizadas clínicamente.

Purificación del IFN Alfa Humano Leucocitario mediante Cromatografía de hidrofobicidad, Tiofil: Se utilizó una matriz de hidrofobicidad de la compañía MERCK (Tiofil). Las corridas se efectuaron en una columna XK-26 (Farmacia), donde se trabajó con un flujo lineal de aplicación y elusión. La columna fue equilibrada con una solución de sulfato de amonio al 10 % en PBS, pH 7,25. Para

la elusión de las proteínas retenidas se utilizó un gradiente de 10 %-0 % Sulfato de amonio en tampón PBS, pH 7,25.

Para la determinación de la carga de entrada a la columna se añadió a las muestras de PIF 9,5 % de sulfato de amonio y se estudiaron dos variantes de carga iniciales. También se estudió la concentración óptima de sulfato de amonio variando la fuerza iónica del tampón desde 2,4% de sulfato de amonio hasta 11%.

Manteniendo las condiciones de equilibrio y elusión se realizaron tres purificaciones para demostrar la reproducibilidad del proceso de acuerdo a los recobrados y grados de pureza.

Los mejores resultados de carga se obtuvieron con 60 μ g de IFN por mL de gel, pues a valores superiores no se adsorbe el 42 % del IFN presente en la muestra inicial, no obstante los niveles de pureza obtenidos para las cargas estudiadas fueron superiores a 3 MUI/mg de proteínas totales.

Al estudiar las condiciones iniciales de operación, se obtuvieron los mejores índices de recobrado y pureza al adicionar 9,5 % de sulfato de amonio.

Por otra parte al realizar tres purificaciones para demostrar la repetibilidad del proceso, partiendo de dos purificados distintos, se logró un alto índice de recobrado en todos los casos, así como un alto valor de actividad específica superior a 3 MUI/mg totales de proteínas, lográndose eliminar más del 90 % de las proteínas contaminantes en todos los casos, incluyendo a la albumina humana, así como se establecieron las condiciones de operación para un proceso estable con más del 50 % de recuperación del IFN.

Estudio de estabilidad del interferón alfa leucocitario en crema

Estévez TY, Aguilera A, Hardy E, García O, Porrero F, Ferrero J, Duane L, Nodarse H, Vega M, Gorrín K

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31; e/ 158 y 190; Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 8070, E-mail: ehardy@cigb.edu.cu

Ante la necesidad de lograr un producto con un tiempo de vida útil superior al que ha podido ser demostrado en estudios de estabilidad previos, y teniendo en cuenta la tendencia observada (disminución de la actividad biológica en el tiempo) del mismo, se propuso realizar un nuevo estudio de estabilidad que incluyó un incremento de un 30% del contenido de IFN en la preparación con relación a la concentración nominal.

Este tipo de incremento es comúnmente utilizado en la fabricación de productos biotecnológicos relativamente lábiles y también donde el proceso de fabricación incluye condiciones adversas para la molécula.

Se incluyó la fabricación de tres lotes a escala piloto con dos

dosis diferentes (20 000 y 100 000 UI/g), y se tuvo en cuenta la sobredosis propuesta. Al menos durante 12 meses de almacenamiento a 4°C, para las dosis analizadas, no se observaron pérdidas significativas de la actividad biológica en el tiempo.

También se demostró la estabilidad microbiológica del producto, lo cual comprende un bajo contenido de microorganismos y la ausencia de patógenos. En otros ensayos realizados se verificó que los preservos empleados y las concentraciones utilizadas fueron totalmente efectivas.

Otros parámetros evaluados como las características organolépticas, el pH y la extensibilidad se cumplieron con las especificaciones de calidad establecidas para el producto.

Effect of Seed Cell Density and Presence of Antibiotics on Specific Growth Rate Using CHO Cells as Model

Rodríguez EN, Pérez M, Casanova PR, Martínez L

Production Direction. Center for Genetic Engineering and Biotechnology

Mammalian cells culture has demonstrated its high usefulness for biotechnological production process on an industrial scale (Spier, 1991).

The kinetics of growth and metabolism of mammalian cells (hybridoma, CHO, BHK, Vero, human kidney cell) in culture systems has received increasing attention in the last decade of past century. Each cell line has its own kinetics characteristics: its rates of growth, death and metabolism, its nutritional requirements, its sensitivities toward chemical and physical stress.

The influence of initial cell density and the existence of a critical inoculum size is an important point for cell growth. It has been reported that the initial growth rate of primary cells varied directly with the initial cell concentration. Hu and co-workers (Hu and Wang 1987) presented data on human foreskin fibroblasts showing no effect of initial cell density for cells cultivated in Petri dishes. For continuous cell lines, including hybridoma cells, is also reported by Ozturk and Palsson 1990.

The CHO cell line used is derived from wild type (ATCC CRL-9096) and transformed to express heterologous protein in our Institute (Center for Genetic Engineering and Biotechnology).

The cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM Gibco Laboratories) containing 5 % of fetal bovine serum (FBS, Gibco Laboratories) supplemented with 10 µg/mL gentamicine (Sigma).

The preliminary studies of the influence of initial density on cells is important to know the limits for cell growth in batch mode and the effects on growth. The data presented here show a significative variation in the specific growth rate using low variation in the initial inoculum density. In other studies has been found that the initial cell density is important in the maximum viable cell concentrations. A ten-fold increase in initial cell density resulted in about a 50 % increase in viable cell concentration (Sadettin, *et al.*, 1990) but in our study we can't observed a difference between cultures with difference of initial inoculum density maybe due to a lower density difference between them. Any way these low differences can be very important in manipulation high cell mass in large scale production and save vials from cell banks.

In our study we observed that the presence of antibiotics did not affect cell growth significantly.

Estudio preliminar de la estabilidad de una línea celular CHO modificada genéticamente

Pérez M,¹ Martínez L,¹ Casanova P,¹ Rodríguez N,¹ Herrera N,¹ Brito R,¹ Rodríguez MP²

¹Dirección de Producción. ²Dirección de Investigaciones Agropecuarias. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

Las dificultades encontradas en los sistemas de expresión microbiológicos entre los que se citan: inadecuados eventos post-translacionales y cuerpos de inclusión insolubles entre otros, impuso la necesidad de emplear células de organismos superiores como sustratos para la expresión de proteínas de mayor complejidad (1).

La base de este tipo de producción está fundamentada en el sistema de bancos celulares. La línea celular debe demostrar la producción homogénea de la proteína de interés a partir de un clon celular estable (2). Uno de los estudios de mayor interés es la demostración de la estabilidad de la línea celular empleada siendo más que un interés una necesidad vital del productor el hecho de conocer si la línea es capaz de producir establemente la proteína de interés durante el proceso y conocer si la misma mantiene esta condición al ser evaluada 10 generaciones superiores a las empleadas en el proceso según lo reportado en la literatura (3). Este estudio debe formar parte de la validación de los procesos de producción de biofármacos.

