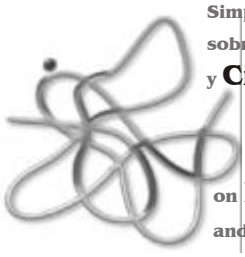

Simposio Internacional sobre **Interferón** y **Citoquinas**

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

La Habana, Cuba. Diciembre 2-5, 2001

Havana, Cuba. December 2-5, 2001

CONTROL DE CALIDAD

Esta sesión abordará el Aseguramiento y el Control de Calidad en las producciones de citoquinas así como aspectos regulatorios relacionados con las producciones de estas biomoléculas. Se expondrán trabajos relacionados con la caracterización de nuevas citoquinas así como el desarrollo de técnicas analíticas para el control de calidad de las mismas.

This section is concerned to quality assurance and control for cytokines production and regulatory aspects to be considered on these biomolecules. Characterization of new cytokines and the development of analytical techniques are also included.

Quality Control of Recombinant Human Interferon Alpha 2b 27

Determination of the Biological Potency of a rhegf Laboratory Reference Material Using a Cell-line Based Bioassay 27

Comparison of Commercials Interferon's by Accelerated Stability Study 28

Biological Standardisation Issues for Interferon and Tumour Necrosis Factor Families 28

Aseguramiento de la calidad en estudios no clínicos al factor estimulador de colonias de granulocitos humanos recombinantes (G-CSF) 29

Separation and Mass Spectrometry Characterization of Recombinant Interleukin-15 and Its Subspecies Obtained in *Escherichia coli* 29

Uso del ploteo de Arrhenius para la determinación de la estabilidad del IFN alfa 2b en estado liofilizado 30

Correlation Study of Two Assays (ELISA and Citopathogenic Effect Inhibition Method) for the Quantitation of Human Recombinant Alfa 2bInterferon 30

Characterization of More Hydrophobic Species of a Mutated Recombinant Human Interleukin-2 (IL-2Ala^{125}) 31

Gráficos de control para demostrar la consistencia y reproducibilidad de la producción de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante 31

Evaluación de lotes de polisacárido VI de *Salmonella typhi* obtenidos por diferentes variantes tecnológicas 32

Quality Assurance for the Interferon Manufacturing 32

Validación de la técnica de ELISA, para la determinación de la concentración del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante, en las muestras de proceso 33

Design and Application of a Proliferation Bioassay Mediated by G-CSF 33

Aspectos regulatorios relacionados con la demostración de la seguridad y eficacia de productos biológicos después de cambios en el proceso de producción 34

WHO Certification of a Cuban Biotechnological Product- Heberbiovac H8 34

Algoritmo de trabajo para el control de los productos hemoderivados y otros productos con riesgo de contaminación viral 35

La información al paciente: Un Reto en los ensayos clínicos con productos biotecnológicos 35

Quality Control of Recombinant Human Interferon Alpha 2b

Costa L

Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba.

Interferons are proteins with antiviral, antiproliferative and immnomodulatory properties. Many of the species of HuIFN-alpha are potent antiviral agents with specific activities of approximately 2x108 units/mg protein and apparent relative molecular masses in the range 17-28 000.

The World Health Organization has published requirements that apply to human interferons made by recombinant DNA techniques. In addition to listing tests, which are required on final container, emphasis is placed on in process testing and the documentation of the entire production process from the development of the vector to the characterization of the recombinant protein.

Three principal points are taking in account:

1.- Validation and Control of Manufacturing Procedures: the requirements give guidance on the procedures which should be documented such as the origin of the gene that is being cloned, strategy for cloning and expressing the gene, biochemical characterization of recombinant vector, purifications procedures and characterization of the gene product (interferon).

2.- Master and Working cell banks: only cells approved by and registered with the national control authority shall be used to produce human interferon. Characteristics of the cell seed and manufacturer s working cell bank should be fully described. Phenotypic indicators of purity and genetic consistency of the recombinant cultures are stated.

3.- Test on each production run: Satisfactory purity, grater than 95%, of each lot must be demonstrated, procedures used have included SDS-PAGE, peptide mapping and isoelectric focusing. Estimation of residual DNA is also important. The test for potency will be based on biological activity and approved by the national control authority; an appropriate reference preparation shall be tested in parallel.

