

Desarrollo de proceso para la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en células de mieloma: Optimización a escala piloto del cultivo en bioreactores de fibra hueca y de la purificación.

Adolfo Castillo Vitloch⁽¹⁾, Olga M. Morejón.⁽²⁾, Ivonne Alvarez⁽²⁾, Meylen Chea.⁽²⁾, Lázaro Piedra⁽²⁾, Danilo Sanabria⁽²⁾, Xamuel Piedra⁽²⁾, Evelyn Faije⁽¹⁾, José A. Gómez⁽¹⁾, Arais Sierra⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Dirección de Investigación y Desarrollo, ⁽²⁾ Dirección Técnica, Centro de Inmunología Molecular.

Resumen:

La versión humanizada del anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor del EGF (hR3) fue expresada en líneas de mieloma NS0 y está siendo usado en terapia y diagnóstico *in vivo* en pacientes de cáncer.

Fueron estudiadas las relaciones de diferentes parámetros metabólicos (velocidades de consumo de glucosa, glutamina, oxígeno y velocidades de producción de lactato y amonio) con la velocidad de producción de inmunoglobulinas durante diferentes condiciones de cultivo en bioreactores de fibra hueca Acusyst-Jr. Como resultado se optimizó la estrategia de suministro de medio intracapilar y extracapilar y el rendimiento de producto por corrida se incrementó de 3 a 4 veces con respecto al inicial. El producto obtenido en sobrenadante fue purificado por diferentes pasos cromatográficos usando dos esquemas diferentes con el objetivo de comparar los rendimientos del proceso y las características del producto obtenido. Como resultado se obtuvieron buenos valores de recobrado y características físico-químicas similares del producto final obtenido por ambos esquemas.

Introducción:

Entre las tecnologías de cultivo de células superiores más usadas se encuentran los bioreactores de fibra hueca¹⁻⁴. Entre sus principales ventajas están que se obtiene un producto concentrado, bajos requerimientos de suero, bajos costos de inversión capital y operación y que es una, lo que implica una reducción importante de las tareas de validación de limpieza y sanitización. Las mayores limitaciones de este tipo de bioreactor son sus posibilidades de escalado y la poca accesibilidad a la población celular. Todas estas características hacen que este tipo de tecnología sea una buena opción para la producción de biomoléculas de interés terapéutico para estudios preclínicos y clínicos Fase I y II, en donde no se necesitan aún grandes cantidades de producto y no es conveniente hacer grandes inversiones capitales en facilidades productivas, como es el caso de la tecnología de tanque agitado.

La tecnología de fibra hueca se basa en el cultivo en perfusión a altas densidades celulares. Uno de los mayores problemas en este tipo de cultivo ha sido la determinación de las estrategias óptimas de suministro de nutrientes y la remoción de desechos tóxicos para garantizar las condiciones óptimas para el crecimiento celular y para la productividad⁵. En este trabajo se estudió la relación entre la velocidad de flujo de suministro de nutrientes y de diferentes parámetros metabólicos con la velocidad de producción de anticuerpo y la masa de producto acumulada. El segundo objetivo fue el de optimizar los valores de recobrado del proceso de purificación manteniendo las características de calidad del producto obtenido. Como resultado final se desarrolló un proceso a escala piloto que cumple con las BPP y presenta buenos valores de rendimiento total, manteniendo las especificaciones del producto.

Materiales y métodos:

La línea celular hR3/E7-45 es una línea de mieloma murino NSO recombinante que expresa el anticuerpo monoclonal humanizado⁶ y fue cultivada en medio DMEM/F-12 al 5 % de suero bovino fetal (SBF) usando frascos de 75cm² (Costar) y frascos agitados Spinner (Integra) para conformar los inóculos.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en bioreactores de fibra hueca Acusyst-Jr (Cellex), con medio DMEM/F-12 por el espacio intracapilar (IC) y el mismo medio con 5 % de SBF por el extracapilar (EC). Las concentraciones de glucosa y glutamina fueron medidas usando kits comerciales (Sigma). La concentración de IgG se midió por un ELISA tipo sandwich. El sobrenadante de cultivo fue centrifugado, filtrado por 0.22 μm y purificado por dos esquemas diferentes usando un equipo BioPilot (Pharmacia LKB) siguiendo los siguientes pasos cromatográficos:

- Esquema A: Afinidad por Proteína A Sepharose, tamizaje molecular por G-25 Sephadex, intercambio iónico por DEAE Sepharose, G-25 Sephadex (todo de Amersham-Pharmacia) y la concentración por ultrafiltración tangencial en cartuchos de fibra hueca (Nipro).
- Esquema B: Afinidad por Proteína A recombinante, tamizaje molecular por G-25, intercambio iónico por DEAE Sepharose, G-25 Sephadex, intercambio iónico por SP Sepharose XL y G-25 Sephadex.

El producto purificado fue analizado por SDS-PAGE y Western-blot en geles de 7.5 % de poliacrilamida, por focalización isoelectrica (IEF), exclusión molecular (GF) e intercambio iónico (IEC) por HPLC (Pharmacia Biotech). La actividad biológica fue medida por el reconocimiento del anticuerpo *in vitro* del receptor de EGF en la línea celular H-125 utilizando un FACS Scanner (Bencton Dickinson).

Resultados:

Se siguieron 3 patrones de velocidades de flujo de suministro de medio IC: flujo bajo (cultivos en bioreactores 1 y 2), en donde se alcanzó el máximo valor de la bomba de medio IC (400 mL/h) a los 60 días de cultivo; flujo medio con incremento lineal (corridas 3 y 4), en donde la velocidad máxima de la bomba de medio IC se alcanzó a los 50 días de cultivo manteniendo un incremento lineal constante de esta bomba a lo largo de toda la corrida; flujo alto (corridas 5 y 6), en donde el máximo de la bomba de medio se alcanzó a los 35 días de corrida, manteniéndose luego constante. La velocidad de flujo del medio EC se mantuvo todo el tiempo a un valor 0.1 de la bomba de medio ICF, hasta que se alcanzó el flujo de 22 mL/h y luego se mantuvo constante hasta el fin de la corrida.

De la Figura 1 (A,B,C) se puede observar que los mejores resultados de producto acumulado y velocidad de producción por día se obtuvieron para las corridas con incremento lineal del flujo de la bomba de medio IC.

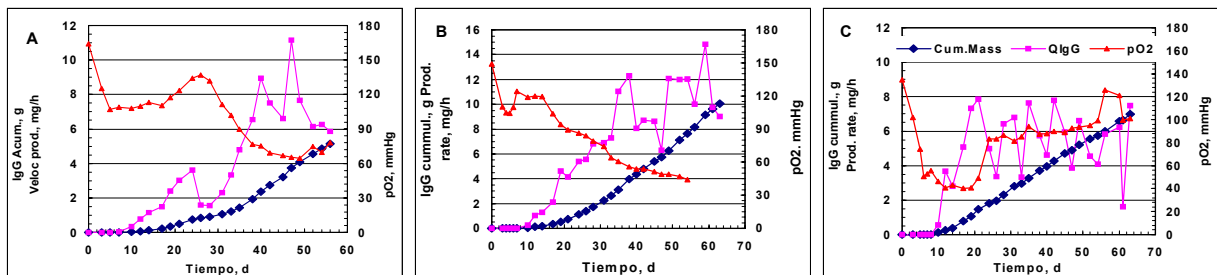
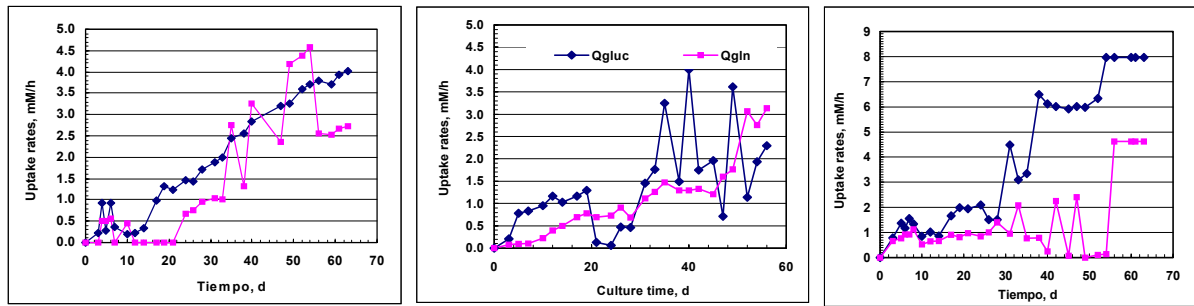


Figura 1: Promedios de la masa acumulada, velocidad de producción por día (Q_{ab}) y presión de oxígeno disuelto (pO_2) durante el tiempo de cultivo para las diferentes estrategias de suministro de medio IC: A) Flujo bajo (corridas 1 y 2), B) Flujo medio (corridas 3 y 4) y C) Flujo alto (corridas 5 y 6).

En la Figura 2 se puede observar el comportamiento a lo largo de las corridas con diferentes estrategias de las velocidades de consumo de glucosa y glutamina. Los mayores valores de velocidades de producción están asociadas



a altas velocidades de consumo de glutamina. Para las corridas con alto flujo de medio IC se obtuvo un incremento en la velocidad de consumo de glucosa y una reducción del consumo de glutamina y oxígeno, lo que sugiere una oxidación incompleta de la glucosa por vía anaeróbica. Esto pudiera ser resultado de un metabolismo ineficiente de las células cultivadas en el bioreactor bajo condiciones de exceso de nutrientes.

Figura 2: Promedios de las velocidades de consumo de glucosa (Qgluc) y glutamina (Qgln) durante el tiempo de cultivo para las diferentes estrategias de suministro de medio IC: A) Flujo bajo (corridas 1 y 2), B) Flujo medio (corridas 3 y 4) y C) Flujo alto (corridas 5 y 6).

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la caracterización del producto obtenido en diferentes corridas de purificación siguiendo los esquemas descritos. El esquema B arrojó los mayores valores de recobrado.

Tabla 1: Valores de recobrado y características de calidad del producto obtenido para algunos lotes producidos siguiendo diferentes esquemas productivos.	Batch number	PA-1	PA-2	PB-1	PB-2	PB-3	PB-4
Purification scheme		A	A	B	B	B	B
Total recovery, %		35.1	38	61.1	92.9	92	90
SDS-PAGE		OK	OK	OK	OK	OK	OK
Western-blot		OK	OK	OK	OK	OK	OK
Isoelectric focusing (values)		6 bands 8.1-8.7	6 bands 8.1-8.7	6 bands 8.1-8.7	6 bands 8.1-8.7	6 bands 8.1-8.7	6 bands 8.1-8.7
HPLC GF, %		98	98	97.9	96.1	97.3	96.1
HPLC IEC, %		100	100	100	100	100	100
Biologic activity		100	100	100	100	100	100

Conclusiones:

- La estrategia de corrida con incremento lineal de la velocidad de flujo de medio IC arrojó los mayores valores de velocidad de producción y de producto acumulado.
- Las altas velocidades de producción están asociadas a altas velocidades de consumo de glutamina.
- El esquema de purificación B arrojó altos valores de recobrado del proceso, por lo que se recomienda su uso en el escalado del proceso.
- Los esquemas de purificación usados no afectan las características de calidad del producto obtenido.

Referencias bibliográficas:

- 1.- Hirschel, M. D. And Gruenberg, M. L. in *Large Scale Cell Culture Technology* (Lyndersen, B.J., ed) Macmillan, New York, 1987, p.p 113-114.
- 2.- Knazek, R. A., Gullino, P.M., Kohler, P. O. and Dedrick, R. L., *In vitro Sci.* 1972, 178, p.p. 65-66.
- 3.- Shi Y., Ploof J., Sardoni Ch., Presented at XV ESACT Meeting, Tours, 1997.
- 4.- Horwath B. E., Mullen L. J., Presented at XV ESACT Meeting, Tours, 1997.

- 5.- Handa-Corrigan A., Nikolay S., Jeffery D., Heffernan B. and Young A., *Enzyme Microb. Technol.* 1992, 14, p.p. 58-67.
- 6.- Mateo C., Pérez R. and Moreno E. 1997, *Immunotechnology*, 3, p.p. 71-81.

Estudio de la respuesta de anticuerpos específicos frente a la proteína de 38 kd de *Mycobacterium tuberculosis* en individuos sanos vacunados con BCG.

Lic. Alina Puig Levy¹, Dr. Herve Bercovier², Dra. Yolanta Fishmann², Dr. Avi-Chai-Hovav², Lic. Yamilé López Hernández¹, Dra. María Elena Sarmiento¹, Dra. Teresita Vidal Martínez¹, Lic. Rolando Ochoa¹, Lic. Eric Estrada¹, Dr. Gustavo Sierra¹, Dr. Armando Acosta¹.

¹Departamento de Biología Molecular, Instituto Finlay, La Habana, Cuba

²Institute of Microbiology, Hebrew University of Jerusalem, Israel

Resumen

El control de la tuberculosis se basa en el diagnóstico temprano, tratamiento de los casos y vacunación con BCG. Sin embargo, los métodos de diagnóstico en uso poseen una relativamente baja sensibilidad, por lo que el desarrollo de métodos de diagnóstico rápido, con una elevada sensibilidad constituye una prioridad en la actualidad. Entre los métodos más atractivos para estos fines se encuentran los métodos inmunoenzimáticos de detección de anticuerpos dirigidos contra proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*. En el presente trabajo se estudió la respuesta de anticuerpos IgG séricos dirigidos contra la proteína de 38 kd de *Mycobacterium tuberculosis* en un grupo de individuos sanos de diferentes grupos étnicos vacunados con BCG, con el fin de determinar el patrón de respuesta de la población normal frente a este antígeno y la posible interferencia de anticuerpos de reacción cruzada inducidos por la vacunación lo cual será de utilidad para el desarrollo de métodos de diagnóstico serológicos basados en el uso de esta proteína.

Introducción

La tuberculosis ha sido definida por la OMS como una emergencia médica mundial. Un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, produciéndose anualmente 8 millones de enfermos y 3 millones de fallecidos a causa de esta enfermedad (1,2). Los métodos de control de la tuberculosis se basan en el diagnóstico temprano, tratamiento de los casos y la vacunación (3). Los métodos de diagnóstico en uso tienen una sensibilidad de solo un 50% por lo que el desarrollo de métodos rápidos y sensibles de detección de la infección constituyen una prioridad de la medicina contemporánea.

Entre los métodos más promisorios se encuentra el ELISA mediante la detección de anticuerpos séricos frente a proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* (4). Con estos métodos se han obtenido resultados variables en dependencia del antígeno utilizado y de la población en estudio (5,6,7,8).

El antígeno de 38 kd de *Mycobacterium tuberculosis* ha sido uno de los más empleados para el estudio de la respuesta serológica de pacientes tuberculosos, sin embargo no se han realizado estudios de la respuesta frente a este antígeno de poblaciones de individuos sanos de diferentes grupos étnicos vacunados con BCG. Este último aspecto es de gran importancia ya que la vacunación con BCG pudiera interferir a través de la generación de anticuerpos de reacción cruzada en la población vacunada. Teniendo en cuenta los elementos anteriores nos propusimos con el presente trabajo estudiar la respuesta de anticuerpos contra la proteína de

38 kd de *Micobacterium tuberculosis* en individuos sanos de la población cubana de distintos grupos étnicos vacunados con BCG lo que servirá de base para evaluar el uso futuro de esta proteína para el diagnóstico de la tuberculosis

Materiales y Métodos:

El estudio se lleva a cabo mediante un ELISA cualitativo indirecto. Se utilizaron placas rígidas certificadas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc Polisorb). Se recubrieron durante 16 horas a una temperatura de 2-8 °C en cámara húmeda con el antígeno de 38 kd de *Micobacterium tuberculosis* (100 µl/ pocillo), obtenido por vía recombinante y suministrado gentilmente por Herve Bercovier, Yolanta Fishmann y Avi-Chai-Hovav del Instituto de Microbiología de la Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel utilizado a una concentración de (8 µg/ml), en tampón de recubrimiento carbonato – bicarbonato 0.05 M, Ph 9.6. Se bloqueo durante 2h a 37°C con leche descremada (Oxoid, Inglaterra) al 2% en PBS (200 µl/ pocillo). Los sueros fueron provenientes de personas cubanas sanas comprendidas en edades desde 6 meses a 29 años, los mismos se encontraban almacenados a -20°C. Las muestras de estos sueros se diluyeron 1:50 en la solución de bloqueo preincubadas durante 30 min con Lisado de Coli (5 µl), se incubaron durante 2h a 37°C, las mismas se aplicaron por duplicado (100 µl/ pocillo). Se uso como control negativo un pool de suero proveniente de banco de sangre, este pool se testo a una dilución de trabajo 1:50, Se montaron dos replicas del mismo (100 µl/ pocillo). Se uso como control positivo el Intacglobin (50 mg/ml) diluidos 1:20 y 1:40, se aplicaron por duplicado (100 µl/ pocillo), tanto el control negativo como positivo también fueron preincubados durante 30 min con Lisado de Coli (5 µl). Se añadió un conjugado Anti IgG humano polivalente (SIGMA, EEUU) (100 µl/ pocillo) a una dilución de 1:3000 en solución de bloqueo, y se incubo 1h a 37°C. Se revelo la reacción con solución sustrato (5mg de OPD en 12 ml de tampón citrato de sodio/fosfato 0.1 M, Ph5 con 5 µl de H₂O₂)(100 µl/ pocillo). Se incubo en cámara oscura a temperatura ambiente durante 30 min. Se detuvo la reacción con H₂SO₄ (2N) (50 µl/ pocillo). Se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Multiskan Multisoft, Finlandia). Entre cada paso se realizaron 4 lavados con PBS Tween 20 0.05% (200 µl/ pocillo). Fueron empleados los paquetes estadísticos Microstat y Excel.
K: $XDO_{\text{muestra}} / X_{\text{control negativo}}$

Resultados y Discusión :

La respuesta de anticuerpos IgG contra el antígeno 38 kd en un grupo de individuos sanos de diferentes grupos étnicos vacunados con BCG en la población cubana mostró variabilidad individual. No se observó diferencias entre los diferentes grupos étnicos evaluados . La no reactividad de la respuesta de anticuerpos en la población sana vacunada con BCG evidencia la utilización de este antígeno como un marcador serológico en pacientes con tuberculosis pulmonar.