En el presente estudio se expandió de forma controlada una línea de células CHO obteniéndose una población de células con 46 generaciones más que la línea celular original. Posteriormente se compararon ambas poblaciones celulares en cuanto a velocidades específicas de crecimiento y expresión de proteína de interés obteniéndose diferencias no significativas para los parámetros evaluados.

Bibliografía:

1. Camire J. "Chinese hamster ovary cells for the production of recombinant glycoproteins. *Art to Science* Vol 19 (1) 4-6.2000
2. International Conference on Harmonization, "Derivation and characterisation of cell substrates used for production of Biotechnological/Biological products" ICH Harmonised Tripartite Guideline, July 1997.
3. Gregory Mac Michael. "In process control for large scale animal cell culture. *Biopharm* 38-40.1997.

Estudio de diferentes condiciones para la elución de la eritropoyetina humana recombinante de una columna de interacciones hidrofóbicas

Rodríguez N, Rodríguez O, Berrio R, Cabrera D, Godínez L

Departamento de Producción de EPO. Dirección de Producción. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

En este estudio se empleó un medio cromatográfico de interacciones hidrofóbicas con ligandos butilos acoplados a la matriz inerte.

Debido al alto grado de hidrofobicidad de la molécula de eritropoyetina (EPO) no es posible su desorción mediante la disminución de la concentración salina de la fase móvil, haciéndose necesario el uso de solventes orgánicos para tal fin.

Se realizaron corridas en las que se eluyó con isopropanol al 30 % y con etanol al 50 y al 70 %. Sin embargo, los recobrados en todos los casos fueron bajos porque la mayor parte de la

glicoproteína quedó adsorbida, lo que se demostró cuando ésta pudo eluirse con agua después del solvente orgánico (banda correspondiente a la EPO en la SDS-PAGE).

Antes de la elución se realizaban lavados con el tampón NaAc 50 mM, Tween 20 0.01%, pH 5. Se pudo comprobar que haciendo pasar agua (2 ó 3 volúmenes de columna) después de este lavado era posible eluir la mayor parte de la EPO con el solvente orgánico, lo cual señala que la presencia de sales en el medio cromatográfico afecta o interfiere el debilitamiento de la interacción entre el ligando y el adsorbato que debe producir el solvente orgánico.

Influencia de una matriz hidrofóbica sobre la formación de agregados solubles de eritropoyetina

Sánchez J, Páez R, Martínez A, Rodríguez O

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. PO Box 6162, Playa, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.
Fax: (53-7) 21 8070; E mail: JorgeSanchez@cigb.edu.cu)

En este trabajo se estudia mediante gel filtración en HPLC la aparición de agregados solubles de eritropoyetina durante el uso de una matriz hidrofóbica.

Observándose que en estos oligómeros la interacción de los monómeros no es por enlaces covalentes y que los mismos se forman en primer lugar por la interacción proteína-matriz la cual

favorece posteriormente el efecto de las soluciones etanolicas durante la elusión.

Así mismo se muestra la influencia del tiempo de permanencia en solución etanolica en la formación de agregados y el efecto de la presencia o no de detergentes no iónicos en dicha solución.

Seguridad, eficacia y efectividad de la eritropoyetina humana recombinante

Bacardí D,¹ Gutiérrez A,¹ Prats P,¹ Carreras I,¹ Urquiza D,¹ Merino N,² Suárez J,¹ Vázquez A,¹
Alfonso A, Porras D,¹ Cosme K,¹ Rodríguez N¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.. Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, P.O. Box 6162 ó 6996, 10600, Habana, Cuba. Teléfonos: 21 6367, 21 6396. E mail: dania.bacardi@cigb.edu.cu.
Fax: (53-7) 21 8070, 33 6008. Telex: 512330, 511072

²Departamento de Anatomía Patológica. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana.
Calle 222 y Ave. 23. La Coronela. La Habana. Cuba. PO. Box 11600.

La eritropoyetina (EPO) es el factor de crecimiento glicoproteico que regula la producción de eritrocitos y la adapta a las necesidades fisiológicas de oxígeno. La obtención de EPO humana por tecnología de ADN recombinante (EPO-hr) ha permitido su amplio uso terapéutico.

La experiencia clínica ha demostrado que esta molécula es capaz de corregir la anemia asociada a diferentes entidades como: insuficiencia renal crónica; terapia con zidovudina en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA); artritis reumatoide; quimioterapia; prematuridad; transfusiones autólogas; enfermedades oncohematológicas y otras.

En el presente reporte se muestran los resultados de estudios

preclínicos realizados a la EPOhr producida por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Estudios de Toxicidad aguda y Tolerancia local), en los que se determinó la toxicidad a corto plazo y el potencial irritante para el tejido subcutáneo. Ensayos de 14 y 8 días respectivamente. Este producto se administró por vía subcutánea a ratas Sprague-Dawley. Se establecieron tres niveles de dosis del producto y un placebo del mismo.

Concluyendo podemos decir que la EPOhr no es tóxica ni provoca reacciones locales en el sitio de administración, en el rango de dosis establecido y bajo nuestras condiciones experimentales.

Influencia del bicarbonato de sodio en la formulación del medio D-MEM para el cultivo de células CHO

García O, Casanova PR, Pérez M, Rodríguez N, Martínez L, Herrera N, Ruiz JM, Dieguez M, Vargas G

Producción de Eritropoyetina Recombinante. Dirección de Producción. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

Las células CHO se han convertido en una importante herramienta para la producción de proteínas recombinante en la industria farmacéutica.

Para el trabajo con estas células se requiere el uso de medios de cultivo especialmente diseñados para satisfacer todos los requerimientos nutricionales. El medio D-MEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) es de amplia utilización para el mantenimiento de estas células CHO y otras líneas celulares de similar origen.

La composición de este medio comprende la utilización del sistema bicarbonato de sodio /dióxido de carbono ($\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$) como elemento tampón para garantizar la operación en un rango de pH entre 7.0 y 7.4, que es el óptimo de crecimiento de esta línea celular.

La existencia de una atmósfera con composición de $\text{CO}_2(\text{g})$ controlada y en función de la concentración de bicarbonato es una exigencia para el correcto funcionamiento del sistema tampón. Se recomienda por parte de los fabricantes que para este tipo de medios con una concentración de bicarbonato de 3.7 g/L se trabaje en una atmósfera del 5 % de dióxido de carbono.