The security, efficacy and potency of Cuban recombinant human interferon has been demonstrated during last 15 years of consistent manufacturing.

The quality of ours interferon has been showed in comparison with other commercial preparations.

Determination of the Biological Potency of a rhegf Laboratory Reference Material Using a Cell-line Based Bioassay

Gerónimo H, Vega M, Rodríguez C

Quality Control Direction. Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba.E-mail: haydee.geronimo@cigb.edu.cu.

The human EGF is a well-known mitogen for epithelial and mesenchymally derived cells. It is a potent stimulant of the epithelial reparation in a variety of *in vivo* and *in vitro* models.

In order to produce a potent, consistent and safe therapeutic product, the hEGF agent itself has to be well characterized throughout production. The accurate determination of the biological activity in International Units per mL (UI/mL) of any therapeutic agent is one of the most important steps in its characterization. Amongst the currently available methods for measuring cytokine levels, it is only, the biologically assay of samples that can directly provide estimates of biologically active cytokines present in test sample. Cell line based proliferation bioassays are the easiest to perform and provide the most precise and accurate data.

The aim of this study is to design and implement a quantitative cell line based bioassay with the purpose of determining the biological activity in UI/mL of the recombinant human EGF (rhEGF) produced by the CIGB.

The study was designed as a bioassay based on the ability of rhEGF to induce the proliferation of the 3T3 A31 murine cell line commercially available from ECACC. The first step was the determination of the dilution range and cell culture conditions at which the linear portion of the doses-response curve appears. The optimal conditions were found as $2x10^4$ cells/well and rhEGF dilutions between 20ng/mL and 0.002 ng/mL.

The second step was to calibrate this sample dose-response results comparing them with the similar conditions dose-response data but using International Standards of rhEGF (91/550 and 91/570 from NIBSC). On a 96-well microtitre plate, already containing cells have been done 10 dilutions in duplicate of the International Standards (MRI and RRI) and of the sample (MRN). There have been included Maximum and Minimum proliferation controls. After 24 h incubation it have been measured the cell proliferation using a colorimetric method. The assay was repeated 6 times interchanging the areas on the plate where have been applied the samples and the International Standards.

The collected data have been processed by the statistical program for parallel lines ParLin. It was noticed repeatability and reliability in the measured data. The three curves were plotted with acceptable linearity and parallelism; thereafter it was possible to assign potency values in UI/mL to the sample preparation.

As result, it was designed and tested a method that permitted calibrate an Internal Reference Material for the laboratory use. This method and Reference Material are also valid for routine determination of biological activity in rhEGF samples.

Comparison of Commercials Interferon's by Accelerated Stability Study

Martínez González N, Vega M, Costa L,
Valderrama Concepción S, Duany Zamara L.

Quality Control Direction. Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
Ave 31 e/ 158 y 190, P.O. Box 6162, CP 10600 Havana, Cuba

The recombinant human alfa 2b interferon is a protein whose antiviral, antripoliferative and inmonomodulator effect has potentialized its wide usage in clinics.

Due to importance of this protein provides to therapeutics, it is a need to know its stability even in non-ideal storage conditions. This work analyzes the behavior of two liquid formulations of recombinant alpha-Interferon: Intron A (Belgium), and Heberon alfa (Cuba), when they are storaged at higher temperatures.

The antiviral activity of these hot samples was determined through viral inhibition test, making use of Interferon's capacity to inhibit the virus's effects on cells. The concentration was measured by sandwich ELISA methods. The molecule real condition was tested through a high-resolution liquid chromatography in reverse phase.

The Heberon alpha resulted to express more biological activity when they are espoused at 59 and 70 ºC. This Interferon also had a better recognition by antibodies used in ELISA methods, because of the quantification of higher amount of proteins in almost all heated samples. The molecular integrity was different in both interferons. In Intron A appeared more peaks in different retention time to principal peak than Heberon alpha. It could happen due to a degradation or modification of the product or its excipients when they are heated, even at non-elevated temperatures.

With the aim of predicting the remaining concentration, we follow the Kirkwood's and collaborators methodology by using the ELISA results. In that test we evaluated each heated sample against a formulation from the same manufacturer stored at the recommended temperature. Concentration loss for each formulation at different storage temperature was evaluated from the data obtained by using a computer program (DEGTEST, UK). Best results are revealed by alpha Heberon with only 21.66 % to 4 ºC and 87.83 % to 25 ºC. In appositive, Intron A, has a loss of concentration of 100 % to 4ºC and 25 ºC.

