

35



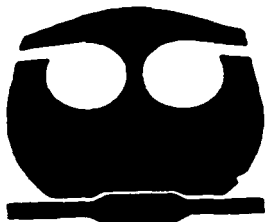
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**REVISION BIBLIOGRAFICA DEL CONTROL DE CALIDAD DE
FARMACOS Y MEDICAMENTOS DERIVADOS DE LA
BIOTECNOLOGIA**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
CATALINA DIAZ SALAZAR**



MEXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente Prof. Isaura Luisa Carrera García.

Vocal: Prof. María del Socorro Alpizar Ramos.

Secretario: Prof. Ma. De los Dolores Campos Echeverría.

1er. Suplente: Prof. Pedro Salvador Valadez Eslava.

2do. Suplente. Prof. Joaquín González Robledo.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química y del Centro Médico Siglo XXI.

Asesor del tema:

Prof. Isaura Luisa Carrera García.



Sustentante:

Catalina Díaz Salazar.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la dicha de culminar este trabajo y llegar a este momento tan importante.

A mis padres con amor, respeto y gratitud por todo lo que me han dado en todo momento de mi vida.

A todas mis hermanas y hermanos por su cariño y comprensión y por ser siempre un ejemplo a seguir.

A todos mis sobrinos con mucho amor

A mi asesora Q.F.B. Isaura Carrera con infinito agradecimiento por su valiosa colaboración para la culminación de este trabajo.

A mis Profesores de la Facultad de Química por todas las enseñanzas recibidas.

A mis amigas Carmen, Norma, Rocío y Jaqueline gracias por su amistad

A Bonaplast, por el desarrollo profesional que me sigue brindando

Y a cada una de las personas que siempre me apoyaron durante todos mis estudios y sobretodo en la realización de este trabajo

GRACIAS

ÍNDICE

1. Introducción	2
2. Objetivos y enfoque	2
3. Generalidades	3
3.1. Desarrollo de la Biotecnología	4
3.1.1. Microbiología Industrial	5
3.1.2. Biotecnología moderna	6
3.1.3. Perspectivas de la Biotecnología	8
3.1.4. Consecuencias de la Biotecnología	10
3.2. Regulación de productos biotecnológicos	11
4. Tecnología del ADN recombinante	13
5. Anticuerpos monoclonales	21
6. Características de los procesos de producción	34
7. Fármacos y medicamentos	38
8. Controles de procesos	52
9. Aseguramiento de calidad	55
10. Discusión	72
11. Conclusiones	73
12. Referencias	74

1. INTRODUCCION

En la actualidad, cada vez es más frecuente encontrar fármacos obtenidos por la Biotecnología moderna, por lo que el profesionalista del área química, en especial el QFB tiene la obligación de conocer el panorama general de esta multidisciplina así como los procesos de obtención en función de saber las exigencias en cuanto al control de calidad del producto en proceso y como producto terminado (determinaciones analíticas).

Esta revisión permitirá al Q.F.B. tener un panorama general de los fármacos y medicamentos obtenidos por la Biotecnología.

2. OBJETIVOS Y ENFOQUE

- ✓ Definir usos y aplicaciones de la Biotecnología en el área farmacéutica.
- ✓ Presentar las ventajas y desventajas del uso de la Biotecnología, así como el impacto político y ecológico de los residuos generados por esta nueva tecnología.
- ✓ Hacer una revisión del control de calidad aplicado a fármacos y medicamentos obtenidos por Biotecnología.
- ✓ Presentar un panorama general del futuro de la Biotecnología en el área farmacéutica.
- ✓ Presentar una revisión de fármacos y medicamentos derivados de la Biotecnología.

3. GENERALIDADES

Biotecnología: En su sentido más amplio, puede definirse como “la evaluación y uso de agentes biológicos y materiales en la producción de bienes y servicios”⁽¹⁾.

Biofármaco: Toda sustancia que haya sido producida por Biotecnología Molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que reúna condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento o ingrediente de un medicamento.

Biomedicamento: Toda sustancia que haya sido producida por Biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas.

Los biofármacos y los biomedicamentos pueden ser:

- I. **Proteínas recombinantes:** las proteínas producidas por cualquier ente biológico procariótico o eucariótico al que se le introduce, por técnicas de Ingeniería Genética, una secuencia de ácido desoxirribonucleico que las codifica:
- II. **Anticuerpos monoclonales:** Las inmunoglobulinas intactas producidas por hibridomas, inmunoconjugados, fragmentos de inmunoglobulinas y proteínas recombinantes derivadas de inmunoglobulinas.
- III. **Péptidos sintéticos:** Los péptidos constituidos por menos de cuarenta aminoácidos producidos por técnicas de Biotecnología molecular.
- IV. **Ácidos nucleicos sintéticos o de plásmidos:** Los ácidos nucleicos obtenidos de plásmidos naturales o modificados por técnicas de Ingeniería Genética, y
- V. Los demás que, en su caso, determine mediante acuerdo la Secretaría, conforme los avances técnicos y científicos.⁽²⁾

La Biotecnología consiste en la utilización y transformación de microorganismos y células vegetales o animales para la obtención de productos benéficos para el hombre. En su ámbito de estudio se relacionan conocimientos propios de la Biología, específicamente de la Microbiología, Bioquímica, Biología Molecular e Ingeniería Genética, con procedimientos industriales.

Una buena cantidad de compuestos orgánicos utilizados en la farmacología, la agricultura o la industria alimentaria, derivan de procesos biológicos bajo control industrial en los cuales intervienen microorganismos, por ejemplo:

- **Industria química:** síntesis de saborizantes, plásticos, condimentos artificiales, productos para la industria textil y solventes.
- **Energéticos:** metanol, etanol, biogás y producción de hidrógeno.
- **Biometalurgia:** extracción de elementos metálicos (Fe, Cu, Pb, Zn).
- **Industria alimentaria:** proteínas, aminoácidos, vitaminas, bioinsecticidas, bebidas fermentadas y jarabes.
- **Área ambiental:** tratamiento de aguas residuales, transformación de residuos domésticos y abono.
- **Industria farmacéutica:** antibióticos, vacunas, hormonas, interferón, anticuerpos monoclonales y otros.

La obtención de productos tan diversos sólo es posible gracias a una enorme gama de procesos, por lo que normalmente se habla de “las biotecnologías”. Por ejemplo, la Microbiología Industrial requiere del crecimiento de microorganismos en fermentadores, dentro de un determinado medio de cultivo que posea los nutrientes necesarios y los precursores de las sustancias que se desea obtener: alcoholes, antibióticos, vitaminas,

vacunas, etc. La ingeniería genética, por su parte, trabaja con cultivos celulares; en medios totalmente definidos, se obtiene el gen deseado, biológica o sintéticamente; se clona para obtener múltiples copias, uniéndolo a vectores moleculares (plásmidos o transposones) y se introduce en otros grupos celulares para transformarlos.

Para algunos autores la Biotecnología se inicia con la modificación genética y por ende metabólica de células procarióticas y eucarióticas, para la obtención de nuevos compuestos o el incremento en la producción de los ya sintetizados.

En Japón "La Biotecnología es el uso de sistemas, procesos u organismos biológicos en la manufactura e industria. Las bacterias, hongos, levaduras, algas, células y tejidos de plantas y animales, o enzimas aisladas de estos organismos, proveen los ingredientes activos para la formación de nuevas industrias y para el reemplazo de los procesos químicos o mecánicos existentes con procesos microbiológicos industriales nuevos o improvisados"

En Francia, "La Biotecnología consiste en la explotación industrial del potencial de los microorganismos, células animales, vegetales y las fracciones subcelulares derivadas de ellos".