En este trabajo se compararon diferentes formulaciones de medio D-MEM con concentraciones de bicarbonato inferiores a las recomendadas para las condiciones descritas, obteniéndose resultados satisfactorios en cuanto a los parámetros cinéticos y morfológicos que caracterizan la línea celular empleada en este estudio.

Influencia de la concentración de suero fetal bovino del medio de cultivo en la expresión de la proteína de interés de una línea CHO manipulada genéticamente

Casanova P, Rodríguez N, Pérez M, Martínez L, Herrera N

Dirección de Producción. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

El suero es un componente empleado en las formulaciones finales de los medios de cultivos que son empleados para el cultivo *in vitro* de las células de organismos superiores. Constituye una fuente de componentes esenciales para el crecimiento, proliferación y la viabilidad de muchas células. El suero no sólo provee a las células de aminoácidos, carbohidratos, sales, vitaminas y elementos trazas sino también factores de crecimiento y en especial hormonas que mimetizan las condiciones fisiológicas de las células para su cultivo *in vitro* (1).

En el diseño y optimización de los procesos de obtención de biofármacos a partir de células de organismos superiores existe un gran interés en reducir su empleo debido a las crecientes exigencias regulatorias respecto al uso de productos derivados de animales (2) y además constituye uno de los elementos que encarece los costos finales de los procesos debido a sus elevados precios en el mercado.

En este trabajo se evalúa la influencia de la concentración de suero fetal bovino en un rango entre el 5 y el 1 % en el medio DMEM sobre el cultivo de células CHO, y se demuestra que es posible manipular esta variable sin afectar de modo significativo la expresión de la proteína de interés ni la viabilidad celular.

Bibliografía:

- 1-Jayme, D. W., and Blackman, K.E.. Review of culture media for propagation of mammalian cells, viruses and other biologicals. In "Advances in Biotechnological Processes" (A. Mizrahi and A. L. van Wesel, eds.), Vol. 5 pp. 1-30. A. R. Liss, New York. (1985)
- 2-International Conference on Harmonization, "Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products derived from cell lines of human or animal origin," ICH viral safety document, March 1997.

Implementación de un medio de cultivo químicamente definido (MCQD) para la fermentación incrementada del FCE-hr a escala de banco

Mantilla Corzo E, Maseda L, Pérez MA, de Oro R, Cabrera O, Rojas I, Abreu B, Samá P, Ortiz D, Casal A, País J, Mansur M, Hernández JV

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

En los últimos años la exigencia de los consumidores a estado dirigida hacía requisitos más elevados de calidad y seguridad de los productos, por otra parte la competencia por productos cada vez más baratos unidos al factor económico y ecológico es objetivo fundamental en todas las empresas.

En este trabajo se utilizó como vector la cepa CGY – 127 y como hospedero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* microorganismo bien conocido y con capacidad de excretar la proteína de interés al medio de cultivo, la formulación del (MCQD) se obtuvo a partir de un balance de materiales de la composición elemental entre la concentración óptima e inhibitoria para su utilización y su efectividad fue medida a través de los parámetros

fermentativos como peso seco, rendimiento producto/biomasa, productividad, cantidad de FCE – hr bajo condiciones establecidas.

Nos quedó claro que pasada las 4 horas de concluido el incremento se podía parar la fermentación, pues la concentración de la proteína de interés comenzaba su desnaturalización.

Quedó demostrado que el (MCQD) resulta funcional para el crecimiento y la expresión del FCE – hr en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* alcanzando valores de peso húmedo y una concentración de proteína adecuada y que la cepa CGY – 127 es capaz de crecer a una velocidad de $0,11 \text{ h}^{-1}$, y tener un rendimiento de producto biomasa de 0.75 g/g .

Evaluaciones de seguridad realizadas a la IL-2 recombinante en ratas SD

Carreras I,¹ Prats P,¹ Bacardí D,¹ Cosme K,¹ Mosqueda O,¹ Merino N,² Aldana L,¹ Amaya R,¹ Suárez J,¹ Vázquez A,¹ Alí A,¹ Porras D,¹ Páez R,¹ Hernández L¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, PO Box 6162 ó 6996, 10600, Habana, Cuba. Teléfonos: 21 6367, 21 6396, Fax: (53-7) 218070, 336008, E mail: irma.carreras@cigb.edu.cu

²Departamento de Anatomía Patológica. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Calle 222 y Ave. 23. La Coronela. La Habana. Cuba. PO Box 11600

La IL-2 es muy utilizada como tratamiento para la destrucción de células cancerosas humanas, se han realizado numerosos protocolos clínicos en pacientes con diferentes tipos de cáncer Ej.: en el tratamiento del cáncer renal y en la terapia de pacientes de SIDA. El tratamiento de neoplasias con IL-2 ha provocado efectos tóxicos asociados a los niveles de dosis. La ética clínica establece que todo medicamento que se aplique en humanos sea estudiado rigurosamente empleando pruebas farmacológicas y de seguridad.

El objetivo de los ensayos realizados (Toxicidad Aguda y Toxicidad a Dosis Repetidas) consistió en determinar la toxicidad que puede ser provocada por la administración única de dosis lo suficientemente altas y por las administraciones repetidas de la

Interleucina-2 humana recombinante por la vía subcutánea. En los ensayos se utilizaron tres niveles de dosis y un placebo con tiempos de exposición de 14 y 28 días, en este último se evaluó la reversibilidad de los hallazgos clínicos y microscópicos observados.

Los animales mantuvieron una ganancia en pesos y un consumo de alimentos acorde con lo establecido para los requerimientos de la línea. Los hallazgos microscópicos así como las observaciones clínicas encontradas se asociaron con la administración de la IL-2 pero fueron revertidas en los catorce días de observación post-administración. De los estudios realizados se obtuvo que la IL-2 a las dosis estudiadas no provocó muertes ni signos tóxicos significativos.

Obtención de valores óptimos de pH y temperatura para la obtención de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (FCE-hr) en *Saccharomyces cerevisiae*

País J,¹ de Oro R,² Mansur M,¹
Valdés Hernández J,¹ Brito R³

¹Departamento de Desarrollo, ²Departamento de Producción de Factor de Crecimiento Epidérmico, ³Departamento de Control de Procesos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.

Este trabajo está encaminado a determinar los valores de pH y temperatura que maximizaran la productividad volumétrica y expresión del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (FCE-hr) usando como hospedero la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, a escala de banco.

Se empleo la cepa CGY127 de *S. cerevisiae* (Mat⁺, ura3), transformada con el plásmido episomal *pHEGF27*. Se empleo un medio salino suplementado con 5 g/L de Hidrolizado ácido de Caseína. Todos los experimentos se realizaron en cultivo incrementado, en fermentadores de 2.5 L, con 1.25 L de volumen

inicial, 0.15 L de inóculo y añadiéndose –a flujo constante– 0.6 L de incremento una vez culminada la etapa discontinua. Todas las fermentaciones tuvieron una duración de 40 h.