Biological Standardisation Issues for Interferon and Tumour Necrosis Factor Families

Meager A

Division of Immunobiology, The National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Herts, EN6 3QG, UK.

Among biologically active proteins classified as cytokines are two large cytokine "families", the interferon (IFN) family and the tumour necrosis factor (TNF) ligand family, each with up to 20 different but structurally related members. Many members of the IFN and TNF families have been characterised with respect to structure, biological activities, and clinical therapeutic effects. For example, although structural differences exist among the IFN family members and despite the existence of different receptors for type I and type II IFN, all members have been shown to exert, to varying degrees, a similar spectrum of *in vitro* biological activities in responsive cells.

These include antiviral activity, inhibition of cell proliferation, regulation of functional cellular activities and differentiation, and immunomodulation. These biological activities have not only led to characterisation of IFN but also to the development of the various bioassay methods now available for the quantification of IFN. In turn these bioassays have been great utility in defining unitages of activity for IFN and for the development of IFN reference preparations or standards. In addition, such bioassays have proved of value in the detection and quantification of neutralising antibodies to IFN. The situation regarding the TNF family is more complex since only a few members exist as soluble ligands, e.g. TNF, LT, TRAIL, the remainder being cell surface membrane expressed ligands. The slouble TNF family members share cytotoxic activity towards certain tumour cell lines and this activity has formed the basis for their standardisation.

Although much has been achieved in the past, a number of new observations regarding the biological characterisation and standardisation of IFN and TNF family members have recently been made.

These observations form the basis of the presentation, which will include coverage of data derived both from in-house studies and international collaborative studies. The aim is to overview current progress in the field of biological characterisation and standardisation of IFN and TNF family members.

Aseguramiento de la calidad en estudios no clínicos al factor estimulador de colonias de granulocitos humanos recombinantes (G-CSF)

Porras D,[1] Cosme K,[1] Bacardí D,[1] Milá L,[2] Hernández L,[2] Guerra I,[1] Mosqueda O[1]

[1]Unidad Bioterio. Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, PO Box 6162 ó 6996, 10600, Habana, Cuba. Teléfonos: 216367, 216396, 216413, 216823. E mail: tania.porras@cigb.edu.cu. Fax: (53-7) - 21 8070, 33 6008.
[2]Departamento de Aseguramiento de la Calidad, Dirección de Calidad, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) es una proteína producida por los monocitos y fibroblastos, capaz de provocar la proliferación, diferenciación y activación de las cálulas hematopoyéticas de la línea de granulocitos neutrofílicos. Se emplea con éxito en la neutropenia inducida por quimioterapia y en el tratamiento de la neutropenia crónica. A partir de la producción de esta proteína en el CIGB, se hacen necesarias las pruebas de seguridad en animales que preceden a la realización de estudios clínicos. Estos estudios deben ser diseñados y planificados de forma tal que garanticen que un resultado científica y eticamente confiable que permita el avance de los estudios del producto en desarrollo.

A estos efectos, en la Unidad Bioterio del CIGB existe un grupo de trabajo dedicado a estudios no clínicos (toxicológicos y farmacológicos), que conjuntamente con los especialistas de Aseguramiento de la Calidad han instrumentado un sistema de Calidad que se rige por las normas internacionales emitidas por la OCDE, ICH y la Guía para el Uso y Cuidados del Animal de Laboratorio (ILAR) para la realización de estos estudios.

Dentro del sistema de Calidad implementado se incluyen los aspectos referidos de las GLP y las GMP, como el referente al personal responsabilizado, las instalaciones, los procedeimientos patrones de operación de todas las actividades, la calibración de equipos, el programa de monitoreo ambiental y las auditorías autorizadas a los estudios, los cuales se aplicaron a los ensayos de tolerancia local y toxicidad aguda comparada realizados al G-CSF. La aplicación de estas regulaciones ha permitido el estricto control de cada etapa de ambos estudios y la emisión de una declaración de aseguramiento de calidad que aprueba estos resultados.