En Inglaterra, "La Biotecnología es la aplicación de procesos, sistemas u organismos biológicos para la industria fabril y de servicios".⁽³⁾

3.1. DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA

Para algunos autores la historia de la Biotecnología se remonta al inicio de la Biología Molecular. Para otros, la Biotecnología aparece con las diversas metodologías de transformación que han usado las civilizaciones desde los inicios de la historia hasta nuestros días, cuando las manipulaciones biomoleculares alcanzan la transformación genética de algunos microorganismos. De esta manera, especialistas como Pierre Douzou separan la Biotecnología en una etapa primitiva, una etapa moderna y, finalmente, la era de la Biotecnología de vanguardia o de la nueva generación.

El uso de microorganismos para el beneficio del hombre se remonta a épocas muy antiguas de manera proporcional a los conocimientos que se poseían y, como es evidente, para satisfacer necesidades básicas: en la producción de pan, queso y bebidas fermentadas. Si bien hace 5000 años el hombre no manejaba directamente los microorganismos, pues no los conocía, se beneficiaba sistemáticamente con las transformaciones que producían. Actualmente, podemos no solo confinar al microorganismo en un medio de cultivo, sino alterar su información genética y "beneficiarnos" aún más de él.

Las transformaciones que produce la fermentación sobre diversos alimentos formaron muy pronto parte de las técnicas alimentarias de los antiguos pueblos. En el siglo XVII a. de C., los sumerios producían una cerveza derivada de la cebada y del *emmer* (cereal), pero aún antes de esta fecha debió aparecer una bebida fermentada elaborada a partir de la mezcla de agua y miel que se dejaba reposar al aire. El origen del vino muy posiblemente se remonta a 3,500 años a. de C. Entre los asirios, si bien no tuvo tanta difusión como la cerveza, pues el cultivo de la vid era practicado por los sacerdotes en jardines especiales, y la bebida era exclusiva de las "castas superiores". Durante mucho tiempo los pueblos de la Tierra consumieron una gran cantidad de productos alimenticios transformados, sin llegar a sospechar qué agentes producían los cambios de color, consistencia, aroma y sabor.

Actualmente sabemos que la fermentación es un proceso de óxido - reducción por el cual bacterias y levaduras obtienen su energía en condiciones anaerobias. Los

microorganismos anaerobios facultativos aprovechan la presencia de oxígeno para oxidar los productos de la fase anaerobia. Como la respiración puede seguir de la respiración anaerobia, el término fermentación en un sentido más amplio puede englobar los procesos por los cuales la materia orgánica – generalmente vegetal- es transformada en compuestos más simples bajo condiciones aerobias o anaerobias. Las primeras observaciones orientadas en un sentido químico se empezaron a hacer a finales del siglo XVI. En 1595, Libavius distinguió fermentación de putrefacción. Cien años después el químico Becher expresó tales diferencias en términos de procesos que mejoraban o empeoraban el sustrato. En 1648, Helmont señaló la existencia de un gas que se desprendía del proceso fermentativo del vino, el cual llamaron Vinorum y que, unos años después, Wren identificó como bióxido de carbono. Desde el siglo XVII se desarrollaron distintas teorías que se acercaban a la realidad sin encontrar aceptación; en tanto que las más erróneas del mecanicismo tenían mayor éxito.

En 1835, gracias al microscopio, C. Latour pudo estudiar la presencia de levaduras en las bebidas fermentadas y concluir que no eran simples sustancias orgánicas, sino que tenían capacidad reproductiva y que eran responsables de la transformación del azúcar en un líquido “espirituoso”. F. Kützing, que había llegado a los mismos resultados desde 1834, no pudo publicarlos hasta 1837, año en que habló también de la fermentación alcohólica, acética y la formación de vinagre. Schuwann trabajó con zumo de uvas y, bajo evidencia experimental demostró, que se necesitaba del “hongo del azúcar” (la levadura) para producir la fermentación y que este organismo requería de nitrógeno. En la actualidad el nitrógeno es un elemento básico para formular medios de cultivo en diversas áreas de la microbiología.

Paralelamente, una parte de los químicos orgánicos dedicaban sus esfuerzos al estudio de los catalizadores biológicos o “fermentos” como se les llamaba entonces. J. Berzelius introdujo la idea de catálisis en la fisiología, hacia 1830. Afirmaba que en los organismos se realizaban miles de reacciones mediante agentes químicos cuya presencia era esencial para la reacción pero que no eran consumidos durante ella. En 1877, Kūne acuñó el término de enzima, cuyo aislamiento durante todo el siglo XIX fue básico para el desarrollo de la Bioquímica. En 1897 E. Buchner aisló la zimasa: un grupo de enzimas que llevan a cabo la fermentación alcohólica; solo cuatro años antes, Ostwal había demostrado que las enzimas son catalizadores y E. Fischer en 1894 demostró su especificidad por el sustrato. También en 1897, Bertrand ideó el término coenzima; el término Bioquímica lo utilizó Neberg por vez primera en 1903. Batelli y Stern descubrieron las hidrogenasas en 1912, y en 1913 Michaelis y Menten descubrieron la teoría cinética enzimática.

3.1.1 MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

El desarrollo científico de finales del siglo XIX y la primera mitad del siglo XX sentó las bases de un crecimiento industrial a través del cual los microorganismos darían al hombre antibióticos, vacunas y complementos alimenticios. El desarrollo de la Biología Celular permitió definir medios de cultivo para mantener y multiplicar los organismos productores; la ingeniería bioquímica diseñó cubas fermentadoras para llevar a cabo las reacciones de síntesis; la Bioquímica creó métodos de separación de productos, y la biología molecular y la ingeniería genética transformarían las células y los microorganismos.

Un descubrimiento importante para el nacimiento de la Biotecnología se hizo en 1896, cuando Ernest A. Clement Duchense, estudiante francés de medicina, demostró nitidamente la acción antibacteriana del hongo *Penicillium*. *Penicillium* volvió a llamar la

atención en 1928. Alexander Fleming trabajaba con cultivos de *Staphylococcus aureus* cuando un hongo de la familia de *Penicillium* contaminó una de sus cajas. Al poco tiempo observó una zona clara donde habían desaparecido las bacterias. Fleming cultivó el hongo e hizo el extracto de él, al cual llamó penicilina. En 1939, Ernest Boris Chain y Howard Florey aislaron la penicilina y atribuyeron el origen de su trabajo a la observación que hizo Fleming.

Durante la segunda Guerra Mundial, la producción de penicilina que llevaba a cabo Inglaterra era insuficiente. Florey y Chain pidieron ayuda a la industria química de los Estados Unidos, donde tres compañías tomaron la responsabilidad de producirla: Merck, Pfizer y Squibb. No solo los antibióticos se obtienen de procesos fermentativos, sino también vitaminas. En 1901, Wildiers descubrió la presencia de biofactores o vitamina B, necesarias para el crecimiento de levaduras. Desde aproximadamente el año 1933 la riboflavina (B₂), la cianocobalamina (B₁₂) y la vitamina C se producen por procesos fermentativos industriales. Desde un punto de vista tecnológico se suele definir la fermentación como el conjunto de operaciones que permiten cultivar microorganismos y controlar sus actividades biosintéticas: producción de biomasa, enzimas, metabolitos u otras moléculas orgánicas.