El diseño estadístico se realizó siguiendo una metodología de Superficie Respuesta a través de un Diseño Compuesto Central con 13 fermentaciones en un solo bloque. Los valores a analizar estaban entre 20 y 30 °C, y entre 4.5 y 6.5 de pH.

Dicho análisis arrojó que en el rango analizado existía un valor global máximo de productividad Q_p (0.67 mg EGF·L⁻¹·h⁻¹) para pH 5.5 y 26.3 °C de temperatura.

Estudio de penetrabilidad y liberación del FCE a partir de diferentes formulaciones semisólidas

Aguilera A, García O, Rojas I, Berlanga J, Hardy E

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31; e/ 158 y 190; Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba, Fax: 53-7-21-80-70, e-mail: ehardy@cigb.edu.cu

Existen factores químico-físicos de las formulaciones tópicas que determinan una mejor cicatrización. Entre los fundamentales se encuentran: necesidad de un pulso continuado de liberación del principio activo, aporte de un lecho para la formación de la matriz celular y aumento de la penetrabilidad de la proteína.

El desarrollo de los estudios *in vitro* mediante el uso de las celdas de liberación ha permitido comprender y predecir la cinética de liberación de moléculas.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar nuevas variantes de formulaciones semisólidas que contengan factor de crecimiento

epidérmico humano recombinante (FCEh rec) como principio activo, y determinar los perfiles de liberación/penetrabilidad de las mismas.

Según los resultados en algunas de las bases se logró la prolongación de la liberación de FCEh rec en el tiempo y en otro tipo de base evaluado un aumento de la penetrabilidad del principio activo a través de la piel fue observado, lo que permitiría una mayor disponibilidad del mismo en las regiones de interés. Además estos tipos de bases pudieran encontrar una aplicación inmediata en la cosmetología.

Implementación a escala productiva del proceso de obtención del IFN gamma humano recombinante en la planta de producción del CIGB

Furrazola G, Navarro MM, Abreu B, Cabrera O, Maseda L, Pérez MA, de Oro R, Casal A, Laborit L, Ortega L, Ramón L, Santana Y, Ortiz D, Zamora M, Álvarez R, Cabrera M, Pérez M, Cruz Y

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

El presente trabajo reporta el aumento de la escala productiva del IFN gamma humano recombinante.

Se realizó la fermentación empleando fermentadores de 50 y 200 L, obteniéndose resultados favorables en cuanto a cantidad de biomasa húmeda y por ciento de expresión de la proteína de interés. Igualmente, los resultados microbiológicos fueron satisfactorios, después de haber realizado la higienización establecida. Este incremento permite obtener una mayor cantidad de sublotos por proceso y por tanto una mayor cantidad de material final purificado.

Se realizaron cambios en la etapa de Semipurificación que permitieron el empleo del equipamiento instalado, obteniéndose resultados similares a los obtenidos en el área de producción anteriormente utilizada. El mismo garantizó procesar la biomasa procedente de la etapa de Fermentaciones.

En el proceso de purificación se emplearon las columnas cromatográficas adecuadas para adaptarse a la nueva escala. Las etapas críticas del mismo se realizaron bajo flujo laminar clase 100. Toda la documentación del proceso se transformó para adecuarse a las condiciones de la nueva área.

Los lotes de Materia Prima Activa obtenidos en esta área, cumplieron con las especificaciones de Calidad establecidas para el mismo, especialmente su pureza y actividad específica.

Estos resultados revisten una gran importancia, pues permitirán poder contar con un área adecuada para satisfacer la demanda comercial de este producto (tanto nacional como internacional), el cual está teniendo resultados muy prometedores en el tratamiento de enfermedades de originadas por parásitos intracelulares como por ejemplo la tuberculosis quimiorresistente.

Development and Characterization of the Production Process of Recombinant Interferon Alpha 2b Human in New Conditions

Pérez N, Cruz Y, Pérez MF, Ramos M, Moya R, Navarro M, Aliaga T, Caballero A, Furrazola G, Domínguez A, Samón Y, Ferreira J, Martínez I, Cruz O, Gil M, Brito JE, Vega JL, Sánchez JC, Sosa R, Franco A, Font M, Martínez N, Mederos JA, Costa L, Moya G, Ferrero J

Production Department of Interferons. Control Process and Quality Control Departments. Center of Genetic Engineering and Biotechnology. Havana. Cuba.

Center of Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB) has developed recently new conditions for productive process of recombinant Interferon alpha 2b human. It is a protein of human origin, produced in recombinant *E. coli* since 80's decade and it's very used in clinical trials as protective agent because of its antiproliferative and antiviral roles.

The standard process operations of fermentation, cellular disruption and washed pellet were scaled up maintaining the coefficient of oxygen transfer in liquid phase constant in the fermentation and improving the rest of the stages.

Purification process was modified in some not essentials aspect according to the new conditions of area. The process was characterized, and the interest protein was obtained as high qual-

ity product (more than 95% by RP-HPLC technique), non pyrogenic and specific activity more than 1.4×10^8 UI/mg of protein. The development of this purification step was based on a previously established process in our laboratory (Cruz O. *et al*), where the purification with monoclonal antibodies was changed by one IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) step.

New critical points of the process were positioned inside the stages of process, new specifications and a new documentation system.

The establishment of the production permits to obtain in alternative areas recombinant IFN alpha 2b human. It has being used to satisfy the clinical trials and to elaborate Active Pharmaceutical Ingredient to production of new drug formulations.

Estudio de un nuevo método de renaturalización para el IFN alfa 2b humano recombinante obtenido en el CIGB

Moya R, Cruz Y, Furrázola G, Navarro M, Pérez N, Sánchez JC

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

Este trabajo se propone implementar un nuevo proceso de renaturalización del Interferón α 2b hu-r obtenido en una nueva construcción genética, utilizando la técnica de Inmovilización en un Soporte Sólido, en este caso Cromatografía de Afinidad por Iones Metálicos (IMAC), en sustitución de la Dilución Lenta.

En el CIGB se han logrado resultados satisfactorios en la obtención de Interferón α 2b hu-r por vía recombinante, obtenido de la fermentación de una cepa bacteriana de *E. coli*, en la cual esta proteína se obtiene en altos niveles.

La construcción genética llamada pADUA que utilizaba como marcador de selección la ampicilina, fue cambiada por una nueva construcción genética (pKDUA), la cual utiliza como marcador de selección la kanamicina, que se encuentra exenta de problemas en las regulaciones internacionales que prohíben el uso de antibióticos beta lactámicos como la ampicilina en la producción de medicamentos parenterales.