Separation and Mass Spectrometry Characterization of Recombinant Interleukin-15 and Its Subspecies Obtained in Escherichia coli

Rodríguez AA, González LJ, Morera-Díaz Y, Paz-Lago D, Gerónimo H, Perea S, Moro A, Padrón G, Fernández JR, Santos A

Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Ave 31 e/158 y 190. PO Box 6162, CP 10600, Havana, Cuba. E mail: ara@cigb.edu.cu

Interleukin-15 (IL-15) is a recently discovered cytokine that shares with interleukin-2 the beta and gamma subunits of the receptor complex. Therefore both of them display similar biological effects. Moreover, IL-15 stimulates proliferation and cytolytic function of B, T, natural killer, and lymphokine-activated killer cells, and protects T cell from apoptosis. In order to obtain IL-15 for *in vitro* and therapeutic studies we previously developed a purification process of the recombinant protein expressed in *Escherichia coli*.

The purity of the final product was over 95% as judged by SDS-PAGE and its specific activity 2.3 x 10^6 IU/mg. In the present study the experimental and theoretical molecular masses of IL-15 as determined by electrospray mass spectrometry were well correlated.

The LC/MS experiments showed that its internal disulfide bridges were correctly formed and that the N-terminal methionine was completely processed. Other subspecies of IL-15, discarded in the purification process, were separated by reversed phase chromatography, digested enzymatically and further analyzed by mass spectrometry.

The results showed the presence of a dimer, formed by intermolecular disulfide bridges. Other subspecies were found to be modified at the C-terminus by the addition of an 11-residue peptide tag typical of *E. coli*, which has been previously reported for interleukin-6 and interlukin-2. Thus, we obtained a pure, correctly folded and biologically active IL-15 from *E. coli*. Furthermore, a dimer and subspecies modified by the bacteria were found and characterized.

Uso del ploteo de Arrhenius para la determinación de la estabilidad del IFN alfa 2b en estado liofilizado

Ruiz Ll, Reyes N, Sotolongo J, Aroche K, Franco A, 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

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba) se produce el interferón α 2b humano recombinante (IFN α 2b) como materia prima activa, el cual se emplea fundamentalmente en la elaboración de formas farmacéuticas inyectables. Actualmente se produce la forma parenteral liofilizada que utiliza la albúmina sérica humana como estabilizante. Esta formulación es sumamente ventajosa ya que preserva la estabilidad física, química y biológica de la molécula en un tiempo de almacenamiento prolongado y en condiciones de temperatura relativamente altas. Sin embargo, la tendencia actual es la de sustituir la albúmina como estabilizante debido a la necesidad de certificar su calidad para su posterior uso mediante pruebas importantes que encarecen el producto, además de disminuir el costo de la formulación y los riesgos de transmisión de virus humanos.

En este trabajo presentamos un estudio de pre-formulación que se condujo con el objetivo de obtener una formulación liofilizada de IFN α 2b libre de albúmina sérica humana. En el mismo se evaluó la estabilidad de tres formulaciones liofilizadas de IFN α 2b, chequeando periódicamente el principio activo mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y ELISA.

Los resultados que se obtuvieron a cada una de las temperaturas del experimento (28, 37 y 45 ºC) se utilizaron para predecir la estabilidad de las tres formulaciones a 4 ºC.

La energía de activación calculada por cada una de las técnicas empleadas en el estudio, y con ello el tiempo que teóricamente debe mantenerse estable el principio activo, fue mayor en las formulaciones que contenían sacarosa, rafinosa y polietilén glicol 8000 sobre la que contenía sorbitol y dextrana.

Correlation Study of Two Assays (ELISA and Citopathogenic Effect Inhibition Method) for the Quantitation of Human Recombinant Alfa 2b Interferon

Valderrama S, García B, Duany L, Costa L, Ferrero J, Pérez E, Vega M, Quintana M

Quality Control Department, Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Ave. 31 e/ 158 y 190, PO Box 6162, CP 10600.Habana, Cuba.

An ELISA assay is applied for the quality control of the Active Raw Material and the final product of human recombinant alfa 2b Interferon, specifically for identifying this protein. The alfa interferon quantitation is performed with a biological activity assay; measuring the protein antiviral activity by the citopathogenic effect inhibition method, which is more expensive, variable and longer than the ELISA assay. In order to apply the ELISA assay not only for identifying but also for quantifying the product active ingredient (Interferon), a correlation study was carried out with the results achieved using both methods.