Gracias a los cambios ingenieriles y biológicos, los fermentadores pasaron de ser fermentadores formados por una escotilla de llenado, un conducto de oxigenación y un conducto para la toma de muestras, a biorreactores más confiables: equipados con medidores de pH y de porcentaje de O₂, con controles de temperatura, conductos de inoculación, incorporación de sistemas de reciclaje de biomasa e inyectoros de soluciones para el control de pH, etc. Antes de la Segunda Guerra Mundial, todas las técnicas de cultivo en relación con los biorreactores eran discontinuas: las cargas y descargas de biomasa marcaban el inicio y final de cada proceso. Cuando se contó con un mejor equipo y se logró entender la cinética del crecimiento durante la fermentación, fue posible introducir el cultivo de tipo continuo (quimiostato y turbidostato): un cultivo donde la entrada de nutrientes y la salida del producto no interrumpen el proceso, y donde pudieran estar conectados varios biorreactores encargados de distintos pasos de la reacción.

3.1.2. BIOTECNOLOGÍA MODERNA

Uno de los problemas que tenía que resolver la ingeniería genética era el de reducir, en los sistemas, las pérdidas del potencial catalítico, representado por las células y, específicamente, por sus enzimas. La primera solución consistió en fomentar el crecimiento celular en soportes sólidos, para retener la mayor población bacteriana dentro del reactor. En 1960 los grandes soportes para fijar las células fueron el principio para desarrollar nuevos métodos de inmovilización, no solo celular sino también enzimática. El primer método que se desarrolló fue la adsorción: las enzimas o las células se adhieren poco mas que frágilmente a una superficie de carbón, aluminio, arcilla o celulosa. También se pudo conseguir la adhesión a una superficie de celulosa o polímero sintético, a través de enlaces covalentes entre la enzima y la superficie, con la desventaja de disminuir la actividad enzimática. G. Manecke y E. Katchalski fueron los pioneros de los métodos de inmovilización. Se desarrollaron nuevos métodos de inmovilización, como el entrapamiento en matriz polimérica, de almidón o gel de sílice insolubles en agua; método que se adapta muy bien a la inmovilización celular. Otro método de inmovilización fue el de encapsulación, que consiste en confinar las enzimas en pequeñas partículas esféricas limitadas por una membrana.

Paralelamente al desarrollo de la ingeniería enzimática se logró un número de descubrimientos importantes relacionados con el entendimiento de la información genética, principalmente en los organismos procariotes. Estos descubrimientos desembocaron en la formación de una nueva área científica: la Ingeniería Genética. Sus primeras aplicaciones han sido la elaboración de mapas genéticos, la elaboración de ADN a través de retrotranscripción, la clonación de genes, etc. De sus técnicas se han derivado aplicaciones enfocadas a la medicina, como son la síntesis del interferón, las vacunas y los anticuerpos monoclonales y, en la agricultura como es el caso de la introducción de genes foráneos para el mejoramiento de especies vegetales.

Uno de los organismos más usados en los estudios de genética a principios de siglo fue la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Tras la segunda guerra mundial, algunos físicos decidieron incursionar en el área biológica y esto dio un gran impulso al enfoque molecular dentro de la Biología. Además, significó un cambio afortunado en cuanto a los modelos biológicos, ya que la mosca de la fruta resultaba un organismo muy complejo, de lenta reproducción y de difícil manipulación. Por ello, algunos investigadores empezaron a trabajar con bacterias, principalmente con *Escherichia coli*, la cual podía presentar el fenómeno de transducción de material genético viral.

En la década de los setenta ya era posible determinar automáticamente la estructura de las proteínas, como resultado de las técnicas analíticas diseñadas por Sanger y los métodos de degradación proteínica de Edman y Beggs. En 1976 Sanger, Gilbert y Maxam desarrollaron un método químico de análisis de ácidos nucleicos para operarse con un programador que determinaba secuencias a una velocidad de 1000 nucleótidos por semana. Entre 1982 y 1985 salió al mercado un analizador de ADN. Por otro lado, Itakura y colaboradores sintetizaron genes de somatostatina e insulina humana entre 1977 y 1978. Estos genes fueron introducidos en células bacterianas por técnicas de recombinación genética desarrolladas por Boyer y colaboradores en la compañía Genetech. Así se consiguió por primera vez la expresión de genes humanos en células bacterianas. Los primeros experimentos de recombinación genética fueron hechos en 1953 como modelos de investigación en Biología Molecular por W. Arber y D. Nathans. En 1975 C. Milstein obtuvo anticuerpos altamente específicos y reproducibles a voluntad, fusionando células de anticuerpos con células tumorales y clonando los híbridos resultantes. Estas células producen los llamados anticuerpos monoclonales. La aplicación inmediata de los anticuerpos monoclonales podría ser la inmunización pasiva, es decir, inyectar un anticuerpo al paciente, en vez que un antígeno estimule la respuesta de los anticuerpos del propio paciente. En 1980, Itakura construye el primer ensamblador de genes y poco después la Compañía Bio-Logicals de Toronto comercializó una máquina, la cual pudo sintetizar en seis horas un dodecanucleótido con la secuencia requerida.

Otras de las aplicaciones de la recombinación genética ha sido su uso en la producción de interferones; éstas sustancias producen la primera defensa contra ataques virales. Son proteínas liberadas en pequeñas cantidades por las células de muchos vertebrados. En el hombre existe el interferón leucocítico, fibroblástico e inmune, producido por linfocitos T. Los métodos convencionales para la obtención de sustancias naturales producen muy pocas cantidades, por lo cual se empezó a probar con las técnicas de recombinación. El líder en producción mundial de interferón en 1980 era el Laboratorio Central de Salud Pública en Helsinki, el cual producía 400 billones de unidades de interferón leucocítico por año. Ocupó el segundo lugar el Instituto Pasteur con 48 billones de unidades, el Instituto Merieux, de Francia, en cooperación con el Instituto Weizmann, de Israel, acumuló en 1979, 1,500 billones de unidades de interferón crudo que se purifica por un método desarrollado en el Instituto Weizmann usando anticuerpos monoclonales para

dar un 80% de producto puro. Este interferón se usó principalmente para el virus del herpes. ⁽³⁾

3.1.3 PERSPECTIVAS DE LA BIOTECNOLOGÍA

La Biotecnología ofrece las posibilidades de obtener prácticamente cualquier proteína, ya sea procaríote o eucariote, por sistemas de fermentación. Falta aún por recorrer camino en el desarrollo de vectores y cepas adecuadas, especialmente en los microorganismos utilizados tradicionalmente por la industria de la fermentación. ⁽³⁾

Como se ha señalado, la Biotecnología ha evolucionado y se ha diversificado de tal manera que ahora se utiliza en varias áreas de la producción y la transformación. También ha cambiado el enfoque sobre los alcances de la Biología y hay quienes piensan que la Biotecnología marcó el auge tecnológico de finales del siglo XX, mientras que otros la ven como una herramienta más para transformar y aumentar el rendimiento de los microorganismos y los cultivos celulares eucarióticos, y los más desconfiados creen que es el inicio de la creación de monstruos del futuro, este último aspecto, fuera de lo que es la línea microbiológica de la Biotecnología. Estos enfoques son algunos de los más mencionados; pero ¿a dónde ha llegado realmente la Biotecnología?, ¿Cuánto se ha extendido?, ¿Qué bioindustrias existen?, ¿Qué se tiene proyectado?