Basados en nueva tecnología para la obtención del IFN α 2b hu-r que fue aprobada, en la cual se sustituye el uso de la

Cromatografía de Inmunofinidad por Cromatografía de Afinidad por Iones Metálicos (IMAC) se decidió mejorar el proceso de renaturalización, teniendo en cuenta las bondades de esta cromatografía, puesto que el material aplicado es producto de un proceso de Renaturalización por Dilución Lenta.

Con este tipo de dilución la solución desnaturalizada se renaturalizaba directamente en el buffer de renaturalización que es el proceso más fácil de renaturalización, pero es un proceso lento y de bajos recobrados debido a la formación de agregados insolubles, formas mal renaturalizadas de la proteína y además de los altos volúmenes a procesar, por lo cual se decidió mejorar este paso del proceso.

Con este cambio realizado en el proceso reduce el tiempo del mismo, y es una forma más sencilla de controlar el proceso de renaturalización evitando todo el exceso de tiempo y el uso de los grandes volúmenes de material que provocan pérdidas por la formación de las formas mal renaturalizadas de la proteína de interés.

Production of Recombinant Human Interferon Alpha 2b in *E. coli*, Using the Expression Vector pKDUA

Ramos Alfonso M, Pérez Tamayo MF, Cruz Y, Sánchez JC, Álvarez Alonso A, Sosa Echagarruga R, Franco Ramos A, Martínez de la Puente N, Font Batista M

Center for Genetic Engineering and Biotechnology, PO Box 6162, Havana, Cuba.
E mail: Marbel.Ramos@cigb.edu.cu

Human interferon α 2b (IFN α 2b) is a highly pleiotropic cytokine with broad-spectrum antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties and these actions support their application in the therapy of viral, neoplasia and other diseases. Recombinant DNA technology provided an alternative method for producing large quantities of leukocyte interferon by using bacterial cells.

Some of the main factors influencing the recombinant protein production in *E. coli* are the culture conditions, the expression

vector design and its interaction with the host. In the present work, we have analyzed the effect of Glycerol and Yeast Extract concentration on the volumetric production of recombinant IFN α 2b in *E. coli*, using the expression vector pKDUA.

The scale-up from 5 L to 50 L was performed by a combination of oxygen-transfer coefficient and power per unit volume methods, achieving an IFN production level of 743 mg·L⁻¹, at 50 L fermentation scale.

Factors that Influence on the Immunogenicity of Human Recombinant Interferon Alpha-2b in mice

García García I, Prats P, Cervantes Llano M,
Valenzuela C, López Saura P

Center for Biological Research. PO Box 6332, La Habana, Cuba.
Phone: (53 -7) 28 7377; Fax: (53-7) 28 0553; E-mail: lopez.saura@cigb.edu.cu

The appearance of anti-interferon (IFN) antibodies may have practical importance since they could be one of the causes of resistance to treatment with this molecule. This immune response depends on a great variety of protein-, formulation- and clinical-dependant factors.

Some of them were evaluated for recombinant human IFN α -2b formulation (Heberon Alfa R) in mice: frequency and route of administration, presence of human serum albumin (HSA) in the formulation and the Major Histocompatibility Complex (MHC) genotype. Anti-IFN α 2b antibodies titers in sera were determined by a double antigen, sandwich-type ELISA system. Mice immunized with 100 000 IU IFN α -2b three times per week produced high anti-IFN antibody titers, earlier than those injected with 300 000 UI once per week.

Titers were higher when the IFN was administered intraperito-

neally as compared to the subcutaneous, intravenous and intramuscular route.

On the other hand, the anti-IFN antibody titers between two formulations were compared and the differences were not significant, despite presence of albumin in one of them. Among the different mouse strains tested the higher titers were obtained in the order BALB/c >> B6D2F1 > NMRI >> C57BL/6. No anti-IFN antibodies were detected in the latter mice. It is necessary to speculate on the extrapolability of these results to patients that receive recombinant IFN α -2b. In humans, there are few studies with observations on these and other factors due to ethical and practical questions.

The knowledge of the factors that influence the immunogenicity of human recombinant IFN α -2b, will allow us to arrive to more rational therapeutic regimens, based on evidences.

Bioequivalency Study of Two Recombinant Interferon Alpha-2b Liquid Formulations in Healthy Male Volunteers

González Delgado CA,¹ García García I,² Valenzuela C,² Hernández Bernal F,² Ferrero J,²
Soto Hernández R,³ Cervantes Llano M,² Ducongé Soler J,⁴ Correa Fernández A,¹
Olivera Ruano L,¹ López Saura P²

¹National Center for Toxicology, "Carlos J. Finlay" Hospital, La Habana, Cuba. ²Center for Biological Research. P.O. Box 6332, La Habana, Cuba. Phone: (53 -7) 28 7377; Fax: (53-7) 28 0553; E-mail: lopez.saura@cigb.edu.cu ³Center for Medical- Surgical Research, La Habana, Cuba. ⁴University of Havana, Institute for Pharmacy and Food, La Habana, Cuba.

A randomized, crossover, double-blind, two phases bioequivalency study was performed to compare pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters as well as safety of two liquid formulations containing recombinant interferon (IFN) alpha-2b, administered by the subcutaneous route at a dose of 20 x 10⁶ IU.

A Cuban formulation (Heber Biotec S.A) and Intron A[®] (Schering-Plough, Ireland), were compared. Fourteen apparently healthy male subjects were included. IFN levels in serum was measured by EIA and by antiviral activity during the first 48 hours. Groups were homogeneous regarding all demographic and baseline variables analyzed.

The pharmacokinetic comparison by EIA did not show differences between the formulations: area under the curve (AUC; 2572 vs 2561 pg.h/mL), C_{max} (318 vs 354 pg/mL), T_{max} (8.2 vs 8.5 h), clearance (CL; 5.68 L for both), absolute bioavailability (Fa; 0.27 for both), half-life (t_{1/2}; 5.87 vs 6.08 h), terminal elimination rate (Ke; 0.122 vs. 0.118 h⁻¹), half residence time (MRT; 10.9

vs 12.0 h), and absorbed fraction (Fabs; 1.00 for both). On the other hand, the IFN antiviral activity titration in serum showed that both formulations were clinically similar in most of the pharmacokinetic parameters. There was bioequivalency regarding the other parameters.

There were no statistical or clinical differences with respect to the pharmacodynamic variables: b-2 microglobulin levels in serum and temperature.

There was a very high correlation between the IFN kinetics and the temperature. Heart beat frequency and systolic and diastolic blood pressure did not show any difference between the formulations either. Both products provoked similar diminution of the hematologic counts.