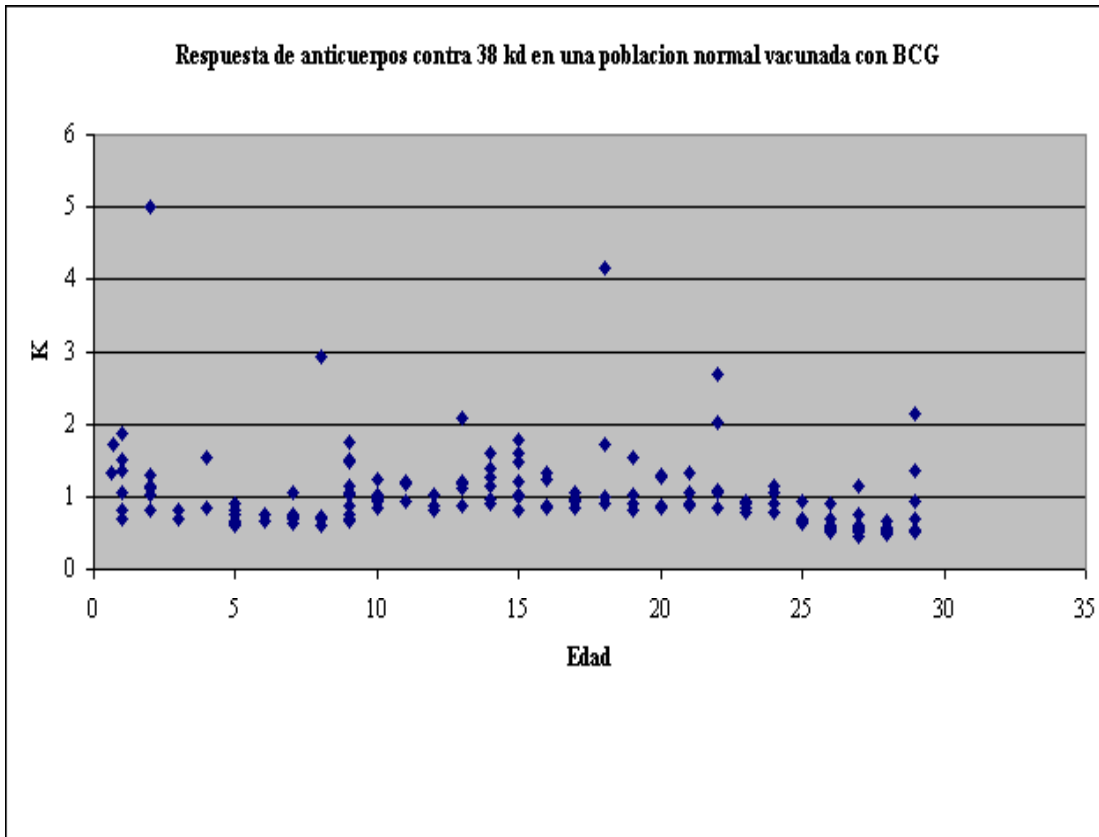
DESCRIPTIVE STATISTICS-----

HEADER DATA FOR: C: ELISATUB LABEL: elisa 38 kd

NUMBER OF CASES: 172 NUMBER OF VARIABLES: 1

Estadística descriptiva. Poblacion Normal

No	NAME	N	MEAN	STD.DEV.	MINIMUM	MAXIMUM
1	K	172	1.0041	.5575	.4600	5.0100



Bibliografía:

1. World Health Organization.1989.World Health Statistics Annual. WHO, Geneva. 11-12.
2. Glassroth, J., A. G. Robins, and D.E. Snider, Jr.1980.Tuberculosis in the 1980s. N.Engl. J. Med. 302:1441-1450.
3. Arloing , S. 1898. Agglutination de bacille de la tuberculose vraie. Comptes Rendues de l' Academie de Sciences 126: 1398-1400.
4. Engvall, E., and P. Perlmann. 1972. Enzyme- linked immunosorbent assay, ELISA, III: Quantitation of specific antibodies by enzyme- labeled anti- immunoglobulin in antigen- coated tubes. J. Immunol. 109: 129-135.

5. Nassau, E., E. R. Parsons, and G. D. Johnson. 1976. The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate and enzyme-linked immunosorbent assay. *Tubercle* 57:67-70.
6. Grange, J. M., J. Gibson, A. Batty, and T. Kardjito. 1980. The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis. *Tubercle* 61: 153- 157.
7. Tandon, A., R. P. Saxena, K. C. Saxena, Z. Jamil, and A. K. Gupta. 1980. Diagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay in tuberculosis using purified tuberculin antigen. *Tubercle* 61: 87-89.
8. Zeiss, C.R., S. B. Kalish, K. S. Erlich, D. Levitz, E. Metzger, R. Radin, and J. P. Phair. 1984. IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130: 845-848.

Bacteriófagos. Alternativa a los antibióticos en la lucha antimicrobiana

Dr. Carlos Vallin Plous

Departamento de Biotecnología, Centro de Química Farmacéutica, PO Box 6990, Cubanacán, Habana. Cuba.

E-mail: vallin@biocnic.cneuro.edu.cu

Resumen

Los bacteriófagos están siendo utilizados para luchar contra las bacterias patógenas más habituales en humanos y animales. Las investigaciones sobre el uso terapéutico de bacteriófagos, que han permanecido prácticamente abandonadas mientras los antibióticos han estado disponibles, pueden constituir sin embargo una alternativa de elección, ahora que el empleo de antimicrobianos es objeto de múltiples polémicas, debido a la elevada resistencia de las bacterias a los mismos. Al igual que las personas se ven atacadas por los virus, las bacterias pueden sufrir la acción de los bacteriófagos, un tipo de virus que invade su organismo y las destruye totalmente.

-Los Bacteriófagos

Las bacterias contienen un material genético (ADN) y todos los instrumentos (Ribosomas, Proteínas etc.) que necesitan para reproducirse por ellas mismas. Los Bacteriófagos solo contienen un material limitado y no tienen las herramientas constitutivas necesarias. Tienen que invadir las células bacterianas y secuestrar su maquinaria celular para reproducirse. Los bacteriófagos invaden adheriéndose a una célula e inyectando sus genes o permiten que las células se las traguen.

Los bacteriófagos hacen un hueco en la pared celular de la bacteria. Luego inyectan su material genético al aprovecharse de la maquinaria genética de la bacteria, los genes del bacteriófago ordenan a la bacteria empezar a fabricar nuevas partes del mismo. Estas partes se unen para conformar un nuevo bacteriófago dentro de la bacteria. Eventualmente tantos virus nuevos se producen dentro de la bacteria que esta explota y muere liberando así a los nuevos bacteriofagos que infectan más células y así sucesivamente hasta acabar con las mismas.

Los bacteriófagos tienen una alta especificidad frente a las bacterias, cada bacteria tiene su propio fago y pueden ser aislados de aguas de albañales, heces fecales, suelos, aguas de océanos etc. El procedimiento de aislamiento de los bacteriófagos es muy fácil (1).

Contexto histórico

En 1896 Hankin reportó actividad antibacteriana (*Vibrio cholerae*) de las aguas del río Ganges and Jumna, India y en 1915 E. Twort y F. d' Herelle aislaron de forma separada entidades filtrables destructoras de cultivos bacterianos. Más tarde en 1917 d'Herelle observó en aislados bacterianos de enfermos de disentería, la producción de sectores claros en un césped bacteriano a lo cual llamó bacteriófagos y paralelamente en 1917 George Eliava encontró actividad antibacteriana en las aguas del río Koura, Tbilisis, Georgia.

La terapia con fagos surge y se desarrolla entre 1917-1940 y mostró muchas promesas y controversias. Esta fue poco usada en la parte occidental producto de la aparición de los antibióticos en 1940. Sin embargo las

investigaciones clínicas intensivas y la implantación de la terapia con fagos continuaron llevándose a cabo en la parte oriental de Europa durante los últimos 50 años. Instituto de Inmunología y Medicina Experimental, academia de Ciencia de Polonia, Instituto de Bacteriofagos, Tbilisi, Georgia etc.(2,3)

Entre los principales problemas específicos iniciales sobre la eficacia en la terapéutica con fagos entre el 1917-1940 se encuentran (4):

- La carencia de conocimientos sobre la heterogeneidad (Lítico y lizogénico) y modo de acción y habilidad como agente terapéutico.
- La falta de selección de los fagos de alta virulencia contra los blancos bacterianos antes de usarlos en pacientes.
- El uso de un solo tipo de fago involucrado en mezclas de diferentes bacterias.
- La carencia de una caracterización apropiada y preparación de títulos de los fagos.
- La carencia de conocimientos para la neutralización del pH gástrico para la administración oral.
- Inactivación de los fagos en el fluido sanguíneo
- La carencia de conocimientos para la identificación de los patógenos

Resurgimiento de los bacteriofagos en la terapéutica de enfermedades infecciosas.

La aparición de la resistencia a antibióticos tanto en los antibióticos tradicionales como en las nuevas entidades han llevado a los científicos a retomar el interés en el desarrollo de las investigaciones en la terapia con fagos. De esta forma en la actualidad se reportan bacteriofagos para la terapia en infecciones con diferentes cepas bacterias (5, 6):

Brucellae, •Enterococci, •Pathogenic strains of Escherichia coli (e.g., O157:H7), •Klebsiellae (atypical pneumonia), •Mycobacterium tuberculosis, •Proteus (nosocomial urinary tract infections), •Pseudomonas aeruginosa, •Salmonellae (typhoid fever and food poisoning), •Serratia spp, •Shigella spp. (bacillary dysentery), •Staphylococci (skin abscesses, food poisoning, toxic shock syndrome), •Streptococci (strep throat), •Vibrio cholerae (cholera) •Yersinia spp (plague/black death).

Entre estas investigaciones se encuentran el Streptococcus pneumoniae del cual se han aislado hasta el momento unas 80 cepas diferentes causante de varios tipos de neumonías y esta asociadas con una larga lista de enfermedades entre las que se destacan la meningitis. Otitis del oído medio, conjuntivitis y otros procesos periodontales o urinarios. Esta bacteria es uno de los patógenos humanos más amenazadora, por la mortalidad y morbilidad que provoca en niños pequeños, ancianos y personas con un sistema inmune débil.

Conclusiones

La terapia con bacteriófagos puede tener beneficios significativos frente a la terapia antibiótica tradicional. Con el continuo aumento de la resistencia a antibióticos en bacterias, esta nueva terapia ofrece una alternativa efectiva. Además de ello, la terapia con bacteriófagos requiere teóricamente una única dosis. Debido a que los virus se replican en el interior de la bacteria diana, perdurarán en el cuerpo hasta que la infección sea erradicada. Los antibióticos, por otra parte, pueden requerir días o semanas de tratamiento continuo. El tratamiento es seguro debido a que el blanco de los virus son las bacterias invasoras y no las células humanas. Son varias las ventajas que los fagos presentan como alternativa a los antibióticos en la terapia de infecciones bacterianas dentro de las que se encuentran las siguientes:

- Los fagos pueden ser seleccionados y manipulados por ingeniería genética hasta obtener un espectro cerrado y sobre un blanco particular de bacteria patógena sin dañar el resto de la microflora bacteriana.
- Alta especificidad afecta solamente el receptor bacteriano. Evita cambios del desarrollo de infecciones secundarias.
- No presenta efectos secundarios. Capaz de reproducirse tanto como la bacteria hospedera presente en el medio ambiente lo cual reduce la administración repetida de fagos.
- La selección de nuevos fagos contra bacterias resistentes a fagos es un proceso rápido.
- La producción es simple y relativamente barata

Estos resultados demuestran que los bacteriófagos pueden ser utilizados para prevenir tanto infecciones locales como sistémicas provocadas por bacterias patógenas.

- Bibliografía

1. Hans-Wolfgang A and DuBow M. 1987 Virus of Prokaryotes I : General Properties of Bacteriophages. Practical Applications of Bacteriophages CRC Press, Boca Raton, Florida.
2. Carlton R M 1999 Phage therapy: past history and future prospects. arch.Immunol. Ther.Exp. 47 (5) 267-274
3. Kutter E. 1997 Phage Therapy: Bacteriophages As Antibiotics. The Nature of Bacteriophages. Nov15 1-24
4. Barrow P.A. and Soothill JS 1997 Bacteriophage therapy and Prophylaxis : rediscovery and renewed assessment of potential. Trends Microbiol. 5 (7) 268-271
5. Senior K. 2001 Bacteriophages: a rich store of new antibiotics? New update Vol. 6 No.17 865- 866
6. Fischetti V.A. 2001 Phage antibacterials make a comeback. News and Views Vol. 19 734-735

Validación del ELISA para cuantificar Interferón alfa 2b humano recombinante producido en el CIGB*

Tipo de actividad: Póster

Expositor: Amarylis Muñoz, Abrisleida Franco, Rudka Brito, Yamilé Massó, Ivette López, Julio César Sánchez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Resumen:

Los interferones (IFNs) son una familia heterogénea de citoquinas multifuncionales, las cuales son originalmente identificadas como proteínas responsables de la inducción de la resistencia celular para combatir la infección viral. Los interferones están divididos en dos grupos dependiendo de sus bases moleculares: tipo I (IFN alfa e IFN beta), los cuales son producidos por una variedad de células, una vez que se origina la infección viral, y el tipo II, los IFN gamma que son producidos por células T activadas y por células asesinas naturales.

En nuestro centro se produce el IFN alfa 2b humano recombinante (IFN alfa2bHu-rec) y se utiliza un ELISA tipo sandwich para cuantificar esta proteína en las diferentes etapas del proceso productivo, por lo cual fue necesario validar esta técnica evaluando los parámetros de linealidad, especificidad, exactitud y precisión, según las exigencias, para los métodos analíticos, establecidas en la Serie de Informes Técnicos 823 de la OMS.

El análisis de regresión lineal permitió eliminar el 98% de la dispersión de los valores obtenidos y el test de student para la comparación de dos regresiones lineales confirmó en los estudios de especificidad, que los tampones utilizados en la producción así como las proteínas contaminantes presentes en las muestras, no interfieren en la técnica. La exactitud del método se evaluó en un material de referencia de IFN alfa 2b humano recombinante comparando los resultados obtenidos por ELISA con los del Lowry.

El análisis de varianza de un diseño jerárquico indicó que la técnica tiene una variabilidad inferior al 20%.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica cumple con los parámetros que exige la validación de los métodos cuantitativos para la cuantificación del principio activo.

Materiales y métodos:

El ELISA se realizó en placas maxisop Nunc utilizando el IFN alfa2bHu-rec de material de referencia (1-4). Las muestras analizadas en los experimentos proceden del proceso de producción del IFN alfa2bHu-rec del lote 0710PA019. Se utilizó la Escherichia coli negativa en la preparación de soluciones, las cuales simulaban el nivel de proteínas contaminantes existente en las diferentes etapas de la producción del IFN alfa2bHu-rec. El equipamiento que se empleó en la validación forma parte del Laboratorio de Control de Procesos (Dirección de Producción), el cual está debidamente calibrado, según el plan de calibración de la Dirección de Calidad del CIGB. Se estudió la linealidad, rango de linealidad, límite de cuantificación, especificidad, exactitud y la precisión del ensayo. La especificidad se demostró utilizando un test de student

para la comparación de 2 regresiones lineales y la reproducibilidad se calculó a través de un diseño jerárquico.

Resultados y Discusión:

La linealidad del ensayo se comprobó a través del coeficiente de determinación (mayor que 0.98) y además, en el ANOVA de la regresión lineal se obtuvo un valor de probabilidad inferior a 0.01, indicando que la hipótesis nula ($H_0: \beta=0$), no se cumple, por lo cual existe una dependencia funcional lineal entre los valores de absorbancia a 492 nm y la concentración de interferón en las muestras. El rango de linealidad fue de 1.25 a 10 ng/mL y el límite de cuantificación fue de 1,25.

Tabla 2. Determinación del rango de linealidad de la curva de calibración.

Concentraciones de referencia en µg/mL	ensayo	10	5	2,5	1,25
Concentraciones experimentales en ng/mL	1	10.44	5.37	2.37	1.05
		10.05	4.96	2.46	1.09
	2	10.15	4.78	2.61	1.11
		10.08	4.81	2.63	1.14
	3	9.66	5.17	2.80	1.10
		9.85	5.17	2.85	1.11
	4	9.94	4.84	2.47	1.40
		10.16	4.79	2.81	1.16
	5	9.41	4.60	2.57	1.16
		10.15	4.68	2.58	1.14
CV inter-ensayo (%)		4.29	8.73	11.24	12.63
T student experimental		-0.12	-1.07	2.25	-1.69
T tabulada, 9, 0.05		2.262			

El ensayo tiene especificidad tanto en presencia de los tampones del proceso como de las proteínas contaminantes de la E.coli. En el test de student para dos regresiones lineales se obtuvo un valor de la t de student inferior a la t crítica, lo cual indica que las curvas de calibración preparadas en los tampones del proceso y en solución de E. coli, son paralelas con la curva de referencia del ensayo.

Tabla 3: Estudio de especificidad. Comparación de 2 pendientes.

Soluciones	Composición	t de student	t crítica
Tampón de lavado inicial	Tris 1.21g/L, EDTA 0.29 g/L, pH 7.0	2.078	2.178
Tampón de lavado con urea	Tris 1.21g/L, EDTA 0.29 g/L, Urea 4M	1.696	
Tampón de lavado con tritón	Tris 1.21g/L, EDTA 0.29 g/L, Tritón	0.687	
Tampón de renaturalización	Tris 60.57 g/L, NaCl 29.22 g/L	0.230	
Tampón de elución en IMAC	Glicina 15 g/L, NaCl 17.53 g/L, Ph 2.3	1.330	
IFN- <i>Escherichia coli</i> negativa (1:8)	<i>Escherichia coli</i> negativa a 80 ng/mL	-0.875	
IFN- <i>Escherichia coli</i> negativa (1:4)	<i>Escherichia coli</i> negativa a 40 ng/mL	0.742	
IFN- <i>Escherichia coli</i> negativa (1:2)	<i>Escherichia coli</i> negativa a 20 ng/mL	0.221	
IFN- <i>Escherichia coli</i> negativa (1:1)	<i>Escherichia coli</i> negativa a 10 ng/mL	-0.184	

Los resultados obtenidos por ELISA son comparables con el método del Lowry, según indicó el test de student de comparación de medias.

Tabla 4. Exactitud. Comparación del ELISA con el Lowry.

Rango	Lowry (ng/mL)	ELISA(ng/m L))										T exp	T tabulada
		10.167	10.039	10.027	9.942	9.989	10.014	9.843	10.04	9.924	10.164		
alto	10	10.167	10.039	10.027	9.942	9.989	10.014	9.843	10.04	9.924	10.164	-0.495	2.262
medio	2.5	2.717	2.218	2.52	2.542	2.403	2.511	2.668	2.42	2.442	2.734	-0.367	
bajo	1.25	1.239	1.207	1.175	1.27	1.225	1.523	1.42	1.252	1.213	1.283	-0.947	

Además, en ensayo es reproducible entre los analistas y tiene una variabilidad inferior al 20% . El coeficiente de variación entre analistas fue calculado a través de un diseño jerárquico, el cual permitió demostrar que el cambio de analistas permite cumplir con la especificación de la técnica en cuanto a su variabilidad (coeficiente de variación inferior al 20%).