El desarrollo de la Biotecnología moderna que se dió en los años setenta, impulsó el nacimiento de nuevas bioindustrias y la expansión de otras ya existentes, tales como: Genetech, Biogen, Cetus y Centocor en EE.UU., Kyowa Hakko, en Japón, Transgene, Genética, en Francia, etc. Además, para mediados de los ochenta se habían establecido alrededor de 200 bioindustrias en EE.UU, lo cual representa un récord en el mundo. Aunque no todo el desarrollo biotecnológico ha sido exitoso, ya que algunas empresas sucumbieron, principalmente por no tener una perspectiva real del tiempo de comercialización de sus productos.

Paralelamente a estos sucesos científicos industriales, en la década de los setenta se generó un gran interés gubernamental en los países mencionados por conocer la capacidad de los procesos biotecnológicos, su estado de desarrollo mundial y sus perspectivas a mediano y a largo plazo. Se hicieron reportes completos, globales y llenos de promesas para el futuro: fue el inicio de una competencia acelerada, principalmente entre EE.UU y Japón. La vía principal de comercialización de los procesos y productos biotecnológicos han sido los grandes emporios industriales capaces de financiar los proyectos y la infraestructura necesaria para cada paso. Por otra parte, el Estado ha desempeñado un importante papel el financiar diversos proyectos, como ha ocurrido en la URSS, Polonia, Alemania y Japón.

Los esquemas de apoyo al desarrollo y comercialización de la Biotecnología son rutas obligadas por la organización político-económica que viven casi todos los países. El beneficio social y económico que representan es muy grande a largo plazo. El empleo de procesos biosintéticos por parte de las industrias de países económicamente desarrollados es, en muchos casos, una forma de introducir nuevos productos o compuestos sustitutos en el mercado, lo cual supone capitales iniciales muy altos, pero con costos de producción bajos, que dan por resultado buenos negocios a mediano y largo plazo. En el caso de países más pobres y con necesidades básicas no resueltas, los objetivos no pueden ser los mismos; por lo que debe darse prioridad a la aplicación de biotecnologías directamente relacionadas con la obtención de energía, potabilización del agua, autosuficiencia en la producción de antibióticos y vacunas y en aquellas biotecnologías que mejoren la producción agrícola en cantidad y posteriormente en calidad.

En México, además de la industria cervecera y la industria química transnacional, hay un nuevo grupo de industrias biotecnológicas: Biogenética Industrial, Mexicana de Propagación de Plantas, Bioenzimas, Enzymologa, Genin y Enzygen. Los especialistas mexicanos que han estado al tanto del desarrollo biotecnológico de los países líderes del ramo, participaron en 1984 en un proyecto analítico donde se evaluaron las oportunidades de desarrollar productivamente la Biotecnología nacional. Como resultado del estudio, se decidió, dar prioridad al desarrollo de las áreas agropecuarias, de alimentos, de combate a la contaminación, energética, química, química farmacéutica y de salud. Así es que posiblemente algunas de estas áreas se beneficien con los procesos biotecnológicos, ya sean importados o producidos con la nueva biotecnología nacional. Fuera del campo productivo, la ingeniería genética experimental avanza a grandes pasos. Uno de sus avances lo constituyen los organismos "transgénicos" tanto animales como vegetales. Estos organismos genéticamente transformados son resultado de la agregación, en su acervo genético, de ciertos genes foráneos que al expresarse les dan una nueva característica, agregada a su información hereditaria. Tal es el caso del gen de la hormona de crecimiento introducido en peces, anfibios y mamíferos.

En el campo de la transferencia de genes, el siguiente paso deberá ser entre otros el de entender más sobre la regulación de los mismos genes, sus mecanismos de inserción y su compatibilidad con la salud genética y metabólica del organismo. En este sentido, deben contemplarse dos aspectos legales: la patente sobre procesos y organismos derivados de la ingeniería genética, que ya existe en EE.UU, Francia y otros países y la prohibición de liberar al medio ambiente organismos modificados genéticamente, con el fin de proteger al resto de las especies de alteraciones en su descendencia, por motivo de entrecruzamiento con estos organismos, lo cual en último caso repercutiría a largo plazo en el equilibrio ecológico.

Una vez que el hombre ha demostrado ya su capacidad de transformación sobre lo vivo, esto no es más que el principio de lo que en un futuro, no lejano, será el desarrollo de la humanidad en un medio donde los planos de la vida (ADN) serán la herramienta diaria para transformar la vida misma. ⁽³⁾

A la fecha, se producen alrededor de 200 productos por medio de la Biotecnología. El grueso de la industria biotecnológica actual tiene sus bases tecnológicas en cuatro técnicas: selección, tecnologías de fermentaciones, usos de agentes biológicos inmovilizados y, desde luego, un porcentaje alto de técnicas de recuperación y purificación.

Obtenidos por medio del ADN recombinante, en el mercado existe actualmente un número limitado de productos farmacéuticos como: la insulina humana, la hormona de crecimiento, los interferones y la vacuna para la hepatitis. En vista de que la actividad industrial es intensa, se espera que muchos más productos farmacéuticos salgan al mercado a principios del siglo XXI. La tecnología del hibridoma es probablemente la que más productos ha colocado en el mercado. Se estima que en la actualidad existen más de 100 productos para diagnóstico, basados en anticuerpos monoclonales. En el presente, aunque su uso está prácticamente restringido a aplicaciones in vitro, sus posibilidades para el diagnóstico in vivo de cáncer y de padecimientos cardiacos y su uso en terapia contra ciertos tipos de cáncer son muy prometedoras en el corto plazo. ^(1,5,6)

3.1.4 CONSECUENCIAS DE LA BIOTECNOLOGÍA

ECOLÓGICAS:

La alteración genética de seres vivos y la utilización de cada vez menos variedades probablemente acarrearán ciertos problemas en la ecología. Algunos ejemplos de ellos se describen a continuación:

- Se está trabajando en lograr plantas que sean resistentes a herbicidas; esto ocasionará si no se maneja adecuadamente que se requieran cantidades cada vez mayores de pesticidas, lo que contaminará más el suelo.
- Se ha desarrollado ya una bacteria como agente anticongelante (*Psyringae*) y se ha demostrado que ésta hace más resistentes al congelamiento a ciertos insectos, y facilita su proliferación. Si éstos son dañinos, se convertirán en una plaga potencial.
- Se está trabajando en transplantar genes a ciertas plantas, las cuales le confieren resistencias a insectos y agentes patógenos. Se ha visto que, como una consecuencia colateral, en la planta se incrementan los niveles de sustancias tóxicas y posiblemente carcinógenas.
- Otro ejemplo lo constituye la transferencia de genes. En la naturaleza, los genes de cierta resistencia pueden ser transferidos accidentalmente a las malezas, lo que potencialmente las hará más difíciles de combatir.
- En el área vegetal, quizá la mayor amenaza de las nuevas técnicas biológicas sea la pérdida irrevocable del germoplasma (material hereditario contenido en los gametos) por la introducción de nuevas variedades.