They had similar safety profiles as well. The most frequent adverse reactions were fever, tachycardia, headache and arthralgias. The overall analysis permits to claim the clinical equivalency of these two products.

Mejoras en la elaboración del formulado Heberón alfa 2b Hu-r

Tamayo G, Porrero F, Muñoz Y, Pérez RE, Novoa I, Piñero L, Carlos L, Pérez Y, Leyva L, Jerez J, Juan J, Vega JL, Beldarraín A, Chaveco M

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. PO Box 6162, Ciudad de la Habana, Cuba.
Teléfono: 271 6022, 271 6464, Fax: 271 8675, 271 8070, E mail: grisel tamayo@cigb.edu.cu

El Interferón alfa 2 β Hu-r, es una proteína con efecto antiviral, antiproliferativo e inmunomodulador específico de especies, esta molécula inhibe la replicación tanto de virus de ADN como ARN, así como el ensamblaje de partículas virales en el caso de los retrovirus, por lo que ha tenido en los últimos años un gran uso como medicamento, y se produce en Cuba con el nombre comercial de HEBERON ALFA R.

Desde el año 99 y en función de elevar el estándar de GMP

en la preparación del HEBERON ALFA R, la formulación comenzó a efectuarse en las áreas del Centro Nacional de Biopreparados. La evaluación de la repetibilidad y la consistencia lote a lote fue satisfactoria, obteniéndose formulados que garantizan la fabricación de un producto terminado acorde a sus especificaciones de calidad y una mejor continuidad en las operaciones de formulación, llenado, liofilización y envase.

Efecto de la viscosidad en la estabilidad y la liberación del IFN alfa 2b

Ruiz LI, Aguilera A, Reyes N, Aroche K, Soto K, Hardy E

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31; e/ 158 y 190; Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.
Fax: 53-7-21-80-70, E-mail: llamil.ruiz@cigb.edu.cu

Los polímeros bioadhesivos han cobrado un gran interés en los años recientes como una vía para mejorar sustancialmente el desarrollo de sistemas de liberación controlada.

Las razones por este interés incluyen el que esos polímeros pueden mejorar la entrega de droga a través de un contacto óptimo con la superficie de absorción, con el objetivo de prolongar el tiempo de residencia, y reducir la frecuencia de dosis.

Los polímeros de bioadhesión son capaces de formar fuertes enlaces no covalentes con la mucina que cubre las membranas biológicas.

En este trabajo evaluamos la influencia de la viscosidad en la estabilidad del IFN alfa 2b.

El IFN alfa 2b se diluyó en presencia de diferentes polímeros

bioadhesivos y las muestras se colocaron a 37°C.

La estabilidad y las modificaciones del IFN alfa 2b se analizaron a tiempo 0 y a los 7, 14, 21 y 35 días por RP-HPLC y SDS/PAGE.

La liberación del IFN alfa 2b se evaluó en una celda diseñada en el Departamento de Formulaciones (CIGB) y la determinación del principio activo se realizó mediante un ELISA tipo sándwich.

La viscosidad se determinó en un viscosímetro de viscosidades medias y altas (Brookfield DVIII) de reómetro programable.

En todas las formulaciones se evidenciaron modificaciones que se incrementaron a medida que transcurrió el tiempo del experimento.

Por otra parte, a medida que aumentó la viscosidad la liberación se hizo más lenta y controlada.

Influence of Polyethylene Glycol Molecular Weight on IFN Alpha 2b Stability

Ruiz LI, Reyes N, Sotolongo J, Pujol V, Aroche K, Hardy E

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31 ; e/ 158 y 190; Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.
Fax: (53-7) 21 8070, E-mail: llamil.ruiz@cigb.edu.cu

Although many inert properties have been studied for polyethylene glycol (PEG), some biological effects have been reported. However, the main applications on Biology have been related to the work with proteins. Additionally, a great variety on its size, the low toxicity and immunogenicity, and the rapid clearance have made it as the selected polymer in many parenteral, topic or oral formulations.

In general, PEG has been used in so different cases such as enhancer of the protein refolding, solid dispersion vehicle, precipitation, solubilization and stabilization of proteins, semi-solids, liquid and lyophilized formulations, and conjugated to enzymes, therapeutic proteins or lipids. In addition, some reports point to the effect of PEG size on human serum albumin solubility.

These experiments have pointed to an increasing of the protein solubility with a diminishment on the size of the polymer.

In this work we evaluated the effect of PEG size on recombinant human interferon alpha 2b (rh IFN a 2b) stability, in solution and during freezing-thawing or lyophilization process with and without other additives as co-stabilizers of the studied system.

Our results indicated that six evaluated PEG sizes protected IFN a 2b in liquid and frozen states. However, PEG at high molecular sizes registered a significant diminishment on active protein and antiviral activity recoveries. On the other hand PEG didn't protect during freeze-drying corroborating results previously obtained by other authors. However, when other additives were added as co-stabilizers, almost 100 % of active protein and antiviral activity recovery were obtained.

Estabilidad del IFN alfa recombinante en tampones ácido-orgánicos

Estévez TY, Aguilera A, García O, Hardy E

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba, Ave 31 ; e/ 158 y 190; Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba, Fax: 53-7-21-80-70, E-mail: ehardy@cigb.edu.cu

En trabajos publicados en la literatura se ha descrito la importancia del pH y la composición de los tampones utilizados en la estabilidad química-física de biomoléculas en diferentes preparaciones farmacéuticas.

En este trabajo se llevó a cabo un estudio de preformulación del IFN alfa recombinante en solución, formulado en diferentes tampones ácido orgánicos.

Los mismos se prepararon a varios pH, con vista a la selección de las mejores condiciones que favorezcan la estabilidad de esta biomolécula en preparaciones del tipo semisólida y líquida. Las muestras se colocaron a 37 °C y se analizaron mediante muestreos periódicos en los que se determinó el contenido de IFN α 2b mediante

la técnica de ELISA, y la pureza del pico correspondiente al IFN α 2b sin modificaciones por la técnica de RP-HPLC.

La estabilización del IFN α 2b por alguno de estos tampones probablemente se deba por la capacidad de alguna de las sales que forman parte de su composición para unir las trazas de metales que puedan existir en la solución y que además puedan afectar la estabilidad del principio activo. Además, a la presencia de cargas negativas de los iones del tampón, los cuales interactúan con los «clusters» de residuos cargados positivamente en las proteínas, de manera que la interacción carga-carga entre la proteína y el tampón puede ser un factor determinante en la estabilización de la molécula.

Polymer-based Controlled-release System for Potential Delivery of Alpha-interferon

Saéz V,¹ Suzarte A,² Valenzuela C,³ Lasalle Y,¹
Rosales I,⁴ López Saura P⁵

¹Pharmaceutical Research and Development Department, Center for Genetic Eng & Biotechnology (CGEB), Havana, Cuba.