Twelve batches of h-r alfa 2b Interferon final product were tested after being incubated at 70°C for 2, 6 and 10 days, in order to induce variations in the Interferon activity, and compared to their activity when stored at 4°C. A logarithmic transformation was applied to the samples mean values and the results were processed by the Parlin v 4.2 software. The correlation coefficient was 0,88 with high significance ($p<0,01$).

Correlation and regression analysis were performed for the different incubation periods, showing the tendency of a higher correlation significance, the regression coefficient value closer to 1 and the intercept value closer to 0 for the shorter incubation periods.

However, the results using both assays were different in all cases. In spite of it, the high value of the correlation coefficient for the samples that were not incubated at 70°C shows that an equation stablishing the equivalence between the results of both assays, can be formulated, when the alfa Interferon final product is stored at 4°C.

Characterization of More Hydrophobic Species of a Mutated Recombinant Human Interleukin-2 (IL-2Ala^{125})

Moya G, González LJ, Pérez P, Breña F, Araña M

Center for Genetic Engineering and Biotechnology. P.O.Box 6162 CP10600. Havana, Cuba.
E-mail: galina.moya@cigb.edu.cu

During the purification of recombinat interleukin-2 mutated at Cys^{125} (IL-2Ala^{125}) by reversed phase HPLC, a fraction with higher retention time is discarded. Using a single step of reversed-phase (C_8-Vydac column) and a slow linear gradient of acetonitrile four fractions more hydrophobic than IL-2Ala^{125}, named f5, f6, f7 and f8 were isolated.

Each fraction was analysed through SDS-PAGE, enzymatic cleavage, HPLC peptide mapping and mass spectrometry in order to determine the posttranslational modifications of IL-2Ala^{125}. N-terminal sequencing and ESI-MS analysis of the isolated fractions demonstrated that the initial Met was partially processed. The ESI-MS spectrum of f5 shown a molecular weight 42 Da higher than IL-2Ala^{125}, suggesteing an acetylation of the protein. The combination of peptide mapping and ESI-MS analysis showed that f5 contained a mixture of three monoacetylated IL-2Ala^{125} species at the ξ-amino groups of Lys^{9}, Lys^{33} or Lys^{49}. Another monoacetylated species was found in the fraction f6 but this modification were located at the partially processed N-terminal end.

In f7 a 76 Da molecule attached to Cys^{105} residue and the acetylation of Lys^{33} were detected. By ESI-MS and SDS-PAGE analysis, in non-reducing conditions, a dimmer of IL-2Ala^{125} was observed in fraction f8 but in reduced conditions only the IL-2 Ala^{125} monomer was detected.

The peptide map of f8 was very similar of the non-modified IL-2 Ala^{125} suggesting that the dimmers were linked by intermolecular disulfide bridges between Cys^{58} and Cys^{105} of two monomers of IL-2 Ala^{125}. Three different species of dimeric IL-2Ala^{125} were observed due to the partial processing of the initial methionine residue.

Gráficos de control para demostrar la consistencia y reproducibilidad de la producción de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante

Rojas I, Abreu B, De Oro R, Laborít L, Cabrera O, Ramón L

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

El presente trabajo tiene como objetivo establecer Gráficos de Control (GC) que permitan realizar un análisis retrospectivo y documentado, así como un análisis prospectivo, acerca del comportamiento de los parámetros fundamentales implícitos en la producción de cada lote de Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante.

Un GC es una comparación gráfico - cronológico de las características de calidad (variables o parámetros) de un producto, proceso o servicio con sus límites, los cuales pueden ser de control y / o de especificaciones.

Con un diseño adecuado de los GC en las etapas de propagación, fermentación, purificación y conformación de la materia prima activa se puede demostrar la consistencia y eficiencia del proceso productivo y a su vez se permitirá estar alerta ante los cambios significativos de cada variable con el objetivo de corregir las desviaciones no deseadas y estar alerta durante el proceso de producción.