EN LA SALUD:

Una de las áreas en que las nuevas técnicas biológicas han tenido éxito comercial es la salud humana y animal. La Biotecnología ha contribuido tanto a la medicina preventiva (mediante el desarrollo de vacunas, métodos de diagnóstico, etc.), como al desarrollo de medicamentos. Sin embargo, como la historia lo ha demostrado, la disponibilidad de una vacuna, medicamento o agente terapéutico no tiene un efecto directo en los niveles de salud de sectores amplios de la población, en particular, en el Tercer Mundo. Los niveles de salud son más bien una función de las condiciones de vida de la población, dadas por su infraestructura física y no de la disponibilidad de medicamentos. En este sentido la Biotecnología podrá generar técnicamente casi cualquier medicamento, y ampliar así las perspectivas preventivas y terapéuticas, pero esto no necesariamente mejorará la salud de la población.

ECONÓMICAS Y SOCIALES:

Tal vez el mayor efecto de las nuevas biotecnologías se dé en el ámbito económico y social. Por ejemplo, el aumento en los rendimientos y la productividad en el campo incrementará la oferta de suministros alimenticios y, en consecuencia, tenderá a abatir los precios. Otra tendencia que ya se percibe (sobre todo en Estados Unidos) es la disminución del número de granjas pequeñas, ya que las nuevas biotecnologías están orientadas a incrementar la productividad en terrenos de extensión considerable, donde pueda

uniformarse la calidad del producto y el tiempo de cosecha, y mecanizarse más intensamente el uso de la tierra.

Otro aspecto importante lo constituye el hecho de que, en general, las nuevas biotecnologías crearán una mayor dependencia tecnológica de proveedores oligopólicos. Un ejemplo claro de esto lo constituirán las semillas mejoradas, que con seguridad producirán las mismas compañías fabricantes de pesticidas. De forma global, y aunque es difícil precisar en que grado y en cuanto tiempo ocurrirá, la Biotecnología "modificará el uso tradicional de la tierra, desplazará poblaciones, suprimirá y también creará empleos, cambiará los precios relativos de los productos en el mercado y traerá múltiples consecuencias de carácter social y político".⁽¹⁾

3.1.5 REPERCUSIONES EN EL TERCER MUNDO:

En general, se ha observado como una tendencia que las biotecnologías han permitido a los países industrializados ser más independientes de los suministros del Tercer Mundo. Probablemente el caso más ilustrativo sea el de los edulcorantes. Hasta principios de la década de los años setenta, el edulcorante principal en todo el mundo era el azúcar y buena parte del suministro de sacarosa lo proporcionaban los países del Tercer Mundo. Con el advenimiento de la tecnología enzimática, que permitió transformar en forma económica el almidón de maíz en licores fructosados, los países industrializados, introdujeron en forma drástica este nuevo edulcorante a sus mercados, esto ocasionó que el consumo *per cápita* de licores fructosados casi se duplicaran en 15 años. Lo anterior ha tenido un efecto devastador en el mercado mundial del azúcar.

En México, las perspectivas de desarrollo de la Biotecnología no son muy alentadoras. La falta de inversión, la gran diversificación de proyectos de investigación, la desconfianza mutua entre la industria y las instituciones de investigación, la escasez de personal calificado y el acentuado individualismo son los principales frenos al desarrollo de la Biotecnología en nuestro país.

Debe considerarse, finalmente, que sólo si el país toma la decisión política de desarrollar proyectos que respondan a necesidades claras de la sociedad se podrán concretar éxitos biotecnológicos nacionales de importancia.^(1,6,7)

3.2. REGULACIÓN DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS

Los adelantos biotecnológicos de las últimas dos décadas, en particular los realizados por la ingeniería genética y la biología molecular, permiten crear nuevas combinaciones en el material genético de los organismos vivos y, en consecuencia, producir plantas, microorganismos y animales modificados, conocidos como Organismos Genéticamente Modificados (OGM) u organismo transgénicos, para los casos en el que el gen o genes provengan de una especie distinta a la del organismo receptor. Estos nuevos organismos tienen características que antes no existían en ellos y se han modificado intencionalmente para beneficio de la humanidad, con el propósito de producir un impacto positivo en la agricultura, la salud humana y animal, el medio ambiente y el comercio internacional. Sin embargo, la llegada de los OGM al mercado y el inminente acceso de los consumidores a estos productos, ha provocado inquietud por falta de información científicamente sustentada en torno al tema. Aquí es importante hacer una precisión respecto al ámbito de la bioseguridad, que es entendida como el uso y aplicación seguros de cierto tipo de productos biotecnológicos, incluyendo los OGM, que tengan posibles efectos

en el ambiente y la salud, por lo que ha resultado en la implementación de varias regulaciones por organismos como: el Instituto Nacional de Salud, la Organización Económica para la Cooperación y Desarrollo y la Comisión Europea. Los criterios que actualmente se utilizan para hacer los análisis de bioseguridad, no aplican directamente a los productos farmacéuticos que se obtienen y se utilizan en sistemas contenidos, es decir, en reactores cerrados que impiden el escape de los OGM, ya que se trata de organismos vivos y virus que se usan en procesos para la obtención de fármacos y productos para el diagnóstico, vacunas, etc., que mientras se encuentren dentro de los límites de la planta productiva no constituyen un riesgo para la salud ni para el ambiente.

Por otro lado, en la producción de productos farmacéuticos se cuenta con una vasta experiencia, ya que se toman una serie de precauciones muy bien estructuradas que se detallan en las "Buenas Prácticas de Manufactura a gran escala", y que se recogen también en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Químico-Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Para el caso de los productos farmacéuticos, la bioseguridad únicamente se aplicaría en el caso de un escape de OGM para mitigar los posibles efectos a la salud o al ambiente. La regulación nacional relacionada con la Biotecnología se ha centrado en aspectos de prevención y control de posibles riesgos del uso o aplicación de productos biotecnológicos para la salud humana, la sanidad vegetal y animal y el medio ambiente.

En la actualidad hay dos corrientes dinámicas de regulación del uso de productos biotecnológicos modernos en el ámbito de la bioseguridad en el país:

- Sectorial: que consiste en aprovechar la regulación ya vigente, establecida progresivamente en el marco legal y regulatorio especializado de cada sector, para realizar las adecuaciones pertinentes (salud, fitosanitario, medio ambiente).
- Integral: que consiste en intentar que en un solo instrumento se contengan disposiciones de diferentes materias vinculadas a la bioseguridad, para normar el ejercicio de atribuciones en esta materia.

Independientemente de los méritos que pueda tener un enfoque sectorial o integral para desarrollar la regulación, un aspecto crucial e indispensable es partir del establecimiento de una política regulatoria clara y completa en materia de bioseguridad, que precise con claridad los propósitos, alcances e instrumentos idóneos para tutelar adecuadamente los intereses públicos en las diferentes materias vinculadas con la bioseguridad. ⁽⁸⁾

3.2.1 ALCANCE DE LA BIOTECNOLOGIA EN EL DESARROLLO DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

El interés actual en la biotecnología es el resultado principalmente de dos avances. El primer avance fue el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, que permitió que los genes de una especie sean transplantados dentro de otras especies. Así, el código genético para la expresión de una proteína deseada (usualmente humana) podría ser insertado dentro de una célula huésped procariótica o eucariótica, de tal manera que, la célula huésped podría entonces expresar las cantidades utilizables de la proteína deseada. El segundo avance principal fue el desarrollo de técnicas para la producción de grandes cantidades de anticuerpos monoclonales (por ejemplo originando anticuerpos de un solo linfocito).