²Polymers Department, National Center for Scientific Research (CNIC), Havana, Cuba.

³Estatistical Analysis Department, CGEB, Havana, Cuba. ⁴Validation Department, CGEB, Havana, Cuba.

⁵Regulations and Clinical Trials Direction, CGEB, Havana, Cuba.

Actually most of the therapeutic proteins currently used in medicine are administered parenterally and in many cases frequent injections are needed to achieve the expected results.

Alternative routes of administration of these macromolecules have been investigated in the last few years. Among them, special attention is paid to oral administration and some attempts have been done in order to achieve a therapeutic effect of orally administered peptides and proteins.

On the other hand, novel devices and systems for an effective delivery of these biomolecules have extensively been studied. Controlled release of peptides and proteins might offer exciting possibilities to this challenge.

It was possible to obtain delivery systems for interferon using copolymers of polyvinyl acetate-vinyl alcohol as controlling release rate matrixes. The controlled release dosage forms exhib-

ited an almost zero order release of interferon occluded in the studied matrixes and it was found that several factors affect the release rate of interferon from the preparations. The composition of the copolymer used as controlling release rate matrix, the content of the polymer in the formulation and the solubility of the filler material were the factors that modified strongly the IFN release profiles.

A methodology to extract IFN from the controlled release solid dosage forms was standardized and validated in order to quantify the IFN by a sandwich ELISA system. The intra and inter-assay coefficient of variation were calculated to evaluate the precision of the methodology.

Accuracy and the matrix interference were evaluated as well. We concluded that the extraction methodology established allows for the quantification of IFN with high precision and accuracy.

Evaluación de un proceso de purificación y caracterización del factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante (G-CSF)

Cruz Y,¹ Torres Idavoy D,¹ Ramos Alfonso M,¹ Santana Z,² Abad M,¹
Ferrero J,² Lugo V,¹ Costa L,² Moya G,² Vega M,²
Hernández R,¹ Páez R,¹ Martínez E,¹ Vega JL¹

¹Dirección de Producción, ²Dirección de Calidad. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

Para la obtención del G-CSF a partir de la cepa BL21 de *E. coli*, transformada con el plásmido pTE-9a(Kana)-G-CSF, se diseñó un proceso de fermentación a escala de 50 L con un porcentaje de expresión promedio de 20 %.

La alta expresión de la proteína dio lugar a la formación de cuerpos de inclusión por lo que fue diseñado un proceso de purificación que incluyó la renaturalización de la misma por Filtración en gel, en el cual garantizó una mayor facilidad de escalado y mantuvo las condiciones de calidad similares a un material renaturalizado por

dilución lenta 1/20 por 48h, de acuerdo a un proceso inicialmente propuesto. El recobrado obtenido por ambos procesos fue similar.

La molécula obtenida fue caracterizada en comparación a unos de los productos más fuertes en el mercado Neupogen usando diferentes técnicas como Actividad Biológica, la que fue $>1 \times 10^8$ UI/mL para ambas preparaciones, Pureza (SDS-PAGE, RP-HPLC, IEF, Filtración en Gel), en ambos casos los resultados fueron superiores al 97 %, en ningún material se detectó la presencia de agregados.

Selection of the Fermentation Process from the G-CSF Production

Santana Z, Ramos Alfonso M, Candelario Frontela M,
Lugo Hernández VM, Cruz Y, Torres Idaody D

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ciudad de La Habana, Cuba.

The granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) is a protein that stimulates the activation, proliferation and differentiation of the haematopoietic cell line derived from granulocytes and neutrophils. This protein is widely used in the treatment of chemotherapy-induced neutropenia and chronic neutropenia. In recent studies, its use has been extended to the treatment of several malignancies, among them the metastatic breast cancer, and patients with bone marrow transplantation.

In this work, we show the preparation of a primary cell bank of the selected clones that express the GCSF, to assure the genetic stability of the expression system. We compared different fermentation procedures. We found that the fed-batch culture and induced with 7g/L of lactose shows better results than the batch culture. The production cost by grams of protein was reduced 2,4 times and the volumetric production was increased two times. We describe the best culture media for the production of the GCSF.

Estudios que demuestran la seguridad y eficacia del factor estimulador de colonias de granulocitos, producido por el CIGB

Bacardí D,¹ Prats P,¹ Carreras I,¹ Mosqueda O,¹ Merino N,² Suárez J,¹ Vázquez A,¹
Alfonso A,¹ Porras D,¹ Cosme K,¹ Cruz Y¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, PO Box 6162 ó 6996, 10600, Habana, Cuba. Teléfonos: 216367, 216396, 216413, 216823.
E-mail: dania.bacardi@cigb.edu.cu. Fax: (53-7) - 218070, 336008.

²Departamento de Anatomía Patológica. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Calle 222 y Ave. 23. La Coronela. La Habana. Cuba. PO. Box 11600.

El factor estimulador de colonias de granulocitos humano recombinante (*G-CSF^{CIGB}*) acelera la recuperación neutrofílica después de los trasplantes de médula ósea y en pacientes con leucemias agudas.

También se plantean posibles usos en pacientes con cáncer metastásico de mamas, mielomas múltiples, síndrome de Feltz, infecciones bacterianas y en pacientes con SIDA.

Por otra parte se estudia la posibilidad de utilizarlo en terapias combinatorias con otras citoquinas en diversas afecciones como: combinado con Eritropoyetina en pacientes con anemia, en terapias antihongos con el Fluconazol y en terapias de diferentes tipos de cáncer.

La dosis de tratamiento es de 5 microgramos/kg de peso corporal por vía subcutánea. El uso más extensamente estudiado es

su aplicación en la neutropenia inducida por la quimioterapia y la neutropenia crónica.

En el presente reporte se muestran los resultados de los estudios no clínicos realizados al *G-CSF^{CIGB}* comparativamente con el NEUPOGEN®, (Estudios de Toxicidad aguda y Tolerancia local), ensayos de 14 y 8 días de duración respectivamente. Este producto se administró por vía subcutánea en ratas Sprague-Dawley.

Se exploraron tres niveles de dosis de la vacuna y un placebo de la misma. Pudimos concluir que en el espectro de dosis explorado en ratas SD, el *G-CSF^{CIGB}* no es tóxico ni provoca reacciones locales en el sitio de administración.

Evidenciándose similitud en el comportamiento animal en la fase experimental y durante el estudio histopatológico al reportado para el Neupogen de referencia utilizado.