En el presente trabajo se estudiaron los parámetros más críticos del proceso de producción de Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante tanto en la etapa de Propagación, Fermentación, Purificación y Conformación de Materia Prima Activa, los resultados analizados son de conductividad, pH y recobrado en las diferentes etapas, Control Microbiológico de las fermentaciones y producto final así como el agua purificada utilizada, determinación de Elisa de los diferentes eluatos obtenidos y producto final , control analítico de pureza por HPLC-RP y análisis de contaminantes del hospedero por DOT.

Evaluación de lotes de polisacárido VI de Salmonella typhi *obtenidos por diferentes variantes tecnológicas*

Iglesias León N,[1] Martínez Cabrera I,[1] Nápoles Martínez L,[1] González Díaz D,[1] Cardoso D,[1] Duarte M,[2] Fajardo EM[1]

[1]Instituto Finlay. Ave 198 No. 19805. La Coronela. La Lisa. Ciudad de La Habana. Cuba. E-mail: imartinez@finlay.edu.cu
[2]Instituto Cubano de Investigaciones del Azúcar (ICINAZ).

El polisacárido Vi de *Salmonella typhi* constituye uno de los antígenos más importantes utilizados en la formulación de vacunas destinadas a la protección en humanos contra la fiebre tifoidea.

En el presente trabajo se evaluaron tres variantes tecnológicas de producción (1, 2, 3) mediante métodos físico-químicos e inmunoquímicos, a través de una metodología analítica diseñada en el Instituto Finlay que incluyó, además de los ensayos establecidos por OMS, 1994 (determinación de la talla molecular (Kd) y el contenido de grupos O-acetilo), la determinación de la viscosidad, la rotación óptica específica y la identidad inmunoprecipitación, la resonancia magnética nuclear y la pureza mediante la detección electroforética (SDS-PAGE).

Los resultados indicaron una tendencia al incremento del contenido de grupos O-acetilo de la variante 1 a la 3 y disminución de la Kd. En correspondencia con este comportamiento se manifestó una tendencia al incremento de los valores de viscosidad, con una conservación de los valores de rotación óptica en las variantes 1 y 3 y una disminución significativa en la variante 2.

En todos los casos se obtuvieron espectros protónicos por RMN y por espectroscopia infrarroja característicos de estas estructuras polisacarídicas y se obtuvo una detección inmunológica positiva a través de la inmunodifusión doble. Las tenues bandas electroforéticas observadas, correspondientes al contaminante lipopolisacarídico, justifican las propiedades apirogénicas de los lotes.

Los resultados condujeron a la selección de la variante tecnológica 3 con la que se asegura un producto con características físico-químicas e inmunoquímicas adecuadas y consistentes, según los requisitos sugeridos por OMS y la metodología analítica incorporada, así como las ventajas tecnológicas que implicaron su aplicación.

Quality Assurance for the Interferon Manufacturing

Quintana M, Gómez-Napier L, Rosales I

Quality Direction, Centre for Genetic Engineering and Biotechnology.
PO Box 6162, Zip Code 10600. Havana, Cuba. E mail marisel.quintana@cigb.edu.cu

Quality assurance is a group of activities performed to guarantee the product quality during all process stages. To fulfill this, the following aspects should be observed.

1. Training and motivation of the personnel.
2. Establishing a dossier system with general and specific procedures.
3. Assurance of traceability of measuring means by using standards.
4. Suppliers evaluation.
5. Quality assurance in the production process by controlling critical points and processes validation.
6. Planning of process and products auditories and their follow-up.
7. The control of corrective and preventive actions.
8. Validation of analytical techniques.
9. Appropriate use of reference materials and sample checking in external laboratories (NIBSC).

As a result of these principles aplication in the production of Interpheron alpha 2b human-recombinant are shown where the seed bank is verified, the incoming raw materials, the critical points, the especifications for the intermediate products and the final product.

The documentation corresponding to the batch dossier and the analytical dossier, performing the release or rejection of it. During these years are important amount of lots has been produced according to current GMP.

Validación de la técnica de ELISA, para la determinación de la concentración del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante, en las muestras de proceso

Abrahantes MC, Brito R, Martínez E, Abreu B

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

La producción del Factor de Crecimiento Epidérmico se desarrolla en el CIGB y se controla por la división de Control de Procesos. Según las directivas de la Unión Europea referente a las normativas de correcta fabricación y control de la calidad de los medicamentos, la validación no solo debe aplicarse en cada una de las etapas del proceso de fabricación sino también a sus métodos de análisis y control, siendo este un requisito indispensable a tener en cuenta en la realización de los registros sanitarios de los medicamentos y para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación Farmacéuticas. Por esta razón, la industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de estos métodos analíticos.