Tabla 5: Reproducibilidad entre analistas

Muestras	CV(%)
Debris inicial	14.23
Sobrenadante de ruptura	4.24
Renaturalizado sin filtrar	1.72
Renaturalizado filtrado	8.54
Eluato quelato sin filtrar	2.11
Eluato quelato filtrado	3.74

BIBLIOGRAFÍA

1. C.Duarte, M.E Fernández de Cosío, G. Sierra, E. Pentón, A.Agraz, G. Furrázola y A.Aguilera. Anticuerpos Monoclonales de ratón contra el interferón recombinante alfa 2. Su empleo en la purificación y detección del antígeno. *Interferón y Biotecnología*, Vol. 4, No. 3, 221-232 (1987).
2. S. Cruz, C. Duarte, E. Ferra, G. Fontirroche, J. Vázquez, L. Martínez, N. Artiaga, E. Pérez y J. Gabilondo. Cuantificación de Interferón alfa 2b humano recombinante mediante anticuerpos monoclonales. *Biotecnología Aplicada* 1990. 7(2):132-141.
3. P. Tijssen. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: practice and theory of enzyme immunoassays*. Ed. Por R. H. Burdon y P. H. van Knippenberg 1985, 15: 385: Processing of data and reporting of results of enzyme immunoassays. Elsevier Amsterdam, New York Oxford.
4. PPO 4.32.185.00. Procedimiento para la cuantificación de Interferón α 2b Humano recombinante por ELISA, a las muestras entregadas al Departamento de Control de Procesos.
5. PPO 4.26.100.93,CIGB,1993. Protocolo maestro de validación de métodos analíticos
6. WHO/VSQ/97.02. Good manufacturing requirements. Part 2: Validation
7. Antonio Sigarrosa, "Biometría y diseño experimental", 1985.
8. Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. 32 Informe, OMS, Serie de Informes Técnicos 823, pág. 121-125; 1992.
9. Microsoft Excell, 1997.

Búsqueda de nuevos hospederos de Actinomicetos para la secreción de interferón alfa 2b humano recombinante. Reporte preliminar.

Autores: E. Pimienta, G. Rosabal, C. Rodríguez, R. Del Sol, A. Ramos, L. González, C. Vallín
Centro de Química Farmacéutica. Calle 200 y 21, Atabey, Playa, P.O.Box 16042, La Habana, Cuba.

Resumen

Para estudiar la producción secretora de proteínas heterólogas en cepas de Actinomicetos fue seleccionado inicialmente el interferón alfa 2b humano recombinante (IFN α 2b_{hum-rec}) como proteína modelo. Para ello fueron construidos los vectores bifuncionales *Escherichia coli-Streptomyces* pUWL- Δ 2 y pUWL-7.5; los cuales utilizan, como señal de secreción, el péptido señal de la Lipasa A de *Streptomyces exfoliatus* M11 (ps-*lipA*). pUWL-7.5 codifica para una fusión directa entre el ps-*lipA* y el IFN α 2b_{hum-rec}, mientras que pUWL- Δ 2 codifica para una proteína de fusión ps-*lipA*/IFN α 2b_{hum-rec} con seis aminoácidos adicionales entre el ps-*lipA* y el IFN α 2b_{hum-rec}. Estos plásmidos fueron introducidos por conjugación en las diferentes cepas de Actinomicetos seleccionadas: *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus*, Actinomiceto CCCMCQF-705 (705) y *Streptomyces lividans* TK 21 (control). Los exconjugantes obtenidos fueron crecidos en un medio optimizado para su crecimiento en la presencia de 3-5 μ g de tioestreptona/ml durante 72 horas. Los niveles de interferón secretado en los sobrenadantes de cultivos de los exconjugantes fueron cuantificados mediante la técnica de ELISA. Los exconjugantes de *S. lividans* [pUWL-7.5] y los de *S. lividans* [pUWL- Δ 2] secretaron aproximadamente 40 ng/ml de IFN α 2b_{hum-rec} a las 48 horas (niveles máximos). Tanto los exconjugantes de 705 [pUWL-7.5] como los exconjugantes de 705 [pUWL- Δ 2] secretaron bajos niveles de interferón (<10 ng IFN α 2b_{hum-rec}/ml). En el caso de los exconjugantes de *S. griseus* y *S. albus* no se detectó IFN α 2b_{hum-rec} en sus sobrenadantes de cultivos.

Introducción

Los Actinomicetos son bacterias gram positivas que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, fundamentalmente en los suelos donde su gran mayoría son aerobios. Dentro de ellos, los *Streptomyces*, microorganismos no patógenos industrialmente conocidos por la producción de diferentes antibióticos y enzimas hidrolíticas, poseen la capacidad de secretar proteínas en grandes cantidades. Es por ello que en los últimos años se ha investigado dicha capacidad secretora con la finalidad de convertirlo en un sistema hospedero para la producción comercial de proteínas de interés terapéutico¹.

Entre los *Streptomyces*, *Streptomyces lividans* 66 es el que más extensivamente ha sido utilizado para la expresión de genes clonados. Esta cepa y sus derivados TK tienen una barrera reducida de restricción-modificación y un bajo nivel de actividad proteolítica extracelular. Además, conservan la habilidad de producir grandes cantidades de proteínas extracelulares. Por otra parte, existe un amplio conocimiento sobre los métodos de introducción de ADN: transformación y conjugación².

Dada la poca información de que se dispone sobre la utilización de otras cepas de Actinomicetos como hospederos y el potencial biológico que representan estos microorganismos basado en su gran diversidad nos propusimos en este estudio la búsqueda de nuevos hospederos de Actinomicetos teniendo como antecedentes los resultados obtenidos utilizando a *S. lividans* como hospedero heterólogo en la secreción de interferón alfa

2b humano recombinante(IFN α 2b_{hum-rec}) fusionado al péptido señal de la Lipasa A de *Streptomyces exfoliatus* M11 (ps-*lipA*)³.

Materiales y Métodos

Las manipulaciones de ADN en *Escherichia coli* fueron realizadas utilizando la cepa JM 109 (Promega). Las cepas de Actinomicetos seleccionadas: *Streptomyces griseus* 40235, *Streptomyces albus* ATCC 17900, Actinomiceto CCCMSQF-705 (705) y *Streptomyces lividans* TK 21 (control) fueron crecidas por duplicado en medio sólido MS a diferentes concentraciones de tioestreptona: 12.5; 25; 30; 40 y 50 µg/ml, exceptuando a *S. lividans* (cepa control). Este ensayo nos permitió conocer aquella concentración mínima de tioestreptona a la cual no crece el microorganismo (concentración mínima inhibitoria) y por consiguiente establecer confiablemente una concentración para la selección de los futuros exconjugantes (concentración de trabajo).

Las manipulaciones genéticas en *E. coli* y Actinomicetos fueron realizadas de acuerdo a Sambrook y cols (1989)⁴ y Kieser y cols. (2000)⁵, respectivamente. En la Tabla 1 aparecen reportados los plásmidos utilizados y obtenidos en este trabajo.

Tabla 1. Plásmidos utilizados

Cepas/plásmidos	Descripción	Referencias
pUCAO	Vector conjugativo bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> derivado del pUWL-KS ⁵	Lab. de Genética C Q F
pUWL-7.5	Inserto <i>EcoRI/HindIII</i> del pUCIAS ³ clonado en pUCAO	Este trabajo
pUWL-Δ2	Inserto <i>EcoRI/XhoI</i> -klenow del pAΔXS ³ clonado en pUCAO	Este trabajo

La introducción de ADN plasmídico en las diferentes cepas de Actinomicetos mediante la técnica de conjugación fue realizado de acuerdo a Rosabal y cols, 2001⁶. Para el crecimiento en medio líquido de las diferentes cepas salvajes de Actinomicetos y de los exconjugantes obtenidos fueron seleccionados los medios de cultivos solubles: trypticase soy broth (TSB, Oxoid) y BTSB (10% sacarosa, 1.7% triptona, 1% extracto de levadura, 1% glucosa, 0.5% harina de soya, 0.5% NaCl y 0.25% K₂HPO₄).

La determinación de IFNα2b_{hum-rec} en los sobrenadantes de cultivos de los diferentes exconjugantes obtenidos se realizó mediante la realización de un ELISA tipo sandwich específico⁷.

Resultados y Discusión

En este trabajo fueron seleccionadas 3 cepas de Actinomicetos como posibles hospederas para la producción heteróloga de interferón alfa 2b humano recombinante: *S. griseus*, *S. albus* y Actinomiceto CCCMSCQF 705. También se incluyó, como cepa control de este estudio, a *S. lividans* TK 21 dado los resultados obtenidos anteriormente³. Los plásmidos conjugativos utilizados en este estudio, pUWL-Δ2 y pUWL-7.5, codifican para dos tipos de proteínas de fusión ps-*lipA*/ IFNα2b_{hum-rec} diferentes: pUWL-7.5 codifica para una fusión directa “in-frame” entre el ps-*lipA* y el IFNα2b_{hum-rec}, mientras que pUWL-Δ2 codifica para una proteína de fusión con seis amino ácidos adicionados entre el ps-*lipA* y el IFNα2b_{hum-rec}.

Con la finalidad de conocer el crecimiento de las cepas salvajes en presencia de tioestreptona (tsr) en medio sólido, se realizó un gradiente de este antibiótico. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 2 Resultados del gradiente de concentración de tioestreptona

Cepa de Actinomiceto	Concentración mínima inhibitoria de tsr (µg/ml)	Concentración de tsr de trabajo (µg/ml)
<i>S. griseus</i> 40235	25	30
<i>S. albus</i> ATCC 17900	25	30
Actinomiceto CCCMSCQF-705	12.5	25

Conociendo la concentración de tioestreptona de trabajo para cada cepa se realizó la introducción de los plásmidos pUWL-7.5 y pUWL-Δ2 en las 4 cepas seleccionadas (incluyendo a *S. lividans*) mediante la técnica

de conjugación. Se obtuvieron un número suficiente de exconjugantes aislados, lo cual nos permitió seleccionar aleatoriamente 3 réplicas para cada cepa con cada uno de los dos plásmidos. Con las suspensiones de esporas de cada exconjugante seleccionado se realizó un estudio en medio líquido utilizando los medios BTBS y TSB. Primeramente se estudió el crecimiento de las cepas salvajes en ambos medios y en todos los casos hubo mejor crecimiento en el medio BTBS. Los exconjugantes también tuvieron un crecimiento similar en el medio BTBS en presencia de 3-5 µg/ml de tioestreptona. Con la finalidad de chequear que los exconjugantes obtenidos de cada cepa fuesen exconjugantes verdaderos se realizó el aislamiento de ADN plasmídico para cada réplica y se corroboró por chequeo de restricción (resultados no mostrados) que el proceso de transferencia conjugativa de ADN plasmídico de *E. coli* a *Streptomyces* ocurrió satisfactoriamente. Los exconjugantes de las diferentes cepas de Actinomicetos con los plásmidos pUWL-7.5 y pUWL-Δ2 fueron crecidos en medio BTBS durante 72 h. Muestras de sobrenadantes de cultivo de 24, 48 y 72 h de cada réplica fueron conservadas a -70 °C para su posterior análisis por ELISA. Este ensayo detectó que los exconjugantes de *S. lividans* [pUWL-7.5] y de *S. lividans* [pUWL-Δ2] secretaron aproximadamente 40 ng/ml de IFNα2b_{hum-rec} a las 48 horas (niveles máximos) mostrando un comportamiento diferente respecto a los transformantes de *S. lividans* con los respectivos plásmidos bifuncionales no conjugativos pUCIAS y pAΔXS, en los cuales se obtuvo niveles de 100 ng/ml en *S. lividans* [pAΔXS] y 15 ng/ml en *S. lividans* [pUCIAS] a las 48 h de cultivo (niveles máximos). Los exconjugantes de 705 [pUWL-7.5] y los exconjugantes de 705 [pUWL-Δ2] secretaron niveles de interferón inferiores (<10 ng IFNα2b_{hum-rec}/ml). En el caso de los sobrenadantes de cultivos de los exconjugantes de *S. griseus* y *S. albus* no fue detectado IFNα2b_{hum-rec}. Por lo que *Streptomyces lividans* muestra los niveles de IFNα2b_{hum-rec} secretado más elevados en los sobrenadantes de cultivos ya sea por el método de conjugación o de transformación.

Nuevas cepas de Actinomicetos deben ser analizadas con la finalidad de buscar un mejor hospedero para la producción secretora de proteínas heterólogas y en particular de esta proteína.

Bibliografía

- 1-Binnie C, Douglas C, Stewart D I H. 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Biotechnology* 15: 315-320.
- 2- Engels J W, Koller K P. 1992. Gene expression and secretion of eukaryotic proteins in *Streptomyces*. En: *Transgenesis* (Murray, J. A. H., Ed.) 32-53. John Wiley and Sons, New York.
- 3- Pimienta E, Fando R, Sánchez JC, Vallin C. 2002. Secretion of human interferon alpha 2b by *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 189-194.
- 4-Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 5- Kieser T, Bibb MI, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- 6- Rosabal G, del Sol R, Rodríguez C, Pimienta E, Marrero K, González L, Otero I, Figarola A, Vallin C. 2001. Vector de clonación para la transferencia conjugativa de ADN de *E. coli* a *Streptomyces* spp.. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, Vol. 32, No 2.
- 7-Pérez EM, Pérez LC, Marañón VM, Mella CM. 1991. Tratamientos analíticos de muestras de IFN alfa h-rec. para su cuantificación por ELISA. *Biotechnol Apl* 8: 392-399.

Obtención de un Mapa de Péptidos Para el G-Csf

H. de Armas Díaz, A.Vallín García.
Centro de Inmunología Molecular. Calle 216 esq. a 15,
Atabey, Playa. Apartado Postal 16040, Habana 11600,
Cuba. Tel: (537) 218297 Fax: (537) 335049, 333509
hugo@ict.cim.sld.cu ; vallin@ict.cim.sld.cu

RESUMEN: El mapeo peptídico es una de las más poderosas y sensibles técnicas analíticas disponibles para el análisis de proteínas, pues permite verificar con gran aproximación la estructura primaria de éstas.

A inicios de los 90, agencias regulatorias, la Asociación de Productores Farmacéuticos y otras organizaciones recomendaron el uso del mapeo peptídico para asegurar la estabilidad genética y la consistencia de los productos biofarmacéuticos. El factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) es una proteína que regula la producción y liberación de los neutrófilos funcionales de la médula ósea. Es utilizada para reducir la duración de la neutropenia y la incidencia de la neutropenia febril en los pacientes con neoplasias no mielógenas que reciben tratamiento con quimioterapia citotóxica no convencional. Esta proteína se obtiene de forma recombinante en *E.coli* y se purifica en el Centro de Inmunología Molecular. Como parte del desarrollo de este producto, fue necesaria la implementación de una técnica de mapeo peptídico, con el fin de detectar posibles cambios o alteraciones en su estructura primaria. Se ensayaron diferentes estrategias y metodologías con el fin de minimizar el tratamiento de la muestra y obtener un rendimiento adecuado en el menor tiempo posible. El método finalmente propuesto para realizar el mapa de péptidos del G-CSF evita la precipitación después del cambio de tampón. Además se obtiene mayor recobrado de los péptidos, menor tiempo de análisis y un ahorro en cuanto a la cantidad de muestra a utilizar.

INTRODUCCION.

El mapeo peptídico es usado fundamentalmente en la industria biotecnológica con dos objetivos: como prueba de identidad en controles de calidad y para la caracterización estructural de productos de naturaleza proteica, además el mapeo peptídico se considera una huella dactilar de la proteína y se usa ampliamente para determinar la pureza de recombinantes biológicos, lo que permite disponer de un criterio de aceptación o rechazo para la liberación de lotes de un producto

El mapeo peptídico no es un método general, lo que trae como consecuencia que para cada proteína que se quiera desarrollar un mapa sea necesario emplear técnicas específicas según sus propias características.

MATERIALES Y METODOS.

Todas las muestras utilizadas fueron obtenidas de los lotes del escalado del G-CSF realizado en el Departamento de R&D del Centro de Inmunología Molecular. Todos los reactivos usados fueron adquiridos a PlusOne y a AmershamPharmacia-Biotech.

Método propuesto por Jones *et al* para el mapeo de péptidos del G-CSF(1993). (Fig. 1)

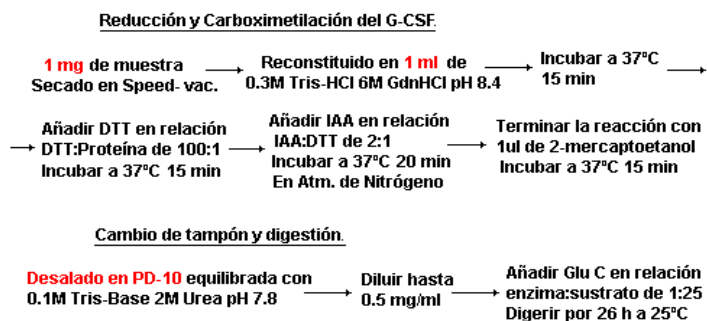


Figura 1.

Separación.

La separación de los péptidos se realizó mediante un método de RP-HPLC. Se tomaron 100µl de la muestra digerida conteniendo alrededor de 50µg de G-CSF y se aplicaron a una columna de fase reversa C4, 250X4.6mm, Pharmacia™, previamente equilibrada a 30°C con 97% tampón A (TFA 0.1%/agua) y se realizó un gradiente de 3% a 80% del tampón B (TFA 0.09%/AcN 90%/agua) durante 120 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El método previamente publicado por Jones *et al.* (1993) presenta varias desventajas, como son:

El uso de 1mg de muestra en cada determinación, lo que constituye una cantidad de muestra considerable, provocando un encarecimiento de la técnica. Se decidió trabajar con 100ug de muestra, ya que de esta manera se evita un gasto innecesario de proteína y se necesita una menor cantidad de enzima para la digestión.

Se observaron problemas en la aplicación de la técnica, pues en el cambio de tampón, una vez reducida y carboximetilada la muestra, ocurrió precipitación de la

proteína. Por esta razón se intentaron diferentes estrategias de desalado. Ver **Tabla 1**.

Método	Cambio de tampón	Precipitación	
		SI	NO
Gel filtración	Tampón A a Tampón C	X	
Diálisis	Tampón A a Tampón C	X	
RP-HPLC	Tampón A a Tampón C	X*	
RP-HPLC	Tampón B a Tampón C		X
Ppt. con Etanol	Tampón B a Tampón C		X

Tabla 1. Estrategias de desalado utilizadas.

X* La precipitación tuvo lugar durante la digestión.

Tampón A: 6 M GdnHCl, 0.3 M Tris-HCl, pH 8.4

Tampón B: 8 M Urea, 0.3 M Tris-HCl, pH 8.4

Tampón C: 2 M Urea, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8

También es un inconveniente la duración prolongada de la digestión (26 horas), lo que atenta contra la rapidez de la técnica, provocando que no se disponga de un resultado con mayor celeridad, lo que es crítico para la liberación lote a lote.

Según los resultados experimentales, el problema de la precipitación se resuelve al carboximetilar la muestra en tampón 8 M Urea, 0.3 M Tris-HCl, pH 8.4 y digerir en tampón 2 M Urea, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8. Todo parece indicar que el uso de tampones de diferente naturaleza favorece las interacciones hidrofóbicas, durante el cambio de tampón, provocando entonces la precipitación de la proteína.

Al evitar la precipitación después del cambio de tampón, se pudo pasar a la digestión de la proteína.

Empleando un desalado por RP-HPLC, después de digerir con Glu C se obtuvieron los cromatogramas de la **Figura 2**.