Establecimiento de los límites de aceptación del producto purificado final del proceso de producción de la IL-2 humana recombinante

Apezteguía I, Perera A, Pérez D, Gerónimo H, Moya G, Martínez N, Sosa R, Breña F

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. PO Box 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.
Telef.: 271-6022, 271-6464; Fax: 271-8675, 271-8070; E mail: isabel.apetzteguia@cigb.edu.cu

Dentro de la familia de las citocinas, la Interleukina-2 (IL-2) posee un papel fundamental en la proliferación clonal antígeno-específica de los linfocitos T.

La IL-2 Humana es una proteína de 133 aminoácidos con un puente disulfuro intramolecular entre las cisteínas 58 y 105, que está vinculado con el mantenimiento de la conformación activa de la molécula. Por tanto, se conservan las propiedades terapéuticas de este fármaco ampliamente empleado en el tratamiento de enfermedades como: melanoma, cáncer renal, SIDA, entre otras.

En el proceso de producción de la IL-2 humana recombinante en el CIGB, es fundamental el estudio de la calidad y el control de los productos intermedios indispensables para la obtención de

un producto final.

El productor debe identificar los productos de las etapas intermedias, los resultados internos y límites del proceso que se obtienen, para de este modo asegurar su estabilidad dentro de lo referido al desarrollo del proceso. Al mismo tiempo el empleo de los datos del proceso a escala de planta piloto permite establecer el conveniente uso de cada observación en la fabricación a gran escala.

El presente estudio permitirá establecer los límites de aceptación del producto purificado final en cuanto a pureza por electroforesis de proteínas y cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa a escala analítica; concentración de proteínas totales y determinación de actividad biológica.

El uso de aminoácidos puede incrementar la estabilidad de la IL-2 en solución

Reyes N, Ruiz LI, Aroche K, Soto K, Gerónimo H, Hardy E

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31, e/ 158 y 190; Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 8070, E-mail: nuria.reyes@cigb.edu.cu

Un problema común para la mayoría de las proteínas que se comercializan en la actualidad lo constituye su inestabilidad. Desde la aprobación para su uso en humanos, la IL-2 ha sido objeto de numerosos estudios para mejorar su estabilidad, lo que se traduce en la disminución de las modificaciones potenciales que pueden dar al traste con su actividad biológica.

En este trabajo se evaluaron una serie de estabilizantes con el objetivo de obtener una formulación líquida de IL-2.

El principio activo se diluyó en presencia de diferentes aminoácidos. Los aminoácidos se utilizaron a varias concentraciones. Las muestras se colocaron a 37°C y la estabilidad

se evaluó por SDS/PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, RP-HPLC, Lowry y Actividad Biológica en los tiempos 0, 7, 14, 28, 48, 72 y 90 días.

Las principales modificaciones observadas para la IL-2 fueron la formación de bandas de agregación (SDS/PAGE), la formación de nuevos picos adyacentes al pico correspondiente a la proteína nativa foldeada correctamente, y la disminución del área de este pico.

Tanto la concentración de IL-2, como el uso de los aminoácidos como estabilizantes influyeron significativamente en la estabilización / desestabilización de la citocina estudiada.

Tween 80 High Concentrations Reduce the IL-2 Stability in Solution

Reyes N, Ruiz LI, Hardy E, Pérez D, Gerónimo H, Perera A, Breña F

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31; e/ 158 y 190; Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 53-7-21-80-70, E-mail: nuria.reyes@cigb.edu.cu

Several authors have studied the suitability of the Arrhenius plot to evaluate the protein degradation pathways. Thus, many covalent modifications such as deamidation, racemization and polymerization have been studied. However, a great problem has remained the temperature range where Arrhenius equation is valid

That's why some authors recommend temperatures between 4 and 45°C, but other have used an interval from 40 to 70°C.

Arrhenius plot is very useful not only to evaluate a simple degradation pathway on proteins but also to investigate the effect of a given additive on the protein stability.

In this work we evaluated the effect of Tween 80 on recombinant interleukin 2 (IL-2) aqueous stability, by techniques such as reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC), biological activity determinations and polyacrilamide gel

electrophoresis under reduced and non-reduced conditions (SDS/PAGE).

Although degradation routes followed a first-order kinetic, activation energy differed from one technique to another.

RP-HPLC showed two peaks around the native form. Those two peaks were a more hydrophilic one (possibly an oxidized form where methionine 104 is oxidized to its sulfoxide form), and a more hydrophobic one.

SDS/PAGE showed two bands, which correspond, to hydrolyzed and aggregated forms of IL-2. In contrast, biological activity didn't significantly decrease during the experiment.

Results are in complete agreement with previous reports for other proteins such as granulocyte colony stimulated factor. In those cases a reduction on tween 80 levels improved effective protein stabilization.

Uso de un sistema de inmunoafinidad en batch para la purificación de biomoléculas formuladas en semisólidos

Estévez T, Aguilera A, Ramón JA, Mazorra D, González V, Pérez E, Ruiz LI, Hardy E

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31; e/ 158 y 190; Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 8070, E mail: ehardy@cigb.edu.cu

El Interferón alfa 2b humano recombinante (IFN α -2b) y el factor de crecimiento epidérmico (FCE) se han formulado en cremas, ungüentos y geles, para aplicaciones regionales sobre la mucosa y la piel, debido a sus propiedades antivirales y cicatrizantes. Sin embargo, el análisis de las posibles modificaciones estructurales que pudieran experimentar las biomoléculas en estas formulaciones ha sido muy difícil, debido a la amplia variedad de compuestos hidrosolubles que quedan disueltos después de la extracción del principio activo.

Con el objetivo de obtener el IFN α -2b y el FCE libres y sin interferencias del resto de los excipientes de la formulación, se desarrolló un método de purificación basado en la cromatografía de inmunoafinidad en batch. Para ello se estudiaron las condiciones de adsorción y elución de la molécula a partir del gel cromatográfico.

El paso de adsorción se realizó a pH 7.2 en tampón PBS con o sin Tritón X-100, durante 10 minutos. Se logró un alto porcentaje de elución de IFN alfa-2b mediante el empleo de cloruro de guanidio o tiocianato de potasio a una concentración elevada. El tampón Tris 20mM pH 11,6 fue suficiente para eluir el FCE de forma cuantitativa. En paralelo, se estandarizó un sistema de electroforesis desnaturante, unidimensional que permitió evaluar la existencia o no de modificaciones estructurales del IFN incorporado en las formas semisólidas.

Se debe destacar que este procedimiento de extracción de IFN α -2b o de FCE a partir de semisólidos seguido de la correspondiente purificación por cromatografía de inmunoafinidad en batch, demostró ser compatible con otras técnicas de caracterización que requieren de la biomolécula en solución (p. ej., RP-HPLC, electroforesis, ELISA).