La validación del método puede definirse como el proceso mediante el cual queda establecido el mismo para estudio de laboratorio, la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. En este trabajo desarrollamos la validación de la técnica de ELISA, para la determinación de la concentración del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante, en las muestras de las diferentes etapas de la producción. La validación se realizó teniendo en cuenta la matriz biológica negativa y los tampones empleados en los diferentes pasos de purificación.

Para el análisis de la linealidad del método se realizaron tres experimentos independientes, determinando la relación de la variable absorbancia y la concentración, se realizaron además tres réplicas para cada una de las concentraciones, calculándose el cuadrado del coeficiente de correlación, se realizó también un análisis de ajuste al modelo lineal utilizado. La reproducibilidad del método fue analizada teniendo en cuenta los analistas, los diferentes días y rangos de trabajo, se realizó un análisis de varianza de dos factores con réplicas para los rangos de la curva utilizada de 4; 2 y 0,5 ng/mL.

Design and Application of a Proliferation Bioassay Mediated by G-CSF

Ferrero J, Gerónimo H, Martínez Y, Quintana M

Departamento de Ensayos Biológicos II, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) exists naturally as an 18-20 kDa glycosylated protein. This protein has been produced by recombinant DNA technology for clinical use in both glycosylated and non-glycosylated forms. In our Center there is a project for the production of glycosylated G-CSF. We have developed an in vitro proliferation based bioassay to measure the potency in International Units/mL of the active raw material and the final product of G-CSF.

The method is based on the proliferation of G-NFS-60 cell line (Murine myeloid leukaemia) mediated by G-CSF. We produced a master cell bank and a working cell bank. We established the optimal conditions for the assay, the dose response curve, as well as the calibration of our laboratory standard against the international standard (88/502) from the NIBSC (London, UK). A parallel lines program to calculate the G-CSF potency has been applied. The potency of our active raw materials and final products batches are shown by using this method.

Aspectos regulatorios relacionados con la demostración de la seguridad y eficacia de productos biológicos después de cambios en el proceso de producción

Sánchez R, Rodríguez-Silva A, López-Saura P, Acosta A, Delgado A, Campos M, Currás T, Rodríguez MS

Dirección de Regulaciones y Ensayos Clínicos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 E/158 y 190, Cubanacán, cp. 6162 Ciudad de la Habana, Cuba. Tel. 21 6367. E. mail: rafael.sánchez.@cigb.edu.cu. Fax: (53-7) 33 6008.

En la producción de biológicos pueden concebirse cambios en el proceso de producción de un medicamento registrado, con el propósito de mejorar la calidad, el rendimiento y la eficiencia del proceso productivo.

Estos cambios pudieran ocasionar efectos adversos en la identidad, fortaleza, pureza, calidad o potencia y por tanto en la seguridad y eficacia del producto.

Hasta fecha reciente, un cambio importante en la producción de un biológico requería obligatoriamente la realización de nuevos ensayos clínicos. Las regulaciones en el ámbito internacional se han flexibilizado, por lo que actualmente se acepta que mediante ensayos analíticos y funcionales, el productor pueda demostrar equivalencia entre el producto ya registrado y el "nuevo producto", sin que necesariamente se requiera la repetición de ensayos clínicos. No obstante estos ensayos como los estudios en animales, pudieran requerirse, si se considera que son indispensables para sustentar el cambio.

En el presente trabajo se analizan los requisitos a cumplimentar en cuanto a los cambios al proceso de producción según clasificación efectuada por el CECMED en Mayores y Menores, relacionados con los siguientes aspectos: metodología de producción, metodología de control, producto, instalaciones, estudio de estabilidad y personal clave

Se exponen los tipos de estudio a realizar en dependencia del impacto del cambio en las especificaciones de calidad del producto en las diferentes etapas del proceso de producción.

Se presentan y discuten los aspectos relacionados con la estrategia a seguir para el caso de productos multiorigen.

Se presenta el proyecto de procedimiento para la evaluación y aprobación de la documentación por nuestra Dirección con vistas a la presentación al CECMED, así como la experiencia del CIGB en cuanto a los cambios aprobados.