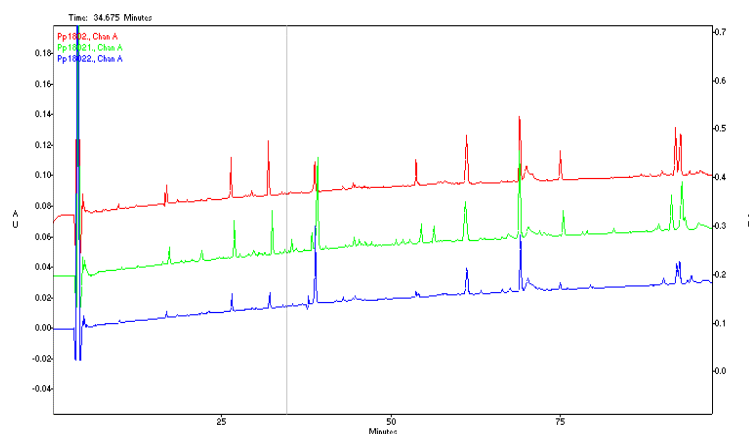


Figura 2. Digestión de G-CSF desalado por un método de RP-HPLC. Se utilizaron distintas molaridades de Urea durante la digestión (2M, 2.2M y 2.4M).

Véase, como a medida que aumenta la concentración de Urea, se observan menos péptidos como consecuencia de la digestión incompleta, debido a una inhibición de la enzima. Realizando el cambio de tampón por el método de precipitación con etanol y digiriendo con Glu C se obtuvieron aún mejores resultados.

Se probó además el efecto de la temperatura en el secado, se secaron muestras a 25 y 35°C y no se observaron diferencias en los mapas obtenidos. Como no hubo afectación alguna en la integridad del G-CSF asumimos que es posible aumentar hasta 35°C la temperatura en el secado inicial, reduciéndose de esta manera, el tiempo de duración de la técnica.

Durante la precipitación con etanol se evidenciaron diferencias en el recobrado de los péptidos, en dependencia de la agitación o no de la muestra, después de añadir el etanol, según se observa en las **figuras 3 y 4**. Esto pudiera deberse a que tenga lugar una inhibición de la Glu C por presencia de Urea aún después de la precipitación o porque el método no presente un buen recobrado y se produzca pérdida de una parte de la proteína durante la precipitación.

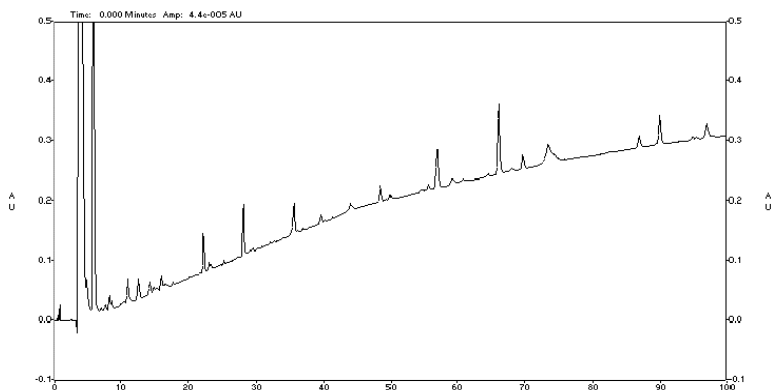


Fig 3. Digestión de G-CSF precipitada con etanol sin agitación.

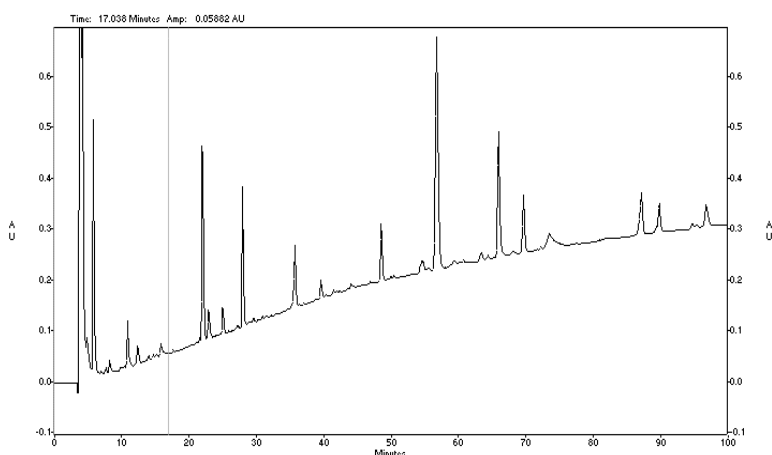


Fig 4. Digestión de G-CSF precipitada con etanol y agitación.

Por los resultados obtenidos experimentalmente se propone el método descrito en la **figura 5** para realizar el mapeo de péptidos del G-CSF.

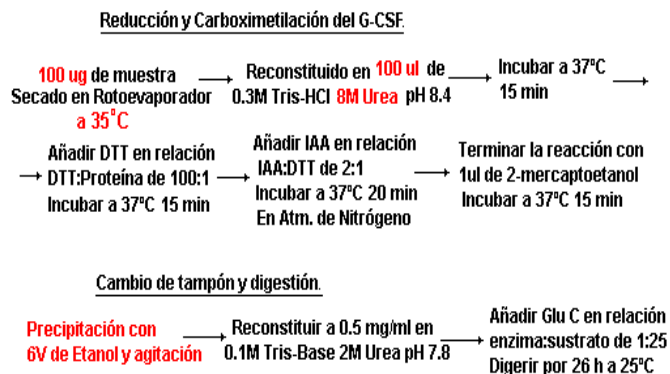


Figura 5. Método final propuesto para el mapeo.

CONCLUSIONES

El método propuesto finalmente para realizar el mapa de

péptidos del G-CSF evita la precipitación después del cambio de tampón, se obtiene un mayor recobrado de los péptidos, un menor tiempo de análisis y un ahorro en cuanto a la cantidad de muestra a utilizar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Allen D. *et al. Biologicals*. Vol 24. Pp 255-275. (1996).
- Amgen. *Patente # 4,810,643*. (1989).
- Cohen A. M. *et al. Proc. Natl. Sci. USA*. Vol 84. Pp 2484-2488. (1987).
- Charman A. S. *et al. Pharmaceutical Research*. Vol 10. No 10. (1993).
- Dougherty J. Jr. *et al Analytical Biochemistry*. Vol 190. Pp 7-20. (1990).
- Herman, T. C. Boone *et al. Formulation, Characterization and Stability of Proteins Drugs*. (1996).
- Hill Ch. P. *et al. Proc. Natl. Sci. USA*. Vol 90. Pp5167-5171. (1993).

- Jones D. M. *et al.* **Analytical Biochemistry ZIG**. Pp 135-146. (1994).
- Kuga Y. Komatsu *et al.* **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol 159. Número 1. (1989).
- Lu H. S. *et al.* Factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Vol 268, Pp 81-92. (1989).
- Lu H. S. *et al.* His---Gln isoforms produced in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. Vol 4. Pp 465-472. (1993).
- Nagata Shigekazu. **Bio-assays**. Vol 10. No 4. (1989).
- O'Connor V. J. **Biologicals**. Vol 21. Pp 111-117. (1993).
- Welte K. *et al.* **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA. Vol 85. Pp 1526-1530. (1985).
- Welte K. *et al.* **J. Exp. Med.** Vol 165 Pp 941-948. (1987).

“Evaluación de la estabilidad de un medio libre de proteínas para la producción de biomoléculas.”

Autores: Lourdes Bouzó López, Jania Suárez Silverio, Eduardo Ojito Magaz, Gumersinda Bombino, Ivonne Álvarez, Mey- Len Chea, Cynan Díaz.

Institución de procedencia: Centro de Inmunología Molecular.

Resumen:

En los últimos años ha surgido una opción atractiva para la completa eliminación de macromoléculas de origen proteico de los medios de cultivo. Sin embargo, el diseño completo de medios libres de proteínas es difícil y su campo de aplicación es limitado. El éxito depende en gran medida del desarrollo de clones celulares con requerimientos de proteínas muy bajos. El devenir histórico de los medios libres de proteínas se basa en la sustitución racional de los suplementos de origen proteico en suplementos de origen no proteico.

La línea celular CHO transfectada con el gen de la Eritropoyetina humana recombinante se adaptó a crecer en el medio comercial libre de proteínas PF-CHO. Se demostró que la adaptación en un solo paso es factible de efectuar sobre esta línea celular y que el estado fisiológico de partida es decisivo para la respuesta del cultivo durante el proceso. El medio libre de proteínas empleado logró alcanzar los niveles de producción probados, siendo esto beneficioso para el diseño de futuros procesos cromatográficos con mayor rentabilidad.

La estabilidad de la producción no se vio afectada por la permanencia de la línea durante largos períodos de tiempo, lo cual confirma la hipótesis de que los medios libres de proteínas inducen mayor estabilidad a las líneas celulares en comparación con los medios suplementados con suero fetal bovino.

Los *objetivos* que se persiguen al iniciar este trabajo es realizar un estudio en diferentes intervalos de tiempo (hasta 60 días) de las variables que caracterizan el crecimiento y el metabolismo de la línea celular (CHO), modificadas genéticamente para la producción de Eritropoyetina Humana Recombinante y adaptada a crecer en medio libre de suero comercial (HyQ PF-CHO) que conforman el banco de trabajo.

Introducción.

En la actualidad la mayor parte de los procesos de producción de biofármacos a escala mundial, se realizan con el empleo de nuevas técnicas de fermentación de células superiores, y se encaminan numerosos esfuerzos científico - técnicos para lograr el desarrollo de procesos eficientes en el cultivo celular a gran escala para la producción de múltiples biomoléculas para lo cual se han definido un gran número de medios libres de suero capaces de mantener el crecimiento y la producción de las células en niveles similares y superiores, a los alcanzados en los medios de cultivo suplementados con suero, a un costo aceptable.

Un aspecto fundamental para garantizar la conservación de un nuevo producto biofarmacéutico, es el cuidado y conservación de la línea celular que se utiliza para su producción y la única forma de lograr esto es a través del establecimiento de los bancos celulares estables para la producción por largos periodos.

Materiales y Métodos.

Línea celular: EPOhr

Medio de cultivo: HyQ PF-CHO.

Condiciones Experimentales: Frascos agitados de 250 ml., Agitación 60 r.p.m., Temperatura de incubación 37°C.

Diseño de experimental:

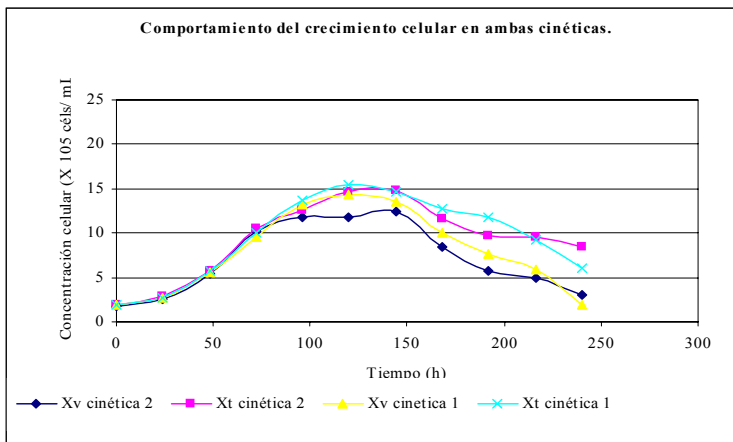
Estudio Cinético # 1	Estudio Cinético # 2
- Montaje al mes de cultivo continuo.	- Montaje a los dos meses de cultivo continuo.
- Sistema Bacth.	- Sistema Bacth.
- Volumen Final 250 ml	- Volumen Final 250 ml
- Dos réplicas.	- Dos réplicas.
- Ajuste inicial 0.20 células/ml	- Ajuste inicial 0.20 células/ml
- Toma de muestras cada 24 horas	- Toma de muestras cada 24 horas

Análisis de las muestras de cada estudio:

Conteo Celular: Cámara de Neubauer *Cuantificación de EPOhr*: Método de ELISA diseñado en el CIM

Resultados y discusión.

Fases del crecimiento celular:



La Figura 1. muestra el comportamiento de la línea celular CHOhr a través del estudio cinético de las variables que describen el crecimiento y la muerte del cultivo transcurrido el primer y segundo mes de cultivo. En ambos casos se aprecian bien delimitadas las cuatro fases del crecimiento celular (latencia, exponencial, estacionaria y muerte).

Fig. 1 Curvas decrecimiento de ambas cinéticas

Las velocidades específicas de crecimiento en la fase exponencial muestran diferencias, durante el primer mes alcanza un valor de $0,0580 \times 10^5 \text{cél/mLh}$, el cual se incrementa después de dos meses de cultivo a $0,0798 \times 10^5 \text{cel/mLh}$ lo que puede asociarse a que en sistemas de transfección, el ADN recombinante en la medida que se incrementa el tiempo de cultivo de la línea pierde copias de genes, por tanto disminuye la carga genética, lo cual se traduce en una disminución de la cantidad de material genético a transcribir y la célula dedica más energía a crecer, incrementándose la velocidad específica de crecimiento cuando transcurren dos meses de cultivo celular continuo.

Fase exponencial	<i>Cinética 1</i> (1 mes de cultivo)	<i>Cinética 2</i> (2 meses de cultivo)
------------------	---	---

Velocidad de Crecimiento Específica ($\times 10^5$ cél/mL h).	0,0580	0,0798
Velocidad de Producción Específica ($\times 10^{-5}$ μ g/ mL h).	0,0605	0,0588

Tabla # 1. Comparación de parámetros de crecimiento y producción de ambos estudios.

La velocidad específica de producción (q EPO) durante la fase exponencial muestra valores muy cercanos para ambos estudios. Esta similitud entre las q EPO se atribuye a que los sistemas recombinantes poseen marcadores de selección, los cuales permiten aislar los clones deseados⁽⁶⁾. Para el caso de nuestra línea celular el marcador de selección empleado es DHFR/MTX, este sistema impone que el medio de cultivo utilizado no puede contener ni Hipoxantina, ni Timidina, porque ambos son precursores directos de bases nitrogenadas. El medio en que estas células fueron adaptadas a crecer (HyQ PF-CHO) cumple con estos requerimientos, manteniendo la presión selectiva sobre la línea celular la cual no pierde la capacidad de expresión de la Eritropoyetina aún cuando el intervalo de tiempo sean 60 días de cultivo.

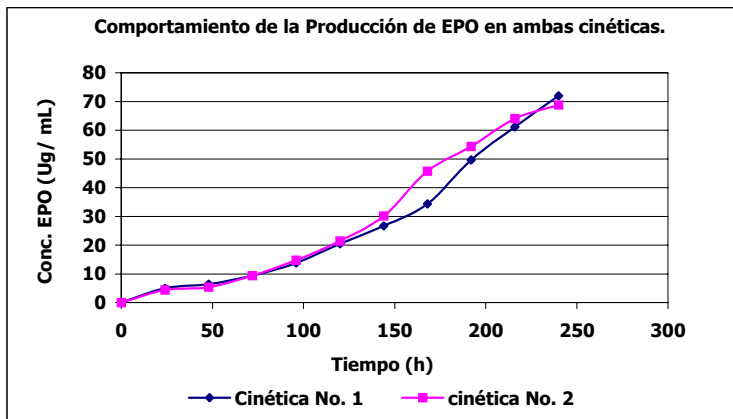


Fig.2 Producción de EPOhr en ambos estudios.

La Figura 2. muestra que la producción de EPO mantiene el mismo patrón de producción aún cuando existe un tiempo de diferencia de 30 días entre ambas cinéticas.

Relacionando los resultados obtenidos del comportamiento del crecimiento celular en ambos estudios con la producción de EPO se evidencia que en la fase estacionaria donde la velocidad específica de crecimiento es aproximadamente cero existe un incremento de la producción de la molécula de interés. Esto induce a pensar que en esta línea celular la producción no se encuentra directamente asociada al crecimiento lo cual ha sido reportado en la literatura para varias líneas celulares.

Todo lo expuesto con anterioridad nos permite afirmar que la nueva línea celular CHOhr obtenida, es capaz de mantener la producción de Eritropoyetina de **forma estable** durante 60 días de cultivo continuo.

Referencias Bibliográficas.1-Arias M. A., Chico E., Borrego Y., Pérez T., Benítez E. Y Suárez Y. Perfeccionamiento del proceso productivo de Eritropoyetina Humana Recombinante. Ponencia Relevante del XIII Forum Nacional de Ciencia y Técnica, Habana, Cuba, Enero 2001.

2-Banik G. y Heath C. (1995) Hybridoma Growth and Antibody Production as a Function of Cell Density and Specific Growth Rate in Perfusion Culture. Biotechnol. Bioeng. 48: 289-300.

Validación de la técnica del *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), para la determinación de la concentración de endotoxinas en las muestras procedentes del proceso de producción de la vacuna contra la Hepatitis B.

Lic. Jorge Rodríguez Durán, Téc. Jorge Alberto Mederos Tasé, Lic. Aixa Oteros Reyes, Lic. Julio C. Sánchez García, Lic. Amarilis Muñoz García.
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Resumen:

Las endotoxinas son compuestos de gran peso molecular asociados a la membrana externa de las bacterias gram negativas y constituyen uno de los contaminantes más perjudiciales en compuestos parenterales.

Precisamente el LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*), es un método para determinar cuantitativamente endotoxinas bacterianas en medios acuosos. Esta técnica se basa en la activación de una cascada enzimática por la presencia de endotoxinas bacterianas. Las enzimas activadas liberan la p-NA de un sustrato sintético y cromogénico, dando lugar a una coloración amarilla, la que al ser leída a 405 nm cuantifica la cantidad de endotoxina presente en el sistema.

Esta técnica es aplicable a muestras que proceden de la producción de la vacuna contra la Hepatitis B para la cuantificación de posibles trazas de endotoxinas que puedan influir en la calidad del producto, por lo que fue necesario validar esta técnica evaluando los parámetros de linealidad, especificidad, precisión y límite de detección según las exigencias, para los métodos analíticos, establecidas en la Serie de Informes Técnicos 823 de la OMS.

El análisis de regresión lineal permitió eliminar el 98% de la dispersión de los valores obtenidos y el test de student para la comparación de dos regresiones lineales confirmó en los estudios de especificidad, que los tampones utilizados en la producción, no interfieren en la técnica.

El análisis de varianza de un diseño jerárquico indicó que la técnica tiene una variabilidad inferior al 20%, además quedó demostrado que es capaz de detectar hasta 0,01UE/mL. Los resultados obtenidos reflejan, que la técnica cumple con los parámetros que exige la validación de los métodos cuantitativos para la determinación de impurezas.

Introducción:

El LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*), es el método más sensible, rápido y específico para determinar cuantitativamente endotoxinas bacterianas en medios acuosos.

El presente trabajo tiene como objetivo fundamental obtener una evidencia documentada de los parámetros críticos que influyen en la calidad de los resultados analíticos en la correcta cuantificación de la concentración de endotoxinas de las muestras procedentes de los procesos de producción de la vacuna contra la Hepatitis B. Los parámetros estadísticos a medir son precisión, especificidad, límite de detección y linealidad.

El método objeto de la validación está clasificado como: Método cuantitativo para la determinación del límite de impurezas, siendo de categoría IV según la serie 823 de los informes técnicos de la OMS de 1992, de validación de métodos analíticos.

Materiales y Métodos:

Los parámetros evaluados fueron: linealidad, límite de detección, especificidad y precisión.