La Biotecnología dentro de la industria farmacéutica generalmente se refiere a ambos: la producción de fármacos usando la tecnología del ADN recombinante y la producción de anticuerpos monoclonales. Otras tecnologías, por ejemplo, las plantas y

animales transgénicos, la terapia génica, la antisensibilidad al ADN, pueden tener aplicaciones potenciales para la industria farmacéutica en el futuro, pero hasta el momento no se han incluidos como monografías farmacopeicas. ⁽⁹⁾

4. TECNOLOGIA DEL ADN RECOMBINANTE

La base de esta nueva tecnología es la habilidad de introducir material genético dentro de las células, de tal forma que el ADN sea capaz de replicarse y de ser pasado a la progenie de las células. En otras palabras, alterar el material genético hecho por las células por adición de ADN extraño. El ADN puede provenir de algunas fuentes como: animales, plantas, microorganismos o sintético.

Las aplicaciones más obvias son aquellas en las cuales un gen codifica para la obtención de un producto comercial y es transferido dentro de una especie en la cual el producto puede ser producido fácil y eficientemente. Se conocen ejemplos que incluyen la transferencia dentro de la bacteria *E. coli* del gen de la insulina humana, genes de interferón, y el mensajero para la hormona de crecimiento humana. ⁽¹⁰⁾

La información genética de las bacterias se almacena en 1) un solo cromosoma principal, que porta unos cuantos miles de genes y 2) de cero a miles de "minicromosomas", denominados episomas y plásmidos. Los plásmidos son muy variables en tamaño y van desde los que solo portan tres genes a los que son lo suficientemente grandes para albergar varios cientos de genes. Se sabe que algunas células bacterianas portan hasta 11 plásmidos diferentes, además del cromosoma principal.

Todos los cromosomas bacterianos caracterizados hasta la fecha contienen una sola molécula circular de ADN que existe *in vivo* en una conformación muy condensada. Los cromosomas bacterianos, como los de otros procaríotes, no están circundados por membranas nucleares. Las regiones nucleares de las bacterias se denominan por lo tanto *nucleoides* y no núcleos, para distinguirlos de las contrapartes eucarióticas.

Las bacterias se dividen por fisión sencilla, con una distribución ecuatorial del material genético entre las dos células hijas. Por lo general son haploides (o parcialmente diploides, durante los procesos de recombinación), pero "multinucleadas". Esto es, el nucleoide de una bacteria contiene por lo general dos o más copias idénticas del cromosoma (más plásmidos, cuando están presentes). Los cromosomas bacterianos no pasan por los ciclos de condensación mitóticos y meióticos como la división celular y la gametogénesis de los eucariotes. Los eventos de recombinación genética asociados con la reproducción sexual de organismos superiores (segregación, recombinación independiente y entrecruzamiento meiótico) por lo tanto no constituyen partes integrales de los ciclos de vida de las bacterias.

Sin embargo, la recombinación es, sin lugar a dudas, un evento importante en la evolución de las bacterias, del mismo modo que lo es en la evolución de los eucariotes. En el transcurso de la evolución, han surgido tres procesos diferentes que median la transferencia de material genético de una bacteria a otra, haciendo posible los eventos de recombinación subsecuentes. La diferencia más evidente entre estos tres procesos es el modo de transferencia de ADN de una célula a la otra.

- 1) **La transformación** se refiere a la captación de moléculas desnudas de ADN de una bacteria (la célula donadora) por otra bacteria (la célula receptora). La transformación ha sido descrita en muchas especies de bacterias que tienen la habilidad de tomar el ADN de forma natural. Solo un pequeño porcentaje de una población de bacterias tiene esta habilidad, y esas pocas células se dice que son *competentes*. En *E. coli* célula

competente éste fenómeno no ocurre naturalmente, pero se puede inducir por medio de tratamiento con una solución de cloruro de calcio. Después de este tratamiento las células son mezcladas con el ADN que va a ser introducido, dando un breve choque térmico y entonces se permite la recuperación. El mecanismo preciso por el cual el ADN entra a la bacteria todavía no es conocido. Este proceso no es muy eficiente, pero alrededor de 10^7 bacterias por microgramo de ADN son transformadas, lo cual es suficiente para los propósitos de la ingeniería genética.

- 2) La **transducción** tiene lugar cuando un bacteriófago lleva genes bacterianos de una célula donadora a otra receptora.
- 3) La **conjugación** es el proceso durante el cual el ADN de una célula donadora o masculina se transfiere a una célula receptora o femenina a través de un pelo ("pilus") sexual especializado o "tubo de conjugación".^(11,12)

4.1 MECANISMOS DE RECOMBINACION

PLASMIDOS: Son porciones de ADN que se encuentran a menudo en bacterias y algunas células eucariotas inferiores. No son esenciales para el crecimiento, pero pueden conferir algunas propiedades no usuales a la célula para protegerla. Los plásmidos se replican independientemente de los cromosomas y se han descrito como ADN extracromosomal. Algunos plásmidos son moléculas circulares de ADN, no obstante se han encontrado ejemplos de ADN lineales. Las propiedades conferidas por los plásmidos son extremadamente variadas⁽³⁾. Existen dos clases de moléculas capaces de replicarse, la primera son los plásmidos. La segunda clase son los vectores, basados en virus de bacterias o fagos. El ADN fago también puede replicarse dentro de la bacteria y aumenta la progenie molecular, estas son las bases de la acción del fago como un agente infeccioso.

Los vectores son moléculas transportadoras de ADN extraño, por supuesto que la característica principal es la inserción del ADN dentro del vector. En la **figura 1**, se presentan los pasos básicos de la clonación:

- La inserción del ADN extraño dentro del vector.
- La reincorporación del vector recombinante dentro de la célula bacteriana.

El paso principal en la aplicación de la tecnología del ADN recombinante para la producción de una proteína deseada se puede resumir de la siguiente forma:

El primer paso crítico es la identificación de la proteína que es necesario producir, seguido del aislamiento del gen de interés (por ejemplo: la secuencia del código del ADN para la proteína). Una vez que este gen es aislado y completamente caracterizado, es insertado dentro de un vector adecuado tal como un plásmido. El plásmido es entonces insertado dentro de la célula huésped. Se aíslan los clones de la línea celular transformada y aquellos que producen la proteína de interés en las cantidades deseadas se preservan bajo condiciones adecuadas como un banco de células.

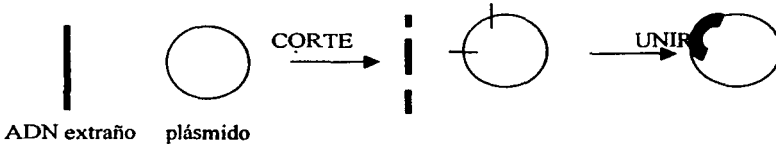
Para cubrir las necesidades de la industria farmacéutica se requiere desarrollar los clones de las células a escala industrial en un proceso de fermentación o cultivo celular para producir la proteína deseada.