WHO Certification of a Cuban Biotechnological Product- Heberbiovac H8

Campos M (on behalf of the Cuban WHO-Certification Team)

Registrations and Regulations Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology. PO Box 6162, Havana, Cuba. E mail: magalys.campos@cigb.edu.cu.

WHO demands their own GMP certification of biotechnology products to be distributed by its agencies. Cuban recombinant hepatitis B vaccine was recently submitted to this qualification process which included investments, a thorough validation and documentation work, and clinical trials, through the steps previewed in the WHO procedure.

External expert audits and national authority pre-inspections were part of this process as well.

This paper describes the whole qualification process and the measures taken at both producing centers: Center for Genetic Engineering and Biotechnology (active ingredient) and the Center for Biopreparates (bulk vaccine and final products) in order to fulfill WHO requirements. The successful result constitutes a pioneer experience within the Cuban Biotechnological Regulatory Field and an example for other developing countries involved in vaccine or other biologicals production.

Algoritmo de trabajo para el control de los productos hemoderivados y otros productos con riesgo de contaminación viral

Pérez MT,[1] Martín RZ,[1] Medina A,[1] Romero K,[1]
Aroche I,[2] Trujillo N[1]

[1]Laboratorio de Investigaciones de SIDA (LISIDA). [2]Planta de Hemoderivados Aristides Viere.

El riesgo de contaminación viral existe para los productos biológicos donde se utilice como fuente de materia prima algún material humano o animal.

La administración de productos para uso médico derivados de los mismos, han trasmitido virus con fatales consecuencias en muchos casos produciendo enfermedades como le hepatitis B y C y el SIDA.

El estudio de marcadores vírales, es entre otras, una de las medidas de seguridad recomendadas pare el control de lote final de estos productos, cuestión que aunque controvertida por la no disponibilidad de medios de diagnósticos específicos se ha venido utilizando en muchos países.

Durante los años 1998,1999 y 2000 se estudió un total de 280 lotes de Albúmina Humana Normal, 282 lotes de inmunoglobulinas tanto de uso endovenoso corno intramuscular,11 lotes de Estreptoquinasa Recombinante, 2 lotes de Interferón Alfa recombinante y 8 lotes de Suspensión Melanogénica, siguiendo la metodología de trabajo propuesta para cada uno y los procedimientos establecidos en nuestro laboratorio para el estudio de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C, al virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 y 2, y antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. Todos fueron aprobados excepto un lote de Albúmina por ser reactiva a HBsAg.

En este trabajo se resumen los resultados del empleo de los algoritmos utilizados por el LlSlDA como parte del control para la aprobación final de estos productos.

La información al paciente: Un Reto en los ensayos clínicos con productos biotecnológicos

Montenegro Surís A, Monreal Agüero ME

Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos.

El desarrollo de la industria biotecnológica ha revolucionado la industria médico-farmacéutica, incluyendo a sus normativas y aspectos éticos y legales relacionados. Para la inclusión de un sujeto en un ensayo clínico es indispensable informarlo correctamente sobre la investigación y después, obtener su consentimiento informado.

Este procedimiento se ha caracterizado por sus deficiencias en diversos sitios del mundo. La información al sujeto en investigaciones con productos biotecnológicos es una tarea díficil y compleja.

Definir la información que se debe suministrar para la obtención del consentimiento en investigaciones clínicas con productos biotecnológicos.

Se consultaron las Normas de la Buena Práctica Clínica, guías para la confección de modelos de consentimiento informado y resportes de estudios sobre consentimiento informado.

Elaboramos una guía que incluye todos los aspectos que deben ser informados y discutidos con los sujetos potencialmente incluibles en los ensayos clínicos con productos biotecnológicos. La guía fue elaborada en forma de preguntas que sirven para que los propios investigadores valoren y conozcan la información a discutir con los sujetos y contiene un total de 31 preguntas.

La guía elaborada define la información que se debe incluir en los modelos de consentimiento informado y que debe discutirse durante el procedimiento de obtención del consentimiento para investigaciones con productos biotecnológicos. Con la aplicación de esta guía se facilita que los sujetos comprendan en que consiste el estudio y que manifiesten un consentimiento realmente válido.