La linealidad es la proporcionalidad que existe entre la concentración del analito y la absorbancia a una longitud de onda determinada. Para determinar la relación existente entre concentración del analito y la absorbancia a 405 nm, se realizó una curva de calibración del Material de Referencia con las siguientes concentraciones: 1; 0,5; 0,25 y 0,1 UE/mL, realizando como mínimo tres réplicas para cada concentración. El límite de detección es la menor concentración o cantidad de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado. Es la menor cantidad que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Se realizaron como mínimo 6 determinaciones del fondo. El límite de detección se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$CL = 3 \times S_{\text{blanco}} / b$$

donde:

CL: Límite de detección.

S_{blanco} : Desviación estándar de las respuestas de los n blancos.

b: Pendiente de la recta de calibración.

La especificidad es la habilidad de un método para detectar exclusivamente el analito de interés. Se realizó una comparación de la pendiente de la curva de referencia (tampón del ensayo) con la pendiente de cada curva preparada en las soluciones tampones del proceso. La comparación se realiza calculando el valor de la t de student para un 95 % de confianza y los grados de libertad totales de las dos curvas que se comparan.

La precisión mide la dispersión de los valores analíticos respecto a una media. Refleja el error aleatorio. Expresa la variación de los resultados. Las medidas numéricas de la precisión son la desviación estándar y el coeficiente de variación y está referida a la variabilidad de las mediciones dentro de un conjunto. En este punto se incluyen la repetibilidad y la reproducibilidad. Se estudió la variabilidad del material de referencia en un mismo ensayo a las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1,0 UE/mL, y de muestras de MPA del antígeno de superficie de la Hepatitis B, en su dilución de trabajo. También se estudió la variabilidad de las muestras de MPA en tres días diferentes por dos analistas.

Resultados y Discusión.

Se probó que existe una relación lineal entre la absorbancia a 405 nm y la concentración de un material de Referencia correspondiente al kit.

Se realizó el ajuste de regresión de los valores de absorbancia con los de concentración mediante el método de los Mínimos Cuadrados Lineales.

Los coeficientes de determinación de cada curva fueron los siguientes:

Curva 1: 0,9976

Curva 2: 0,9976

Curva 3: 0,9967

Se realizó un análisis de varianza con cuatro pares de datos de absorbancia y concentración de la curva de calibración para probar la hipótesis nula de que no hay regresión ($\beta=0$). En todos los experimentos se obtuvo un valor de probabilidad asociada al valor de F inferior a 0,01, lo cual indica que no se cumple la hipótesis nula ($\beta=0$) y que ajustando una recta de regresión eliminamos la dispersión de los valores (y) respecto a la media de los mismos.

Se calcularon los intervalos de confianza con los resultados obtenidos en 16 ensayos reflejándose en la tabla 1

Tabla 1. Determinación de los intervalos de confianza.

Intervalos de confianza	Media (x)	X + 2DS	X - 2DS
Pendiente	1.1514	1.6204	0.6824
Intercepto	-0.0407	0.0799	-0.1613
Control positivo (UE/mL)	0.435	0.517	0.353

Para establecer el rango de trabajo de la curva de calibración, se analizó la exactitud y la precisión de cada punto de la curva en cinco ensayos independientes, obteniéndose en cada caso, que la *t* de student calculada era menor que la tabulada

El límite de detención del ensayo es 0,01 UE/mL.

Se utilizó el método de student para la comparación de dos pendientes el cual indicó que la misma es paralela con la pendiente del ensayo, al ser la *t de student* calculada (-0,3444) menor que la tabulada (2,179), indicando que el ensayo tiene especificidad. También se determinó la especificidad del ensayo por adición de 0,4 UE a muestras de MPA de la producción de la vacuna recombinante de la Hepatitis B. Se determinó el límite de aceptación del ensayo como el 25 % de la concentración real de endotoxina, el cual se obtuvo del punto de la curva de calibración correspondiente a 0,4 UE/mL, después del análisis de regresión lineal. Los valores de endotoxinas estaban dentro del rango 0,2925-0,4875

Se calculó la precisión intra-ensayo o repetibilidad de la técnica para cada tipo de muestra, calculándose el coeficiente de variación de cada muestra y material de referencia en el rango alto, medio y bajo de la curva de calibración, siendo menor que el 10 %. La precisión inter ensayo o reproducibilidad se calculó por tipo de muestra para cada analista, y por tipo de muestra entre los analistas. El coeficiente de variación en ambos casos se calculó por un diseño jerárquico siendo menor que el 20 % en todos los casos

Conclusiones:

- El rango de linealidad del método es de 1,0 a 0,1 UE/mL.
- El método tiene especificidad.
- El CV del ensayo es inferior al 10 %.
- El CV de los analistas es inferior al 20 %.
- El CV entre los analistas es inferior al 20 %.
- Se establecieron los intervalos de confianza del ensayo.
- La técnica cumple con todos los requisitos que exige la validación de los métodos cuantitativos para la determinación del límite de impureza.

Bibliografía

- Fernández, A.; Rosales, I. “Validación de Métodos Analíticos”
- International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. (1996).
- PPO 4.32.081.95; Procedimiento para la Determinación de la concentración de endotoxinas bacterianas empleando la técnica del LAL.
- PPO 4.26.100.93; Protocolo maestro de validación de métodos analíticos.
- Sigarroa A. "Biometría y diseño experimental", 1985.

“Validación del procedimiento para determinar la concentración de los anticuerpos monoclonales anti-Hepatitis B por ELISA, en muestras del proceso de producción”.

Lic. Jorge Rodríguez Durán, Téc. Alberto Nuñez González, Téc Rudka Brito Santana, Téc Ivette López Larraburo, Téc Abrisleida Franco Ramos, Lic. Julio C. Sánchez García, Lic. Amarilis Muñoz García.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Resumen

La producción de anticuerpos monoclonales en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, es controlada en cada una de las etapas productivas por la división de Control de Procesos, utilizándose un ELISA tipo sandwich para cuantificar esta proteína en las diferentes etapas del proceso.

En este ensayo inmunoenzimático, las placas son recubiertas con el antígeno de superficie de la Hepatitis B recombinante (HBsAg). El anticuerpo monoclonal (AcM) contenido en la muestra se une al HBsAg y esta reacción es revelada usando un anticuerpo policlonal (AcPc) en conejo o carnero (anti-IgG de ratón) conjugado con peroxidasa en presencia de su sustrato. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de moléculas de AcMs presente en la muestra.

Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la validación de esta técnica fueron: linealidad, rango de trabajo, exactitud, precisión, especificidad, límite de cuantificación, efecto borde y homogeneidad de adsorción.

El análisis de regresión lineal permitió eliminar el 98% de la dispersión de los valores obtenidos, y el test de student para la comparación de dos regresiones lineales confirmó, en los estudios de especificidad, que los tampones utilizados en la producción así como las proteínas contaminantes presentes en las muestras, no interfieren en la técnica. La exactitud del método se evaluó con el material de referencia de AcM comparando los resultados obtenidos por ELISA con los del Lowry. También se demostró que no existe efecto de borde y que la variabilidad en la homogeneidad de adsorción es inferior al 5 %.

El análisis de varianza de un diseño jerárquico indicó que la técnica tiene una variabilidad inferior al 20% en el intervalo de concentraciones de 25 a 5 ng/ml, siendo 5 el límite de cuantificación de la técnica.

Introducción

En nuestro centro una de las líneas productivas es la de anticuerpos monoclonales los cuales se utilizan en el proceso de purificación del antígeno de superficie de la hepatitis B y determinan la pureza final de la partícula de hepatitis B.

La concentración de los anticuerpos monoclonales anti hepatitis B se utiliza en la preparación de columnas de cromatografía de afinidad y al mismo tiempo el contenido en gramos de estos anticuerpos en la columna cromatográfica define la capacidad de la misma y el rendimiento del proceso de purificación del antígeno de superficie de la hepatitis B.

El método objeto de la validación está clasificado como: Método cuantitativo para la determinación del compuesto activo y preservo como materia prima o en formulaciones farmacéuticas, siendo de categoría I, según USP XXIII, validación de métodos analíticos.

Materiales y Métodos.

Los parámetros a evaluar son: linealidad, rango de trabajo, exactitud, precisión, especificidad, límite de cuantificación, efecto borde y homogeneidad de adsorción.

La linealidad es la proporcionalidad que existe entre la concentración del analito y la absorbancia a una longitud de onda determinada. Para determinar la relación existente entre concentración del analito y la absorbancia a 492 nm, se realizó una curva de calibración del Material de Referencia con las siguientes concentraciones: 25, 20, 15, 10 y 5 ng/mL, realizando como mínimo tres réplicas para cada concentración.

El rango de trabajo del sistema se estableció mediante el análisis de cada uno de los puntos del rango de linealidad de la curva de regresión.

La exactitud expresa la capacidad del método para dar resultados lo más próximo posible al valor considerado verdadero. Refleja el error sistemático. Se realizaron 10 ensayos independientes con el material de referencia. Se compararon los valores obtenidos por ELISA en el rango alto, medio y bajo con el valor correspondiente según el método del Lowry.

La precisión mide la dispersión de los valores analíticos respecto a una media. Refleja el error aleatorio. Expresa la variación de los resultados. Las medidas numéricas de la precisión son la desviación estándar y el coeficiente de variación y está referida a la variabilidad de las mediciones dentro de un conjunto. En este punto se incluyen la repetibilidad y la reproducibilidad. Se estudió el comportamiento de las muestras finales de cada etapa del proceso productivo. También se estudió la variabilidad de estas muestras en tres días diferentes por tres analistas.

El límite de cuantificación (LC), es la menor concentración o cantidad de analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. Se utilizaron los resultados experimentales del estudio de la linealidad.

La especificidad es la habilidad de un método para detectar exclusivamente el analito de interés. Se realizó una comparación de la pendiente de la curva de referencia (tampón del ensayo) con la pendiente de cada curva preparada en las soluciones tampón del proceso. La comparación se realiza calculando el valor de la *t* de student para un 95 % de confianza y los grados de libertad totales de las dos curvas que se comparan.

El efecto borde, es la afectación de la absorbancia en los bordes de la microplaca, debido a condiciones experimentales no óptimas que afectan la homogeneidad de la respuesta. Se prepararon tres concentraciones diferentes del material de referencia en los niveles de concentraciones alta, media y baja y se aplicaron las muestras de forma aleatoria en diferentes posiciones abarcando toda la placa.

La homogeneidad de adsorción es la variabilidad de los valores de absorbancia inferior al 5 %. Se preparó una muestra de concentración conocida (20 ng/mL) del material de referencia. Se aplicó la muestra de forma homogénea, abarcando toda la placa.

Resultados y Discusión

Se probó que existe una relación lineal entre la absorbancia a 492 nm y la concentración del material de referencia para anticuerpos monoclonales CB-HEP-1

Se realizó el ajuste de regresión de los valores de absorbancia con los de concentración mediante el método de los Mínimos Cuadrados Lineales.

Los coeficientes de determinación de cada curva fueron los siguientes:

Curva 1: 0.989495

Curva 2: 0.991052

Curva 3: 0.993582

Se realizó un análisis de varianza con cinco pares de datos de absorbancia y concentración de la curva de calibración para probar la hipótesis nula de que no hay regresión ($\beta=0$). En todos los experimentos se obtuvo un valor de probabilidad asociada al valor de F inferior a 0,01, lo cual indica que no se cumple la hipótesis nula ($\beta=0$) y que ajustando una recta de regresión eliminamos la dispersión de los valores (y) respecto a la media de los mismos.

Se calcularon los intervalos de confianza con los resultados obtenidos en 16 ensayos reflejándose en la tabla 1

Tabla 1. Determinación de los intervalos de confianza.

Intervalos de confianza	Media (x)	X + 2DS	X - 2DS
Pendiente	0.0355	0.0439	0.0271
Intercepto	0.2162	0.2789	0.1536
Control positivo (UE/mL)	3109.31	3946.28	2272.34

Para establecer el rango de trabajo de la curva de calibración, se analizó la exactitud y la precisión de cada punto de la curva en cinco ensayos independientes, obteniéndose en cada caso, que la t de student calculada era menor que la tabulada

El límite de cuantificación del ensayo es 5 ng/mL que se corresponde con menor punto de la curva el cual tiene exactitud y precisión.

Se utilizó el método de student para la comparación de dos pendientes el cual indicó que la misma es paralela con la pendiente del ensayo, al ser la t de student calculada menor que la tabulada, para cada uno de las soluciones tampones, indicando que el ensayo tiene especificidad. Tabla 2

Tabla 2: Estudio de especificidad. Comparación de 2 pendientes.

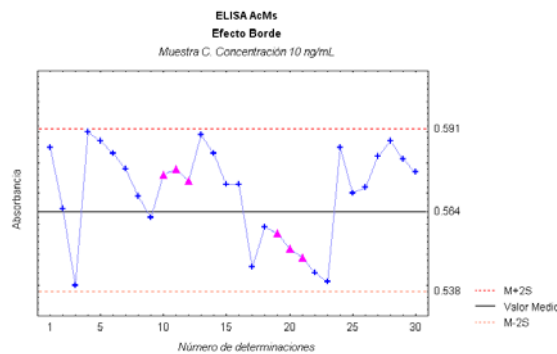
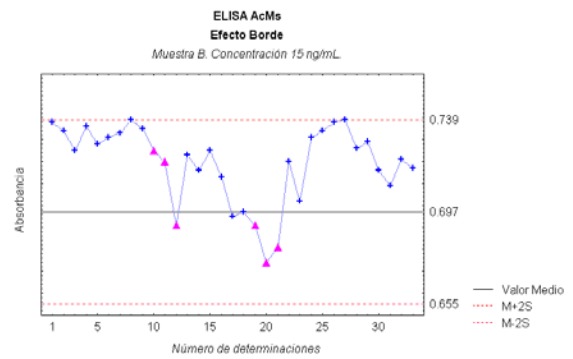
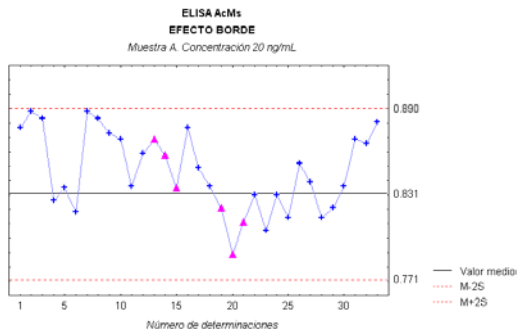
Soluciones	Composición	t exp.	t crítica
PBS 1X	NaCl; KCl; Na ₂ HPO ₄ y KH ₂ PO ₄	0.438	2.179
Tris NaCl	NaCl 150 mM y Tris 20 mM).	1.445	
Sulfato de amonio al 100 % de saturación	NH ₄ SO ₄ ; 767 g/L	0.502	
Sulfato de amonio al 50 % de saturación	NH ₄ SO ₄ ; 313 g/L	1.400	

5. Exactitud

Se probó la exactitud del método comparando los resultados obtenidos por ELISA para el material de referencia, con los que reporta el método del Lowry. La comparación se realizó en el rango alto, medio y bajo de la curva de calibración y, se utilizó la prueba de student para la comparación de medias en muestras pequeñas, siendo esta menor que la tabulada en todos los casos.

Se calculó la precisión intra-ensayo o repetibilidad de la técnica para cada tipo de muestra, calculándose el coeficiente de variación de cada muestra y material de referencia en el rango alto, medio y bajo de la curva de calibración, siendo menor que el 10 %. La precisión inter ensayo o reproducibilidad se calculó por tipo de muestra para cada analista, y por tipo de muestra entre los analistas. El coeficiente de variación en ambos casos se calculó por un diseño jerárquico siendo menor que el 20 % en todos los casos

En los Gráficos 1,2 y 3 se representan cada muestra y se observa que en ninguno de los casos existe efecto borde.



Para determinar si existe homogeneidad de adsorción se realizó un ensayo donde se aplicó una muestra de material de referencia a concentración de 20 ng/mL en toda la placa. Luego se determinó el coeficiente de variabilidad siendo menor de 5 %.

Conclusiones

- El rango de linealidad del método es de 25 a 5 ng/mL.
- El método tiene especificidad: las soluciones tampones no afectan la determinación en el intervalo lineal de concentraciones.
- El método es exacto en todo el rango lineal.
- El CV del ensayo es inferior al 10%.
- El CV de los analistas es inferior al 20% al igual que entre ellos.
- Se determinaron los intervalos de confianza del ensayo.
- La técnica cumple con todos los requisitos que exige la validación de los métodos cuantitativos para la determinación del principio activo.

Referencias:

- Fernández, A.; Rosales, I. "Validación de Métodos Analíticos"
- International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. (1996).
- PPO 4.32.183.99, Edición 02. Procedimiento para determinar la concentración de los anticuerpos monoclonales anti-Hepatitis B por ELISA a las muestras entregadas al Departamento de Control de Procesos.

- *PPO 4.26.100.93, CIGB,1993. Protocolo maestro de validación de métodos analíticos.*
- Antonio Sigarrosa, "Biometría y diseño experimental", 1985.

PREPARACIONES DE ERITROPOYETINA LIBRES DE ALBUMINA

J. CRUZ; D. VILLALTA; Z. GARCÍA; A. VALLÍN; A. PORTILLO; M. A. Las arias; D. Curbelo

Centro de Inmunología Molecular. P.O. Box 16040, Ciudad de la Habana 11600, Cuba.

1. INTRODUCCIÓN.

La Eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoproteica ácida que promueve la diferenciación y proliferación de eritrocitos. La EPO producida mediante la tecnología de ADN recombinante tiene los mismos efectos biológicos que la hormona endógena, y por ello ha tenido tanto éxito su uso en la terapéutica de anemias asociadas a Insuficiencia Renal Crónica, Cáncer, SIDA, entre otras enfermedades. Para obtener preparaciones estables de EPO humana recombinante (EPOhr) se debe evitar la ocurrencia de cambios químicos (hidrólisis, reacciones de intercambio de puentes disulfuro, etc) o cambios físicos (desnaturalización, agregación, adsorción al envase, etc) en la formulación.

En la actualidad, casi toda la EPOhr disponible en el mercado, contiene Albumina de Suero Humano (ASH), que como todo hemoderivado, debe cumplir con rigurosos requisitos para su producción y comercialización ⁽¹⁾. De ahí la gran importancia de sustituirla por otro estabilizante que garantice la adecuada estabilidad física, química y biológica de la proteína, y que al mismo tiempo sea inocuo para el paciente.

La literatura reporta varios estabilizantes que pueden ser utilizados para obtener formulaciones estables de EPOhr, tales como: Gelatina, sales orgánicas e inorgánicas, Manitol, Sorbitol, PEG 4000, algunos tipos de aminoácidos y sustancias superficialmente activas ⁽²⁾. En nuestro laboratorio se ensayaron algunos de ellos, por separado y en mezclas, fundamentalmente seleccionados del grupo de los polioles y los aminoácidos. Este trabajo muestra el efecto de la mezcla de aminoácidos Alanina, Glicina y Acido glutámico, seleccionados como aditivos para la formulación de EPOhr, sobre los perfiles electroforéticos y cromatográficos de la molécula, así como en el comportamiento de su actividad biológica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Las formulaciones se prepararon con la especie básica del tampón fosfato, que en mezcla con los aminoácidos mantiene su capacidad reguladora del pH. Se analizaron muestras de EPOhr a 1 mg/ml y 20 µg/ml con la mezcla de aminoácidos, que fueron incubadas a 60°C durante 8 días o almacenadas a 4°C durante 6 meses, para estudios preliminares de estabilidad acelerados y de vida estante, respectivamente. Las muestras controles corresponden en cada experimento a la misma formulación sin la adición de estabilizantes y con HSA en el caso de actividad biológica. Los métodos de SDS-PAGE y RP-HPLC (SUPELCOSIL LC-308), fueron usados como herramientas analíticas para estudiar el perfil proteico. La actividad biológica *in vitro* fue determinada por el método de Krystal ⁽³⁾ y para la actividad biológica *in vivo* se utilizó el método de ratones policitémicos ⁽⁴⁾.