En los procesos del ADN recombinante, deben reconocerse los siguientes puntos importantes:

El vector (plásmido) generalmente contiene un marcador selectivo que se usa para identificar las células que contienen este gen. Esto es, en adición al gen codificado para la proteína de interés y la secuencia regulatoria de nucleótidos necesaria para la replicación

del plásmido y la transcripción del ARN mensajero (el primer paso en la síntesis de proteínas). La selección de las células deseadas se simplifica porque sólo las células transformadas que contienen el gen marcador selectivo sobrevivirán bajo las condiciones de crecimiento usado para identificar y propagar las células transformadas.

a) Inserción de ADN extraño dentro del vector.



b) Incorporación del vector recombinante dentro de la célula de la bacteria

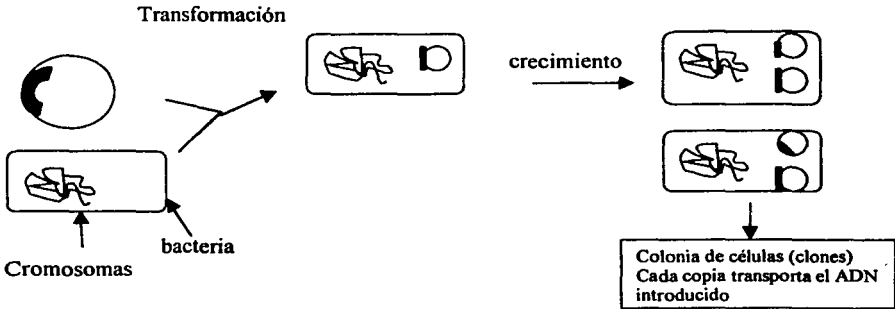


Fig. 1 Pasos básicos de la clonación

Típicamente, los marcadores selectivos de bacterias y eucariotes pueden en ambos casos incluir resistencia a antibióticos o genes que complementan una mutación auxotrófica del huésped. Este marcador es adicional al gen codificado para la proteína de interés a la secuencia reguladora de nucleótidos necesarios para la replicación del plásmido y al ARN mensajero para la transcripción (primer paso en la síntesis de proteína).⁽¹⁰⁾

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN: Correctamente llamadas endonucleasas de restricción (Tabla 1). Muchas endonucleasas hacen cortes en el ADN al azar. Sin embargo, las endonucleasas de restricción son de sitio específico y rompen las moléculas de ADN sólo en secuencias específicas de nucleótidos denominados sitios de restricción. Las distintas endonucleasas de restricción, presentes en diferentes bacterias, reconocen diferentes secuencias de nucleótidos.

Una función que realizan las endonucleasas es proteger al material genético de la bacteria de la posible "invasión" por ADN extraño. Todos los sitios de restricción del cromosoma del hospedante de una bacteria deben estar protegidos contra sus propias nucleasas de restricción para evitar una autodegradación suicida. Esto se logra mediante la metilación de uno o más nucleótidos en cada secuencia de nucleótidos que es reconocida por la(s) propia(s) nucleasa(s) de restricción del organismo. La metilación se realiza rápidamente después de la duplicación y es catalizada por metilasas de sitio específico codificadas por el cromosoma del hospedante. Cada nucleasa de restricción rompe una molécula de ADN extraño (una molécula de ADN de otra especie) en un número fijo de fragmentos, el número depende del número de sitios de restricción de la molécula particular de ADN.

Una característica interesante de las endonucleasas de restricción es que por lo común reconocen secuencias de ADN que son *palindromas*, esto es, secuencias de pares de nucleótidos que pueden leerse lo mismo de izquierda a derecha que en sentido inverso a partir de un eje central de simetría. Además, una característica muy útil es que hacen cortes "escalonados" esto es, rompen las dos cadenas de una doble hélice en puntos diferentes. Lo que es más importante, por la naturaleza palindrómica de los sitios de restricción, los cortes escalonados producen segmentos de ADN con extremos complementarios de cadena sencilla. ⁽¹²⁾

Enzima	Organismo	Sitio de reconocimiento
EcoRI	Escherichia coli	G↓AATTC
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens	G↓GATCC
BglII	Bacillus globigii	A↓GATCT
HindIII	Haemophilus influenzae	A↓AGCTT
PstI	Providencia stuartii	CTGC↓G
SalI	Streptomyces albus	G↓TCGAC
SmaI	Serratia marescens	CCC↓GGG
Sau3A	Staphylococcus aureus	↓GATC
Hinfi	Haemophilus influenzae	G↓ANTC
HpaI	Haemophilus parainfluenzae	GTT↓AAC
TaqI	Thermus aquaticus	T↓CGA

Tabla 1. Algunas endonucleasas y sus orígenes. ⁽¹¹⁾

Existen diferencias significativas en los procesos de producción de DNA recombinante entre células procaríóticas y eucarióticas. En general, las células bacterianas expresan grandes concentraciones de la proteína producida y requieren de medios de cultivo con componentes relativamente simples.

Sin embargo, las células procaríóticas no llevan a cabo muchas modificaciones postranscripcionales importantes tales como glicosilación y hasta ahora no ha sido posible expresar proteínas importantes en E. coli. Estas limitaciones han motivado que se requiera el uso de células eucarióticas en muchos casos. Las diferencias de producción entre la célula huésped eucariótica y procaríótica tienen impactos significativos que son reflejados en los requisitos para los procesos de validación, purificación y metodología analítica.

En la figura 2 se ilustra en forma esquemática el proceso que por lo regular sigue un producto obtenido mediante la Biotecnología, con el fin de aprovechar adecuadamente un agente biológico, que puede ser un microorganismo, una planta, un animal o parte de ellos; en primer lugar, se lleva a cabo un proceso de selección.

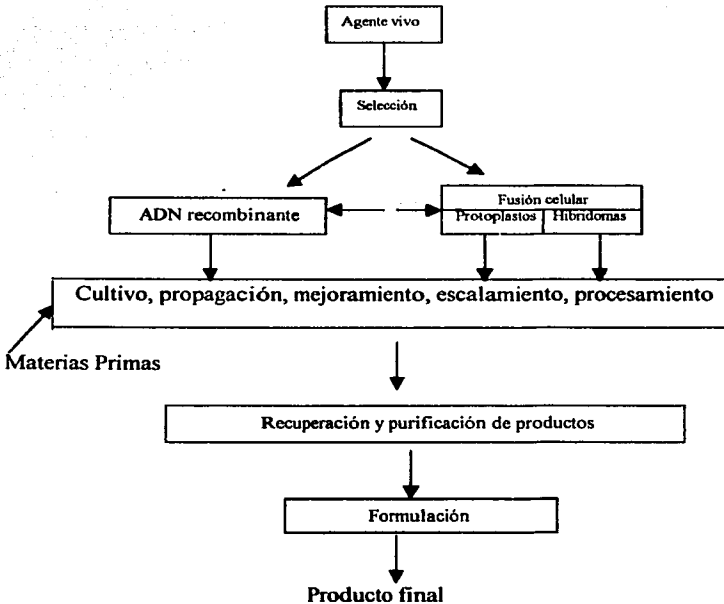


Fig.2. Técnicas básicas de la Biotecnología

Con las técnicas del ADN recombinante es posible en cierta medida “diseñar” genéticamente un organismo y hacerlo producir algo que generalmente no produce, o bien, mejorar algunas de sus capacidades biológicas. La técnica es conceptualmente muy simple. Consiste fundamentalmente en cortar el ADN en fragmentos, aislar selectivamente alguno e insertarlo (clonarlo) en una molécula de ADN, que sirve como portador (vehículo), para finalmente introducirlo (transformar) en otro organismo. El ADN “clonado” puede provenir de algún organismo o bien sintetizarse por medios químicos.

Otra técnica biológica es la fusión de células animales, denominada tecnología del hibridoma. Consiste básicamente en fusionar in vivo células productoras de anticuerpos (linfocitos B) con células cancerosas. Esto da como resultado células híbridas capaces de secretar anticuerpos con las características de la célula madre, pero con capacidad de reproducción prácticamente infinita. Los anticuerpos secretados son homogéneos y de especificidad definida ya que su codificación genética deriva de un solo clon.