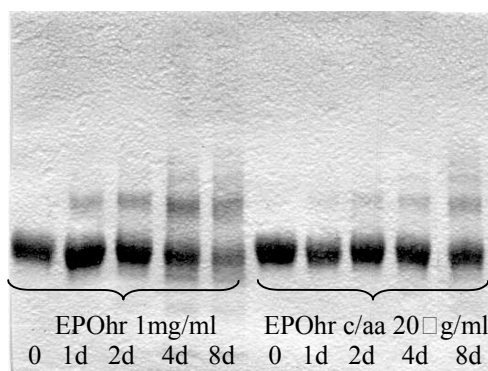
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar la capacidad protectora de la mezcla de aminoácidos en la formulación de EPOhr, se estudiaron los perfiles electroforéticos y cromatográficos, y se analizaron los efectos en la actividad biológica de la molécula.

3.1 Estudio de estabilidad acelerada a 60°C.

3.1.1 Efecto sobre el perfil electroforético.

En ambos casos el fenómeno de desnaturalización que parece ocurrir es la formación de agregados moleculares, ya que aparecen bandas de mayor peso molecular que la correspondiente a la EPOhr. La electroforesis muestra como disminuye gradualmente la intensidad de las bandas electroforéticas correspondientes a la EPOhr a medida que transcurre el tiempo de incubación, lo cual ocurre de



manera mas
 marcada para el
 caso de la
 formulación
 agregados
 control (Fig.
 EPOhr

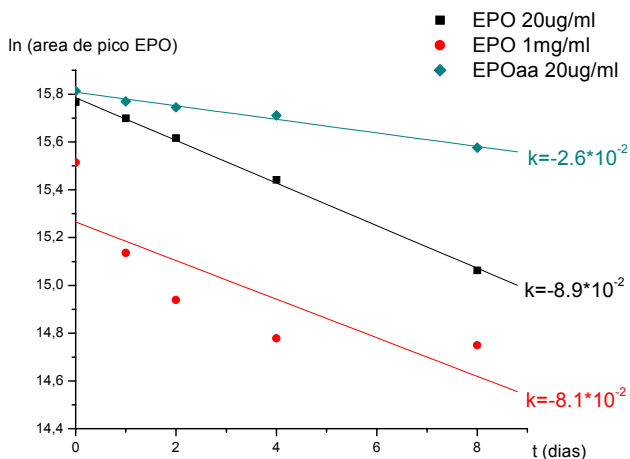


Figura 2: Resultados de HPLC-RP a 60°C durante 8 días.

Figure 1: Efecto de altas temperaturas en los perfiles electroforéticos de EPOhr

Según este resultado el bandeo electroforético sufre menos variación, a medida que transcurre el tiempo de incubación, para la formulación que contiene la mezcla de aminoácidos, lo cual demuestra la protección de la molécula de EPOhr.

3.1.2 Efectos en los perfiles cromatográficos.

Se analizaron los perfiles cromatográficos de HPLC-RP y en todos los casos se observó una disminución del área del pico correspondiente a la EPOhr, a medida que transcurre el tiempo de incubación (Fig.2). Este efecto es mas notorio para el caso de las formulaciones controles cuyas constantes de degradación (k) son mayores (mas de 3x) que la correspondiente a la formulación con aminoácidos, lo cual sustenta que esta última protege a la molécula de la desnaturalización producto de las altas temperaturas.

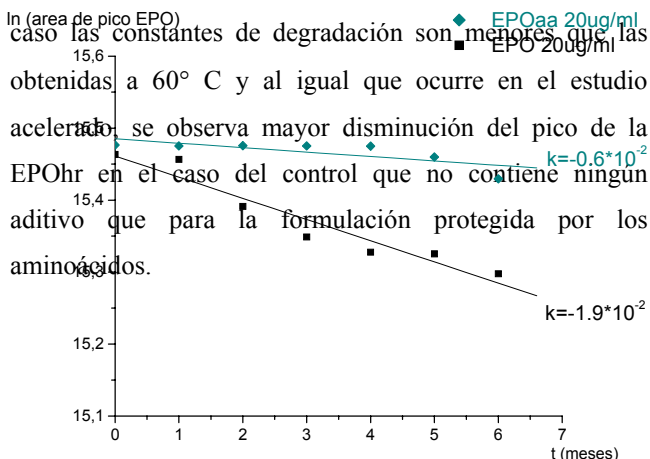
3.1.3 Comportamiento de la actividad biológica.

Este ensayo se realizó con las muestras correspondientes a los tiempos cero y 8 días de incubación. La actividad biológica a los 8 días de incubación había disminuido hasta un 22 % del valor inicial para la formulación con aminoácidos y hasta un 10 % del valor inicial para el caso de la formulación con HSA, utilizada como control. Este resultado muestra una vez mas la potencialidad de la mezcla de aminoácidos para sustituir a la HSA manteniendo la calidad del producto final.

3.2 Estudio preliminar de estabilidad anaquel a 4°C durante 6 meses.

3.2.1 Efecto sobre el perfil cromatográfico.

Como se observa en la figura 3 el área del pico en HPLC-RP de la EPOhr decrece a medida que transcurre el tiempo, cuando las muestras son almacenadas a 4°C, pero en este caso las constantes de degradación son menores que las obtenidas a 60° C y al igual que ocurre en el estudio acelerado se observa mayor disminución del pico de la EPOhr en el caso del control que no contiene ningún aditivo que para la formulación protegida por los aminoácidos.



En este trabajo se ha demostrado que la mezcla de aminoácidos propuesta para sustituir la ASH de la formulación actual de EPOhr, protege a la molécula de la desnaturalización producto de agregación molecular, comparada con los controles propuestos en las condiciones evaluadas.

Ademas se mantiene la actividad biológica de la proteína en valores similares a los obtenidos con la formulación actual.

Estos resultados permitirán en un futuro cercano sustituir la

Figure 3: Muestras de EPOhr con aminoácidos y sin ningaASH de las formulaciones de EPOhr, como recomiendan las aditivo almacenadas a 4°C durante 6 meses. Se muestraaagencias reguladoras.

logaritmo del área del pico obtenido por HPLC-RP a cada tiempo de almacenamiento.

3.2.2 Comportamiento de la actividad biológica.

Mediante el ensayo de actividad biológica *in vitro* se analizaron las muestras de las formulaciones de EPOhr con ASH y con aminoácidos, y se calcularon las constantes de degradación basándonos en las medidas de conteo celular obtenidas para cada muestra (Figure 5). Considerando la variabilidad del ensayo se puede concluir que la formulación con aminoácidos mantiene patrones de degradación similares a los de la formulación con ASH.

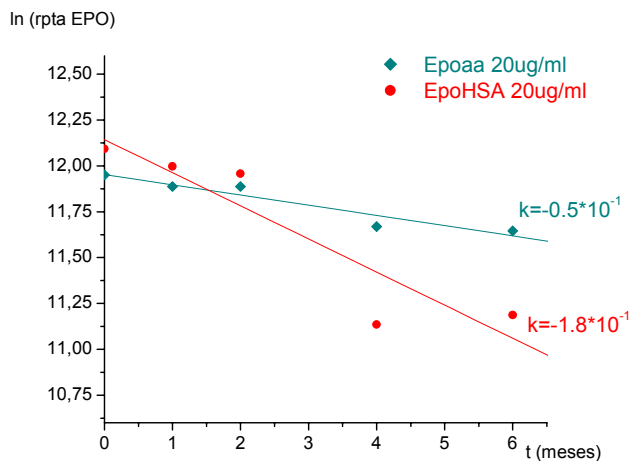


Figura 4: Resultados del ensayo de actividad biológica *in vitro* para las formulaciones de EPOhr con ASH y con aminoácidos almacenadas a 4°C durante 6 meses .

4. CONCLUSIONES

5. REFERENCIAS

1. Cantell, K. and Hirvonen, S. (1991). Preparation of human leukocyte interferon for clinical use. Tex. Rep. Biol. Med. 35: 138-144.
2. US4992419 Stabilized erythropoietin preparations, 1988.
3. Kystal, G. A simple microassay for Erythropoietin based on 3H-Thymidine incorporation into spleen cells from phenyl hydrazine-treated mice. Journal of Experimental Haematology; 1983; 11:649-660.
4. Cotes, P.M.; Bangham D.R. Bioassay of Erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at a reduced pressure. Nature; 1961; 192:1065-1067.

“Optimización de la fermentación en fermentadores de fibra hueca, para la producción de biofármacos.”

Autores: Lourdes Bouzó López, Miguel A. Arias, Jania Suárez, Eduardo Ojito, Evelio Rodríguez, Alberto Alvarez, Mitchel Hernández, Ernesto Tulaín Naranjo.

Resumen:

Los biorreactores de fibra hueca garantizan un nivel de escalado intermedio de las células superiores, para obtener y producir nuevos biofármacos destinados al tratamiento de diversas enfermedades y lograr su introducción en los sistemas de salud.

Entre los diez productos más vendidos a escala mundial, la Eritropoyetina humana recombinante ocupa el segundo lugar. En la actualidad en nuestro país existe un elevado número de pacientes que padecen de insuficiencia renal crónica, que constituye el principal campo de aplicación de este medicamento.

Con el desarrollo del proceso productivo de la Eritropoyetina surge una nueva esperanza para mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Este trabajo versa la evaluación de dos parámetros de procesos para mejorar la productividad volumétrica de los fermentadores de fibra hueca. Se observó que una elevada talla de inóculo, unido a la introducción de la recirculación de medio extracapilar, logró incrementar al doble la producción de la molécula de Eritropoyetina.

Introducción.

Con el empleo de modernos sistemas de fermentación con tecnología de fibra hueca para el cultivo de células superiores se logra establecer la producción de biomoléculas que abarcan desde anticuerpos monoclonales hasta proteínas recombinantes.

El uso de estos novedosos sistemas tiene como limitante la imposibilidad de realizar un monitoreo directo para conocer la cantidad de biomasa que se genera en el interior del biorreactor, razón por la cual el control del proceso, la optimización y la predicción durante el tiempo de corrida de cada fermentador ha sido poco estudiada en contraposición con otros sistemas de cultivo como tanques agitados en diferentes modos de operación, cultivos en frascos agitados (spinners) e incluso botellas rollers, este último empleado tradicionalmente para la obtención de la Eritropoyetina humana recombinante (rhu EPO).

Con el desarrollo en el CIM del proceso productivo de rhuEPO en biorreactores de fibra hueca surge una nueva esperanza de mejorar la calidad de vida de los pacientes que sufren insuficiencia renal crónica. El objetivo que persigue este trabajo es la búsqueda de una nueva estrategia de fermentación que permita incrementar la producción de la molécula de interés.

Materiales y Métodos.

Medio de cultivo: *Espacio Intracapilar:* DMEN/F-12 suplementado con Glutamina (0.51 g/l), piruvato de sodio (0.11g/l) bicarbonato de sodio (3.18 g/l), 2- Mercaptoetanol (0.01ml/l).

Espacio Extracapilar: DMEN/F-12 suplementado con 5% de suero fetal bovino.

Línea celular: CHO manipulada genéticamente para la producción de la Eritropoyetina humana recombinante.

Inóculo celular: Confeccionado a partir del cultivo en botellas rollers a 0.5×10^9 células por cartucho con una viabilidad mayor de 90%.

Sistema de fermentación: Biorreactores de fibra hueca ACUSYST-X Cell de la firma Bioscienses.

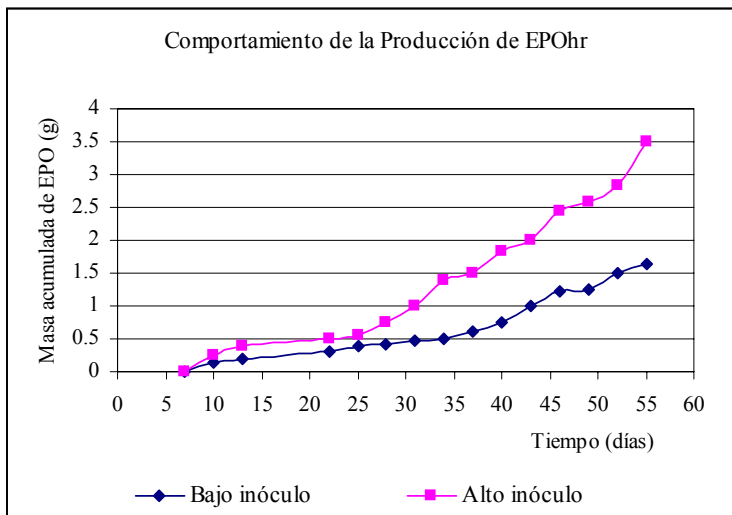
Resultados y discusión.

Impacto de la concentración inicial de células sobre la producción de EPO-hr.

Estrategias	Número de células Inoculadas. (Células Totales)	Comienzo de la fase productiva. (días)
Inóculo Bajo.	600x10	37
Inóculo alto.	4000x10	20

Tabla #1 Densidad de inóculo inicial.

Como se observa en la Tabla #1 el empleo de una alta talla de inóculo provoca que se acorte el tiempo de comienzo de la fase productiva sea a 20 días del inicio de la corrida, por el contrario se alarga a 37 días cuando empleamos una baja talla de inóculo.

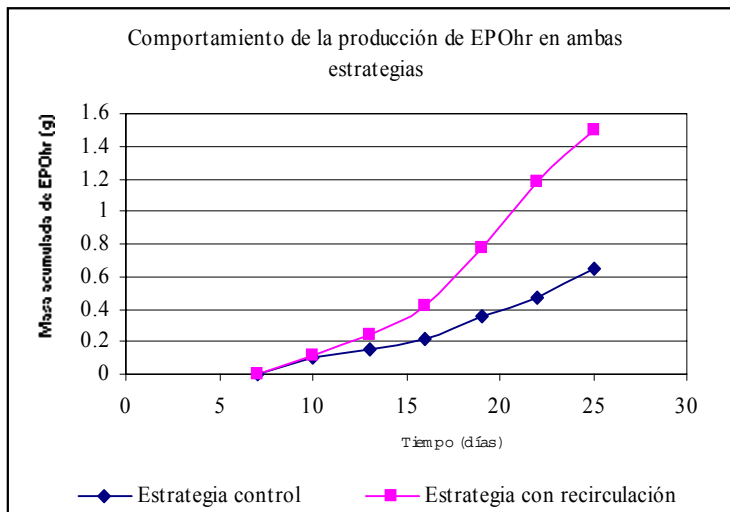


En la figura 1 se muestra que el incremento de las densidades de siembra de 600 a 4000 millones de células provocó un aumento en la masa de EPO-hr acumulada en 2.14 veces, y junto a esto origino un desplazamiento en el tiempo del perfil de las velocidades de consumo de glucosa y producción de lactato

Fig. 1 Comportamiento de la masa de EPO empleando dos tallas de inóculo diferentes.

Recirculación de medio extracapilar.

Para mantener las cantidades adecuadas de factores de crecimiento dentro del espacio extracapilar, se emplea un sistema de ciclaje que garantiza un patrón de mezclado axial del medio de cultivo. A esto en nuestra variante experimental se añade un sistema de *Recirculación* para incrementar los factores estimuladores del crecimiento y garantizar un mezclado radial, esta combinación logró incrementar en un 35% la cantidad de producto que se obtiene por litro de medio suministrado al fermentador.



En la figura 2 se puede apreciar que la masa acumulada cuando se implementa la estrategia con recirculación fue 2.30 veces superior a la estrategia control donde el fermentador solo trabajó con el sistema de ciclaje.

Fig.2 Masa acumulada de EPO en ambas estrategias.

Referencias bibliográficas.

Büntemayer H., Wallerius C.Y Lehman J. (1992) Optimal medium use for continuous high density perfusion processes. *Cytotechnology* 9, 59-67.

Konstantinov K.B. (1996) Monitoring and control of the physiological state of cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 271-289.

Nueva Estrategia de Fermentación para la producción del Anticuerpo Monoclonal Humanizado R3h.

Autores: Mey- Len Chea, Gryssell Rodríguez, Ivonne Alvarez, Javier Santos, Samuel Piedras, Reinaldo Cuervo, Lourdes Bouzó y Cinán Díaz.

Institución: Centro de Inmunología Molecular.

Resumen:

El anticuerpo monoclonal humanizado R3h obtenido en el Centro de Inmunología Molecular ha encontrado una elevada aplicación en el tratamiento de pacientes aquejados de tumores malignos, por su elevada especificidad en el reconocimiento de células tumorales. Este anticuerpo es capaz de reconocer el receptor de factor de crecimiento epidérmico, que se sobreexpresa en tumores de origen epitelial como el cáncer de cabeza y cuello, pulmón, tracto digestivo, mamas y otros.

El tratamiento con este anticuerpo requiere altas dosis para su ejecución, esto implica la necesidad de búsqueda de tecnologías más eficientes que conduzcan a un aumento significativo de los niveles productivos así como un mejoramiento en las estrategias de producción.

El presente trabajo aborda la comparación de dos estrategias de fermentación diferentes en la tecnología de fibra hueca, con vistas a lograr la optimización del proceso productivo.

Introducción:

El anticuerpo Monoclonal humanizado R3h obtenido en el Centro de Inmunología Molecular tiene una elevada aplicación en el tratamiento de pacientes aquejados de tumores malignos, por su elevada especificidad en el reconocimiento de las células tumorales. Este anticuerpo reconoce el receptor del factor de crecimiento epidérmico, que se sobreexpresa en tumores de origen epitelial como el cáncer de cabeza y cuello, pulmón, tracto digestivo y mamas entre otros. El tratamiento con este anticuerpo requiere de altas dosis, esto implica la necesidad de búsquedas de estrategias de fermentación más eficientes. Es por ello que nos proponemos evaluar dos estrategias diferentes de fermentación, que permitan acortar el tiempo al cual se inicia la acumulación de IgG en el biorreactor de Fibra Hueca y disponer del anticuerpo monoclonal (h-R3) a partir del primer mes de operación del biorreactor para iniciar el proceso de purificación así como disminuir el costo de producción del proceso de fermentación.

Materiales y Métodos

Línea celular: R3h/T16 productora de anticuerpo monoclonal humanizado R3h.

Equipamiento: Biorreactor de fibra hueca Acusyst-Junior.

Medios de fermentación:

**Espacio Intracapilar: DMEN-F-12 + bicarbonato de sodio + L-Glutamina + Piruvato de Sodio + 2-Mercaptoetanol.*

**Espacio Intracapilar : DMEN-F-12 + 5 % de SFB.*

Determinación de Metabolitos:

Las concentraciones de los principales metabolitos (glucosa, lactato y amonio) monitoreados durante la operación de los biorreactores se realizó empleando un equipo denominado Biolyzer (Ortho Clinical Diagnostics. Johnson-Johnson). Su principio de funcionamiento se basa en técnicas colorimétricas.

Determinación de la concentración de anticuerpos:

La determinación de la concentración de anticuerpos se determinó por ELISA. Técnica cuyo principio se sustenta en la reacción antígeno-anticuerpo.

Resultados y Discusión

Comparación entre la nueva estrategia de fermentación evaluada y la anteriormente empleada.

La siguiente tabla muestra los parámetros sobre los que se realizaron cambios en la nueva estrategia de fermentación a aplicar.

	<i>Estrategia 1</i>	<i>Estrategia 2</i>
1. Flujo de alimentación al Espacio extracapilar	El flujo de medio extracapilar se incrementa paulatinamente a medida que aumenta población celular dentro del cartucho.	Se comienza con un flujo alto de medio extracapilar y disminuye con el incremento de la población celular en el interior del cartucho.
2. Remoción celular en la cámara extracapilar.	Solo cuando la cámara extracapilar esté completamente ocupada de células.	Cada vez que se realiza una cosecha.
3. Flujo bomba de cosecha	Flujo bomba de cosecha 0- 13 mL/h	Flujo bomba de cosecha 0- 7 mL/h

Nota: Los flujos de alimentación al espacio intracapilar para ambas estrategias son similares (mantener conc. Glu + 2 g/L).

La estrategia 1 se corresponde con la establecida inicialmente en el proceso productivo y la 2 con la nueva estrategia aplicada.

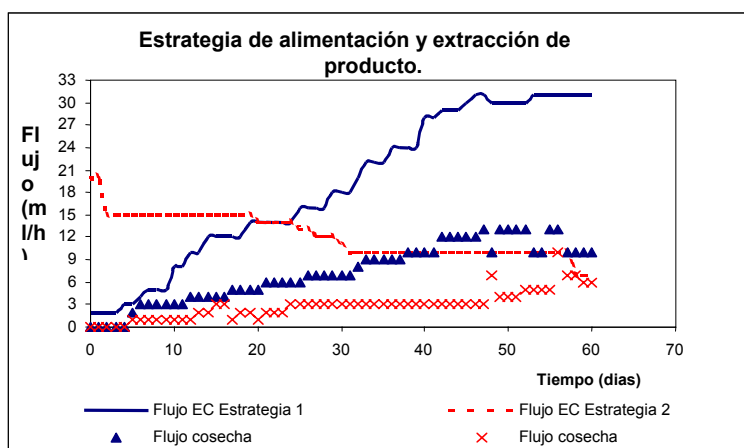


Fig. 1. Estrategia de alimentación de medio EC y extracción de producto final.

En la Fig. 1 se muestran los patrones de flujo utilizados en la estrategia de fermentación 2 comparados a los seguidos en la estrategia 1. Con la aplicación de la segunda estrategia de fermentación, hay menor consumo de medio extracapilar (15 L), lo que disminuye los costos de producción pues el Suero Fetal Bovino es elemento más costoso del medio de cultivo empleado.

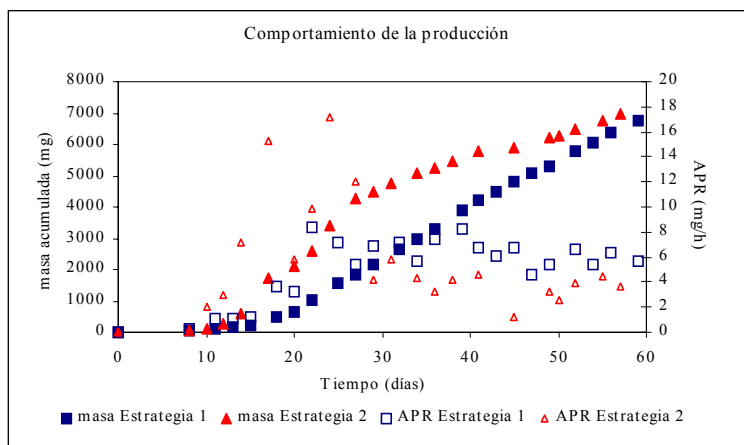


Fig. 2 Comportamiento de la Producción del AcM R3h

La Fig. 2 muestra el comportamiento de la producción de la molécula de interés en las dos estrategias de fermentación sometidas a estudio. En la estrategia de fermentación 2 se acumula mayor cantidad de producto (4,5 gramos) en el primer mes de operación, además se obtiene un producto más concentrado (hasta 1,5 g/L), lo que favorece el proceso de purificación, pues se acorta el tiempo de aplicación de esta proteína a la columna cromatográfica.

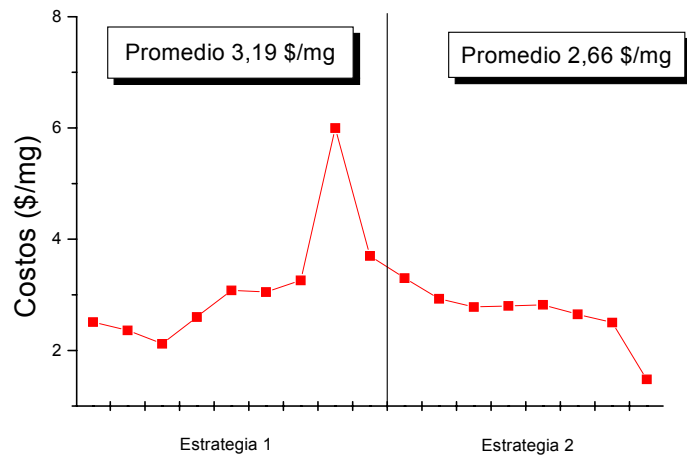


Fig. 3 Análisis de costo de producción de las dos estrategias de fermentación

Del análisis de costos mostrado en la Fig. 3 se observa que con la estrategia de fermentación 2 se logra disminuir significativamente el costo de producción (1,6 veces) y se eliminan las fluctuaciones en el costo productivo, que desde el punto de vista ingenieril es perjudicial para cualquier proceso.

Por todo expuesto se puede plantear que la estrategia de fermentación 2 es mejor que la estrategia de fermentación 1 a pesar de que en ambas se obtiene igual cantidad de producto.

Referencias bibliográficas

1. Michael J. Gramer, Douglas M. Poeschl, Mark J. Conroy, Bruce E. Hammer. Effect of Harvesting Protocol on Performance of a Hollow Fiber Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 65, No 3, November 5, 1999.
2. Michael J. Gramer, Tracey L. Britton. Antibody Production by a Hybridoma Cell Line at High Cell Density Is Limited by Two Independent Mechanisms. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 79, No 3, August 5,

S7 en combinaciones antifúngicas in vitro

Y. Iznaga, M. Lemus, M. E. Pérez, I. González, L. González, L. Garmendía, L. Nadal y C. Vallín

Departamento de Biotecnología, Centro de Química Farmacéutica, PO Box 6990, Cubanacán, Habana. Cuba. E-mail: vallin@biocnic.cneuro.edu.cu

RESUMEN

En los últimos años ha aumentado considerablemente el número de hongos que se presentan como agentes causales de enfermedades. Esto ha sido debido principalmente al incremento en la población de pacientes con deficiencias en su sistema inmune. A diferencia del amplio rango de antibióticos disponibles para el tratamiento de infecciones bacterianas muy pocos son los antibióticos antifúngicos disponibles para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. Entre las nuevas alternativas de tratamiento se presenta el empleo de combinaciones de drogas que permitan lograr un efecto sinérgico. El producto de fermentación de una cepa de actinomiceto aislada de suelos cubanos ha mostrado interés no solo por su excelente actividad frente a levaduras de importancia clínica sino por la posibilidad de poder emplearlo en una combinación antifúngica a juzgar por los resultados obtenidos en los ensayos de sinergismo realizados.

INTRODUCCION

Los hongos son responsables de muchas de las enfermedades que se presentan en los animales y en el hombre. Las infecciones fúngicas han aumentado al aparecer nuevos grupos poblacionales inmunocomprometidos siendo los pacientes con SIDA el grupo de más riesgo de contraer infecciones micóticas oportunistas. El número de antibióticos que se emplean en la actualidad para tratarlas es limitado por lo que se han usado indiscriminadamente. Por esta razón ha tenido lugar una merma en la capacidad de respuesta a la terapia lo que ha conllevado a la necesidad de desarrollar líneas de trabajo en la búsqueda de nuevos compuestos ¹. Los agentes encontrados incluyen proteínas antifúngicas y combinaciones de compuestos nuevos y ya existentes ². La investigación para el desarrollo de antimicóticos nunca ha sido más intensa y en esta ardua búsqueda la Biotecnología ocupará siempre una posición clave. Si además se hiciera la pregunta sobre cuál grupo de microorganismos han sido los más útiles en la medicina sin duda la respuesta sería: “los actinomicetos” ³.

MATERIALES Y METODOS

Realización de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en discos: La preparación de los inóculos fúngicos de levaduras, hongos filamentosos y bacterias se realizó según la metodología descrita en los documentos NCCLS ⁴⁻⁶. En el caso de las levaduras se realizó una dilución 1/2000 en el medio agar Sabouraud dextrosa y de 1/100 en los hongos filamentosos. Discos de papel de filtro estériles fueron colocados sobre la superficie del medio agarizado solidificado los cuales fueron impregnados con 20 µL del producto de fermentación S7. Después de incubar se realizó la lectura de las zonas de inhibición del crecimiento microbiano.

Ensayos de identificación parcial: Termoestabilidad a pH ácido para identificar posibles aminoglucósidos, estreptotricinas o antraciclinas ⁷. Ensayo para detectar presencia de posibles macrólidos poliénicos antifúngicos ⁸.

Determinación del espectro uv-visible: Se le determinó el espectro UV-visible desde 200-600 nm a S7 y a la anfotericina B, que es un macrólido poliénico reconocido y obtenido por vía natural.

Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria (CMI) aparente de S7 frente a agentes causales de infecciones oportunistas. Comparación con los antifúngicos convencionales: Se realizaron ensayos de

microdilución en caldo ⁴. Fueron ensayados los antifúngicos convencionales fluconazol (F) y anfotericina B (AB) y el producto S7 liofilizado.

Ensayos de sinergismo: AB y S7 fueron ensayados para determinar la posibilidad de sinergismo por el método de microdilución en caldo empleando la técnica de tablero de ajedrez. El medio empleado fue el caldo Sabouraud Dextrosa ⁹. Se calculó la sumatoria de concentraciones fraccionales inhibitorias (\sum CFI) para cada combinación de concentraciones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Realización de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana: Los resultados obtenidos al enfrentar el producto de fermentación S7 a un amplio y diverso grupo microbiano evidencian la importante acción inhibitoria que el mismo ejerce frente a las levaduras ensayadas especialmente frente a *Candida krusei* y *Cryptococcus neoformans*.

Ensayos de identificación parcial: El ensayo de termoestabilidad a pH ácido fue negativo como también lo fue el ensayo microbiológico para detectar posibles macrólidos poliénicos.

Determinación del espectro uv-visible: Se realizó con el objetivo de corroborar si en el producto S7 se encuentran miembros de la familia de los macrólidos poliénicos conociendo que estos compuestos muestran tres máximos de absorción característicos que los distinguen de otras familias ¹⁰. El espectro típico de un macrólido poliénico se obtuvo con AB pero no con la muestra de ensayo. De esta forma pudo apreciarse correspondencia con los resultados obtenidos en el ensayo microbiológico. Que en el producto de fermentación estudiado no se encuentren macrólidos poliénicos es ventajoso pues es conocida la toxicidad que presentan en las células de mamíferos en especial los heptaenos como la anfotericina B.

Determinación de la CMI aparente de S7 frente a agentes causales de infecciones oportunistas. Comparación con los antifúngicos convencionales: F es un agente antifúngico triazol muy empleado pero su acción es fungistática y se han presentado fenómenos de resistencia ¹¹. AB es un macrólido poliénico que constituye un agente antifúngico de elección, a pesar de su toxicidad, por su excelente acción fungicida. La resistencia a AB ha asumido importancia clínica particularmente con ciertas especies tales como *Candida lusitanae* ¹².

Los valores de CMI aparente de S7 obtenidos frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* fueron muy altos. La actividad frente a los aislados clínicos de *C. lusitanae* y *C. glabrata* pudiera considerarse elevada pero de especial interés fue el efecto observado frente a *C. krusei* y *C. neoformans* a juzgar por los bajos valores de CMI obtenidos. Los elevados valores de CMI de F en todas las cepas de levaduras evidencian la necesidad de encontrar nuevas moléculas antifúngicas como alternativas de tratamiento para las infecciones micóticas en pacientes inmunocomprometidos. De especial interés lo constituyen aquellas en las que el agente causal es una especie que presenta sensibilidad disminuida al fluconazol como es el caso de *C. krusei*. Se pudo apreciar además que los valores de CMI de AB frente a *C. krusei* fueron superiores a otros obtenidos.

Ensayos de sinergismo: El uso de combinaciones de agentes antimicrobianos o agentes usados simultáneamente es una práctica clínica común particularmente en el tratamiento de enfermedades graves o en caso de pacientes inmunocomprometidos. El fenómeno de sinergismo a menudo permite la reducción de las dosis efectivas de agentes quimioterapéuticos. Esta posibilidad sería especialmente notable en la quimioterapia de infecciones fúngicas sistémicas debido a la toxicidad de los antifúngicos que se emplean ⁹. Especialistas han planteado que la mejor vía para evitar el desarrollo de resistencia a los agentes antifúngicos debe ser tratar a los individuos

infectados con combinaciones de drogas administrando simultáneamente dos o más drogas cada una de las cuales presente un mecanismo de acción diferente ¹³.

Se ensayaron combinaciones de concentraciones de S7 y AB frente a *C. krusei* porque no conocemos la posible naturaleza química del metabolito antifúngico en S7 y tampoco su posible mecanismo de acción y porque en el caso de *C. krusei* sería especialmente importante disminuir la dosis de AB a usar por ser la droga de elección y ser muy tóxica. Los resultados del ensayo demuestran que existe una acción sinérgica entre S7 y AB y la combinación de mayor efecto sinérgico fue AB (0.125 µg/mL) + S7 (0.25 µg/mL) por el más bajo valor obtenido de Σ CFI (0.12) observándose en ambos productos la reducción de las concentraciones a 1/16 CMI. En otras combinaciones el efecto obtenido fue de sinergismo parcial y en ningún caso se obtuvo efecto antagónico por lo que son evidentes las posibilidades de S7 en la terapia combinada frente a *C. krusei*.

Existen tres mecanismos básicos que se han aceptado generalmente para explicar la actividad sinérgica: el incremento, por un agente, de la permeabilidad de la pared y membrana celulares al segundo agente; la inhibición de las enzimas capaces de degradar al segundo agente y el doble bloqueo por los dos compuestos de pasos sucesivos en la secuencia metabólica ⁹. El último mecanismo propuesto parece improbable pues la anfotericina B ejerce su efecto por enlace directo a los esteroides de la membrana celular fúngica. El segundo mecanismo tampoco parece probable pues no se conoce que la anfotericina B inhiba alguna enzima degradatoria además de no ser ella inhibida enzimáticamente. Pudiera pensarse entonces en el primer mecanismo. Se ha reportado que la síntesis de quitina es afectada por macrólidos poliénicos y se conoce que la quitina sintasa se encuentra localizada en la membrana citoplasmática ¹³. Pudiera pensarse, por tanto, que los compuestos que actúen inhibiendo la síntesis de quitina podrían actuar sinérgicamente con los polienos y este podría ser un posible mecanismo de acción para S7. Ha sido reportado además que existe un sistema de transporte de péptidos al interior de la célula fúngica y que las péptido permeasas se encuentran localizadas en la membrana citoplasmática por lo que pudieran esperarse alteraciones en su actividad al verse dañada la integridad de la misma por la acción de los polienos. Por esta razón no parece probable que S7 presente naturaleza peptídica.

CONCLUSIONES

S7 mostró una marcada efectividad *in vitro* frente a aislados clínicos de levaduras y actuó sinérgicamente con AB en especial al reducirse las concentraciones de ambos ¹/₁₆ veces el valor de CMI frente a *C. krusei*.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Sanglard D. Y col. Drug Resistance Updates, 1, 293, 1998.
- 2- Wise, R. British Medical Journal, 317, 643, 1998.
- 3- Hodgson, J. Biotechnology, 10, 973, 1992.
- 4- NCCLS document M27-A, 1996.
- 5- NCCLS document M38-A, 2000.
- 6- NCCLS document M2-A7, 2000.
- 7- González I., Nieblas A. y Lemus M. Advances in Modern Biotechnology, 3, 3, 1995.
- 8- Etienne G., Armaw E. y Tiraby G. The journal of antibiotics, XLIII (2), 15, 1990.
- 9- Milewiski S. Journal of General Microbiology, 137, 2155, 1991.
- 10- Bérdy J. CRC. Handbook of Antibiotic Compounds, 2, 165, 1980.
- 11- Vanden Bosshe H. Y col. Medical Mycology, 36, 113, 1998.
- 12- Alexander, B. D. y Perfect, J. R. Drugs, 54, 657, 1997.

13- White T. ASM News, 63, 427, 1997.

Comparación de Interferones comerciales mediante un estudio de estabilidad acelerada.

Autores: Niurmys Martínez González, Maribel Vega Simón, Lourdes Beatriz Costa Anguiano, Susset Valderrama Concepción, Ladys Duany Zamara.

Institución: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Avenida 31 e/ 158 y 190, P.O. Box 6162, CP 10600 Habana, Cuba. Email: niurmys.martinez@cigb.edu.cu

Resumen

Se llevó a cabo un estudio de estabilidad acelerada a partir de dos formulaciones comerciales de Interferón α 2b humano recombinante en forma líquida (IFNrec.) que no contienen albúmina. De los interferones estudiados, el Heberon alfa (Cuba), resultó expresar mayor inhibición viral cuando se expusieron a temperaturas de 59 y 70°C. Este Interferón también presentó mejor reconocimiento por los anticuerpos utilizados en el ensayo ELISA. La integridad molecular reflejó ser diferente en ambos Interferones, pero en el Interferón cubano apareció menor número de picos de producto degradado.

La predicción realizada para temperaturas de almacenamiento de 4 y 25°C, utilizando la metodología propuesta por Kirkwood y colaboradores¹ para productos biológicos, arrojó los mejores resultados para el Interferón Cubano. Esto establece una ventaja comercial para nuestro producto en el mercado.

Introducción

El interferón alfa 2b humano recombinante es una proteína cuyo efecto antiviral, antiproliferativo, e inmunomodulador ha potencializado su amplia utilización en la clínica. Su eficacia ha sido demostrada en el tratamiento de múltiples enfermedades entre las que se encuentran; el virus del papiloma humano, Hepatitis viral. Herpes zoster, SIDA, Dengue y algunas neoplasias malignas. Debido a la importancia que revierte el uso de esta proteína en la terapéutica y al aumento día a día de las exigencias regulatorias en el campo biofarmacéutico, nos dimos a la tarea de estudiar de forma acelerada la estabilidad de dos formulaciones líquidas de Interferón; el Heberon alfa (Cuba), y el Intron A (Belgica), uno de los de más amplio mercado en todo el mundo.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar de una forma rápida el comportamiento de estas formulaciones cuando son sometidas a elevadas temperaturas. Este tipo de análisis, aunque es conocido que no es concluyente de la estabilidad del producto², permitió predecir la estabilidad a la temperatura de almacenamiento.

Materiales y Métodos

Muestras Estudiadas

A= Intron A: Schering-Plough Labo NV, Belgium.

B= Heberón alfa: Cuba.

Técnicas analíticas utilizadas en el estudio

1. ELISA para la cuantificación de Interferón α 2b humano recombinante:

Este procedimiento permite determinar la concentración del alfa Interferón (α -IFN) de forma específica a través de un ELISA tipo "Sandwich". Este ensayo inmunoenzimático utiliza anticuerpos monoclonales donde cada uno reconoce a la molécula por sitios diferentes³.

2. *RP-HPLC*

Se realizaron las corridas cromatográficas utilizando una Columna C8 Baker (4.6 x 100 mm 5 um) con una velocidad de flujo de 0.8 ml/min. La solución de gradiente consistió en el paso de 15 a 60 % de la solución B en 40 min^{4,5}.

Las soluciones utilizadas fueron: Solución A: 0.1 % TFA en agua y Solución B: 0.05 % TFA en acetonitrilo.

La corrida se llevó a cabo a una temperatura de 34 °C, y se aplicaron 40 ug de proteína de cada muestra, en cada corrida.

3. *Actividad Biológica. Inhibición viral*

Este método se basa en la capacidad del Interferón para inhibir el efecto de los virus sobre las células. Las células a las que se le añade Interferón se tiñen con cristal violeta y solo se colorean las que están vivas. Luego se determina la absorbancia de cada uno de los pocillos de la placa. Cuanto mayor sea la actividad biológica del interferón mayor es la absorbancia⁶.

Metodología de estudio y procedimiento de análisis

Para el análisis las muestras se expusieron a temperaturas controladas de 70, 60, 45, 37 y 28 ± 2 °C. Cada muestra calentada se montó en el ELISA junto con otra muestra, de la misma formulación, pero que había permanecido almacenada a 4°C. Esta muestra fue tomada como referencia y contra ella se calculó la concentración remanente. Por otra parte en algunos tiempos de muestreo se realizó una cromatografía en fase reversa con el objetivo de verificar el estado real que presentaba la molécula. La actividad biológica remanente fue medida al igual que la cromatografía, solo en algunos intervalos de tiempo, y también fue determinada relativa a las muestras de 4 °C, como en el ensayo ELISA.

La concentraciones y actividades remanentes se obtienen procesando las absorbancias en el programa ParlinV4.2 mediante un análisis de líneas paralelas. Posteriormente con el uso del programa de computación (DEGTEST, NIBSC, Inglaterra) fueron procesados los resultados de concentración remanente y se obtuvo la predicción para las temperaturas de 4 y 25°C. Los cromatogramas fueron analizados teniendo en cuenta principalmente el área del pico correspondiente a la molécula de alfa Interferón, y otros picos que se consideraron productos de degradación o modificaciones, ya sea del principio activo o de alguno de los excipientes utilizados en la formulación. Se usó como referencia también en este caso el cromatograma obtenido para las muestras de 4°C corrido bajo las mismas condiciones.

Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados de concentración remanente obtenida por ELISA a las diferentes temperaturas de estudio.

Tabla 1: Concentración remanente obtenida en el tiempo.

Temperatura	Concentración remanente obtenida relativa a 4 °C											% de pérdida anual	
	28°C		37 °C			45 °C			59 °C	70°C			
Tiempo	9d	16d	3d	7d	10d	4d	6d	11d	1d	1d	4 °C	25 °C	
A=Intrón	1.883	1.520	0.704	1.122	0.619	0.766	0.594	1.508	IP	IP	100.00	100.00	
B= Interferón	0.939	1.296	0.945	1.092	0.924	0.769	0.866	0.433	0.014	IP	21.66	87.83	

IP: imposible predecir.

Cuando la formulación A= Intrón es sometida por 1 día a temperaturas de 60 y 70 °C la molécula de interferón se degrada completamente, es imposible cuantificarlo mediante el ELISA. Por su parte la formulación B= Heberon alfa, muestra una mayor resistencia al calentamiento, lográndose cuantificar pequeñas cantidades de proteína cuando es calentada a 60 °C. En

el resto de las temperaturas utilizadas para el estudio se observa de manera general una tendencia de la formulación B, a conservar más sus sitios activos. Analizando estos resultados según el procedimiento propuesto por Kirwood⁷ y colaboradores se obtuvo que la formulación A= Intrón, se comporta menos estable que la formulación B= Heberon. Para el Intrón se predice una pérdida anual de 100 % a 4 °C, mientras para el Heberon alfa solo se predice un 21.66 % de pérdida al año almacenado a 4 °C.

Algunas de estas muestras calentadas fueron analizadas mediante el ensayo de actividad biológica, con el objetivo de determinar si estos productos eran capaces de conservar su actividad antiviral aún después de calentados. Se corroboró que en efecto, a elevadas temperaturas, la formulación A= Intrón, pierde casi por completo su actividad, obteniéndose valores relativos a la muestra que se mantuvo a 4 °C de 0.039 y 0.002 a temperaturas de 60 y 70 °C, por períodos de tiempos de 1 y 2 días respectivamente. En cambio la muestra B= Heberon alfa, conservó su actividad casi el doble, expresando valores de actividad relativa de 0.065 almacenada a 60 °C por 1 día.

Al analizar la pureza de algunas muestras calentadas por RP-HPLC se obtuvieron los valores que se muestran en la figura 1. Todas las muestras fueron analizadas con respecto a la muestra de 4°C. Aquí se puede observar como en la formulación A, el porcentaje de pureza disminuye cuando es comparado con la formulación de referencia, la muestra de 4°C.

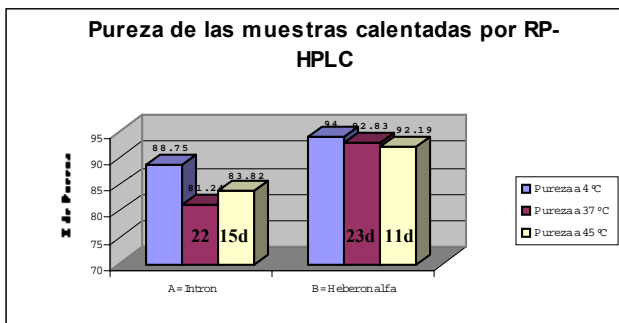


Figura 1: Comportamiento de la pureza de las muestras calentadas.

En el gráfico se puede observar la poca variación que existe entre las muestras calentadas de la formulación B y su muestra control. Estas variaciones son menores de un 2 % tanto para 37 como para 45 °C. En cambio en la formulación A se obtiene una variación de hasta casi 9 % a 37 °C.

En los cromatogramas de cada una de estas muestras calentadas se puede observar que en la formulación A= Intron aparecen picos nuevos en tiempos de retención menores y mayores que el pico principal, cuando son comparados con el obtenido para la muestra de 4°C. Esto corrobora el hecho de que este producto o sus excipientes se degradan y/o modifican cuando son calentados, incluso a temperaturas de calentamiento no muy elevadas. Por su parte en los cromatogramas de las muestras de la formulación B se aprecia que los picos de las muestras calentadas son muy semejantes a los de la muestra sin calentar. No se observan nuevas especies que pudieran indicar degradación del producto o de sus excipientes.

Conclusiones

Las técnicas analíticas empleadas en el estudio permitieron demostrar que la estabilidad de la formulación B= Heberon alfa es superior a la de la formulación A= Intron A. Esto le abre las puertas a nuestro producto en el mercado ayudando así a su comercialización.

Referencias

- 1 Tydeman, M. S. and Kirkwood, T. B. L. Design and analysis of accelerated degradation test for the stability of biological standards II. A flexible computer program for data analysis. *Journal of Biological Standardization* (12): 215-224. 1984.
- 2 CECMED. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el Registro de productos biológicos y biotecnológicos. Sept /99. (Proyecto de Regulación).
- 3 S. Cruz, C. Duarte, E. Ferra, G. Fontirroche, J.Vazquez, L. Martínez, N. Arteaga, E. Pérez, y J. Gavilondo. Cuantificación de interferón alfa 2b humano recombinante mediante anticuerpo monoclonales. *Biotecnología Aplicada* (1990). 7 (2): 132-141.
- 4 H. Santana, E. Martínez, J.C. Sá, G. Moya. Molecular Characterization of recombinant Human Interferon alfa 2b produced in Cuba. *Biotecnología Aplicada* 16:154-159.1999.
- 5 G. Moya et al. HPLC studies of a purified recombinant Human alfa Interferon preparation. *Biotecnología Aplicada* 11:64-67. 1994.
- 6 Pestka, S. in "Methods in Enzymology". Vol.78. Assay of Interferons. 339-409. 1981.
- 7 Tydeman, M. S. and Kirwood, T. B. L. Design and analysis of accelerated degradation test for the stability of biological standards II. A flexible computer program for data analysis. *Journal of Biological Standardization* (12): 215-224. 1984.

Actinomicetos cubanos: Fuente importante de antifúngicos de interés clínico y agrícola

Y. Iznaga, M. Lemus, M. E. Pérez, I. González, L. González, L. Garmendía, L. Nadal y C. Vallín

Departamento de Biotecnología, Centro de Química Farmacéutica, PO Box 6990, Cubanacán, Habana. Cuba. E-mail: vallin@biocnic.cneuro.edu.cu

RESUMEN

Los actinomicetos han sido de gran utilidad tanto en la medicina como en la agricultura por ser productores de un gran número de sustancias antimicrobianas. Este hecho, unido a la creciente aparición de infecciones fúngicas intratables sobre todo en pacientes inmunodeprimidos y particularmente en los que padecen de SIDA y a los problemas que traen consigo los residuos químicos de los fungicidas agrícolas en el medio ambiente además del fenómeno de resistencia, nos condujo a evaluar la actividad antifúngica de los productos de fermentación de actinomicetos de suelos cubanos. La considerable actividad antifúngica encontrada en los productos de fermentación de 4 cepas de actinomicetos (A1, A2, A3 y A4) permitió seleccionarlos para ensayos posteriores de identificación parcial y susceptibilidad ampliados. En A1 y A3 se encuentran presentes macrólidos poliénicos aunque en A1 también existe algún compuesto de la familia de los macrólidos clásicos. La familia de las estreptotricinas se encuentra representada en A2. Mostraron interés para la agricultura A1 y A2 por su especial actividad *in vitro* frente a hongos fitopatógenos sin embargo A3 y A4 se mostraron atractivos por su considerable actividad frente a levaduras de interés clínico. El producto A4 demostró tener especial actividad frente a levaduras con sensibilidad disminuida o potencialmente resistentes a tratamiento.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas en el hombre tienen lugar a lo largo de todo el mundo y, aunque no se consideran tan comunes como las enfermedades bacterianas y virales, están asociadas con severa morbilidad y mortalidad ¹. Después de los años 40 la aparición de terapias antibióticas e inmunosupresoras trajo como resultado una mayor frecuencia de infecciones micóticas severas. Más recientemente las alteraciones en los mecanismos de defensa del organismo han predisuesto a adquirir infecciones fúngicas invasivas ²⁻⁴. Hongos usualmente no patógenos ahora se están convirtiendo en un serio problema en pacientes inmunocomprometidos pues han resultado ser más resistentes a los antifúngicos disponibles.

Entre hongos, bacterias y virus fitopatógenos, los hongos son los más importantes como causantes de enfermedades en las plantas ⁵. Pero aún después de su cosecha, todos los productos vegetales no procesados están sujetos al deterioro por microorganismos. Las pérdidas considerables durante el almacenamiento, el transporte y la comercialización de estos productos constituyen más la regla que la excepción ⁶.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos de fermentación de actinomicetos (PF) ensayados: A1, A2, A3 y A4

Realización de ensayos de difusión en discos: Las suspensiones fúngicas y bacterianas se prepararon según metodología NCCLS ⁷⁻⁹. Para las levaduras se realizó una dilución 1/2000 en el medio agar Sabouraud dextrosa y

para los hongos filamentosos 1/100. Se colocaron discos de papel de filtro sobre el medio solidificado los cuales se impregnaron de los productos de interés.

Ensayos de identificación parcial: Ensayo de termoestabilidad a pH ácido para identificar compuestos de las familias de los aminoglucósidos, estreptotricinas o antraciclinas ¹⁰. Ensayo para detectar presencia de posibles macrólidos clásicos antibacterianos ¹¹. Ensayo para detectar presencia de posibles macrólidos poliénicos antifúngicos ¹².

Ensayo de microdilución en caldo frente a levaduras de interés clínico: Se empleó la metodología descrita en el documento NCCLS M27-A ⁷.

Ensayo de sensibilidad antifúngica de hongos fitopatógenos frente a los compuestos empleados en la agricultura y frente a los PF: Cilindros de medio agarizado procedentes de cultivos frescos de los hongos fitopatógenos fueron colocados sobre placas con medio agar Sabouraud dextrosa que contenían la concentración requerida de cada compuesto a ensayar. Las placas se mantuvieron 7 días en incubación a temperatura ambiente y se realizó la medición de los diámetros de las colonias crecidas determinándose los valores porcentuales de la inhibición del crecimiento ⁶.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos al enfrentar los PF de las cepas de actinomicetos seleccionadas a un amplio y diverso grupo microbiano evidencian la importante acción inhibitoria que ejercen A1 y A2 frente a los hongos fitopatógenos ensayados. A3 y A4 demostraron ser especialmente activos frente a levaduras de interés clínico.

Con relación al producto A1 puede apreciarse que el ensayo de termoestabilidad resultó negativo. Debido a que éste presentó actividades antifúngica y antibacteriana se emplearon como microorganismos indicadores de actividad una cepa de hongo y una de bacteria y en ambos casos después del tratamiento no se observó actividad inhibitoria por lo que podemos decir que en el PF ensayado no se encuentran compuestos pertenecientes a las familias de los aminoglucósidos, estreptotricinas o antraciclinas al ser reconocida la estabilidad de los mismos frente a estas drásticas condiciones. Los ensayos realizados para determinar la presencia de posibles macrólidos poliénicos y macrólidos clásicos resultaron positivos para A1. Este hecho nos permite suponer que las actividades antifúngica y antibacteriana que presenta el caldo fermentado pudieran ser debidas a compuestos diferentes debido a que los macrólidos clásicos no presentan actividad frente a hongos ni los macrólidos poliénicos frente a bacterias. Es lógico pensar en la existencia conjunta de estos compuestos pues ambos se producen por una misma ruta biosintética ¹³. En el producto de fermentación A2 parece encontrarse algún compuesto de la familia de las estreptotricinas pues el ensayo de termoestabilidad resultó positivo, con la particularidad de apreciarse un halo de inhibición algo disminuido en diámetro con relación al original obtenido previo al tratamiento, lo cual es un comportamiento típico de este grupo de antibióticos ¹⁰. Los ensayos para detectar posibles macrólidos poliénicos y macrólidos clásicos resultaron negativos. Los compuestos presentes en A3 y A4 resultaron ser termolábiles y no resistentes al tratamiento a pH ácido, por lo que no deben pertenecer a las familias de los aminoglucósidos, estreptotricinas o antraciclinas. El ensayo para detectar presencia de posibles macrólidos poliénicos resultó positivo en A3 por lo que pudiera pensarse en la presencia de uno o varios miembros de esta familia en el caldo de fermentación, pero fue negativo en A4. La determinación de posibles macrólidos clásicos no se llevó a cabo para A3 y A4 pues ambos no mostraron actividad antibacteriana. Con estos ensayos no se pudo llegar a conclusiones respecto a la naturaleza química del (los) compuesto (s) responsable (s) de la actividad antifúngica en A4.

Ensayo de microdilución en caldo: Debido a que en el producto de fermentación A3 existe la posibilidad de encontrar compuestos pertenecientes a la familia de los macrólidos poliénicos, reconocidos por su toxicidad, se realizó este ensayo solo con A4. Se corroboró la considerable actividad antifúngica de A4 sobre todo frente a las levaduras *Candida krusei* y *Cryptococcus neoformans* observada en el ensayo de difusión en agar y la ausencia de actividad frente a *Candida albicans* y *C. tropicalis* a juzgar por los resultados de mínima concentración inhibitoria obtenidos. La resistencia al fluconazol fue evidenciada así como la sensibilidad disminuida que presenta *C. krusei* a este compuesto.

Ensayo de sensibilidad frente a hongos fitopatógenos: Un producto se considera efectivo a la dosis ensayada cuando la inhibición del crecimiento fúngico supera el 90 % aunque en ocasiones se han obtenido resultados positivos cuando se ha aplicado un producto que ofrece un por ciento de inhibición por encima de 50⁶. Se obtuvo un 100 % de inhibición del crecimiento de todas las especies de *Aspergillus* aisladas después de la cosecha al utilizar los productos A1 y A2 a una concentración de 0.0016 % que es considerablemente inferior a la de los otros productos ensayados. Los agentes causales de infecciones en campo también resultaron inhibidos eficientemente *in vitro* al emplear los productos A1 y A2 a una concentración considerablemente menor que la empleada para el resto de los productos.

El desarrollo de fungicidas ha traído consigo muchos problemas entre los cuales se encuentra el de la aparición de resistencia fúngica y los efectos adversos de los residuos químicos en el medio ambiente. Existe una marcada tendencia actual a la introducción y uso de productos biotecnológicos en la industria y en la agricultura por su diversidad en estructura y actividad y su rápida biodegradabilidad. Los resultados positivos obtenidos con los productos biotecnológicos A1 y A2 permiten considerar el paso a fases superiores en el estudio de los mismos.

CONCLUSIONES

- A1 y A3 contienen sustancias pertenecientes a la familia de los macrólidos poliénicos y en A1 se encuentra presente algún compuesto de la familia de los macrólidos clásicos. A2 contiene una estreptotricina mientras que no se ha podido identificar la naturaleza química del compuesto responsable de la actividad antifúngica en A4.
- El producto A4 mostró especial interés por su actividad frente a levaduras oportunistas de interés clínico mientras que A1 y A2 se presentan como alentadores antifúngicos para enfrentar hongos fitopatógenos.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Espinel-Ingroff A. Clinical Microbiology Reviews, 9, 235, 1996.
- 2- Espinel-Ingroff A. Revista Iberoamericana de Micología, 13, 564, 1996.
- 3- Graybill J.R. Clinical Infectious Diseases, 22, S166, 1996.
- 4- González C. E. Clinical Infectious Diseases, 23, 515, 1996.
- 5- Casadesus L y col. En Micología. 1985. U. H. Facultad de Biología.
- 6- Pérez L. y Muiño B. L. Seminario teórico-práctico sobre fungicidas y resistencia a fungicidas. 1995.
- 7- NCCLS document M27-A, 1996.
- 8- NCCLS document M38-A, 2000.
- 9- NCCLS document M2-A7, 2000.
- 10- González I., Nieblas A. y Lemus M. Advances in Modern Biotechnology, 3, 3, 1995.
- 11- Periti y col. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 31, 1, 1993.

12- Etienne G., Armaw E. y Tiraby G. The journal of antibiotics, XLIII (2), 15, 1990.

13- Lancini G. y Parenti F. Antibiotics. Editorial International. Italia. Starr M. P. (Ed) 1982.