En las células vegetales, la fusión de protoplastos que son una parte de la misma, donde se encuentra ADN y ciertos organelos, todos ellos contenidos dentro de una pared celular. Si esa pared se disuelve, el material genético puede interactuar, aún entre diferentes especies o géneros. Después de la fusión, el cultivo se altera de modo tal que la pared se

forma de nuevo y, de ahí, las células fusionadas se dividen para formar un callo, del cual se generan, a su vez, embriones o plántulas que formarán finalmente la nueva planta.

Aunque sin duda, el ADN recombinante, la fusión de protoplastos y la generación de híbridos son las principales técnicas que han revolucionado a la Biotecnología, no son las únicas y no son *per se* suficientes para el desarrollo de técnicas biológicas. El escalamiento de procesos desempeña un papel de vital importancia en el éxito de las Biotecnología, quizás el más claro ejemplo de esto sea la producción de la penicilina. Otros aspectos importantes en las biotecnologías los constituyen las técnicas de recuperación y purificación. En general, los productos biológicos se encuentran muy diluidos y hay que recuperarlos con el fin de poder emplearlos en su uso final. ⁽¹⁾

VECTORES: A partir de los primeros experimentos de clonación de genes y ADN recombinante, a principio de la década de los setentas, los avances tecnológicos en este campo han sido rápidos y continuos. De manera especial, los primeros estudios de clonación de genes se realizaron usando unos cuantos vectores (las moléculas de ADN autoduplicativas en las cuales se insertan moléculas de ADN extraño). En su mayor parte, los vectores usados en estos experimentos iniciales se derivaban ya sea:

- 1) Del cromosoma fago lambda o
- 2) De pequeños plásmidos de *E. coli*.

Sin embargo, se han producido subsecuentemente vectores de clonación especializados para su uso en muchas especies diferentes de bacterias y varios eucariotes sencillos, en particular la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como para su uso en la introducción de genes extraños en células y cromosomas de plantas y animales superiores. Cada sistema consiste en un par de vectores cercanamente relacionados que facilitan la inserción de ADN extraño en el vector en cada una de las dos orientaciones posibles. Esto permite aislar fácilmente cada una de las dos cadenas complementarias de ADN del gen extraño, en grandes cantidades. El primer sistema descrito tiene muchas características que hace fácil clonar una gran variedad de ADN extraños y aislar cadenas sencillas de estos ADN clonados por secuenciación y mutagénesis de sitio específico. El segundo sistema tiene componentes adicionales que permiten que el gen clonado, sea transcrito y traducido *in vitro*. Los últimos vectores son especialmente útiles para identificar y caracterizar productos de genes clonados.

El ADN de cadena sencilla proporciona el sustrato óptimo para experimentos de secuenciación de ADN y se requiere para ciertos protocolos de mutagénesis *in vitro*. Se han construido varios vectores que proporcionan un mecanismo biológico sencillo para la purificación de grandes cantidades de cadenas sencillas de genes clonados. Los más útiles de éstos son los vectores "híbridos" que contienen componentes tanto de plásmidos como de cromosomas de fagos. Estos vectores se duplican en *E. coli* como plásmidos de doble cadena hasta que se proporciona un fago "auxiliar". Después de la adición del fago "auxiliar", dichos vectores cambian al modo de duplicación del fago (duplicación en círculo giratorio como la que se observa en el fago Φ X174) y acomodan o empaquetan cadenas sencillas de ADN en las partículas del fago. El fago "auxiliar", es un mutante que duplica su propio ADN ineficientemente, pero proporciona enzimas de duplicación y proteínas estructurales virales para la producción de moléculas de ADN plasmídicas que son empaquetadas en cubiertas fágicas.

Para comprender estos vectores híbridos fago-plásmido, se debe tener primero un conocimiento básico sobre los fagos filamentosos que contienen ADN de una sola cadena. Los fagos filamentosos de ADN de una sola cadena que mejor se conocen son M13, f1 y fd.

Su material genético es ADN de cadena sencilla, similar al del fago Φ X174. Por otra parte, los genomas de estos fagos se duplican por el mecanismo de círculo giratorio al igual que el ADN de Φ X174. Los viriones (partículas de fago) M13, f1 y fd son filamentos largos, en forma de hilo, en vez de icosaedros (poliedros de 20 lados, que son casi esféricos) como el fago Φ X174. Además, los fagos filamentosos de ADN de una sola cadena infectan las células por adsorción y penetración por medio de pili F; así, estos fagos solo infectan células F⁺ o Hfr y no células F. Finalmente, estos fagos no lisan las células huésped (liberando fagos hijos más ADN bacteriano a partir de las células rotas) como el fago lambda durante el ciclo lítico o el fago T4. En su lugar, los virus descendientes son expulsados a través de las capas de las membranas y de la pared celular sin mayor interferencia con el crecimiento de la célula. Las células infectadas continúan creciendo y expulsando al medio miles de partículas virales hijas, cada una conteniendo un genoma de cadena sencilla. Las partículas virales pueden colectarse entonces a partir de la suspensión del sobrenadante por centrifugación a alta velocidad, y sus moléculas de ADN de una sola cadena pueden aislarse simplemente por extracciones con fenol - cloroformo. La misma cadena de ADN del virus es siempre empacada; se denomina la cadena "+" (su complemento es la cadena "-"). La cadena "+" empacada tiene el mismo "sentido" que el mRNA; sus tripletes de nucleótidos corresponden a los codones del mRNA (ácido ribonucleico mensajero), pero con timina (T) en lugar de uracilo (U).

Los vectores "híbridos" fago - plásmido pUC 118 y pUC119 son un par de vectores que son esencialmente idénticos, excepto que las regiones en las cuales se insertan los ADN's extraños están presentes en direcciones opuestas (volteadas con los extremos invertidos), con respecto al resto de los genes del vector. De este modo, si un ADN extraño se inserta en un sitio de restricción específico en ambos vectores, un vector empaca una cadena del gen y el otro vector empaca la cadena complementaria del gen. Por lo tanto, las dos cadenas del gen pueden aislarse, secuenciarse, sujetarse a mutagénesis de sitio específico, etcétera. Los vectores se designaron pCU por plásmido Universidad de California (donde J. Messing y J. Vieira construyeron los primeros vectores pUC de la serie) y 118 y 119 para distinguirlos de los miembros anteriores pUC de la serie. Los vectores pUC118 y pUC119 difieren de los vectores anteriores de la serie pUC por la adición del origen de duplicación del fago M13. Esto permite a los fagos pUC118 y pUC119 duplicarse ya sea: 1) como un plásmido de doble cadena en ausencia del fago "auxiliar" o 2) como un ADN de una sola cadena que es empacado en cubiertas del fago M13 y expulsado de la célula en presencia del fago "auxiliar". En ausencia del fago "auxiliar", la duplicación es controlada por el origen de replicación del plásmido. Los vectores pUC derivan de un plásmido vector de clonación anterior denominado pBR322 por una serie de modificaciones dirigidas. Los vectores pUC, como el pBR322, contiene un origen de duplicación inicialmente presente en el plásmido ColE1. En presencia del fago "auxiliar", la duplicación del pUC118 y pUC119 es dirigida por el origen de duplicación del fago M13 que es añadido a estos plásmidos. Las características de los vectores de clonación pUC118 y pUC119 son las siguientes:

1. ADN circular cerrado covalentemente, pequeño y superenrollado en forma de hélice; de este modo se aísla y manipula fácilmente in vitro.
2. Portan el gen amp^r, como un marcador seleccionable; así, solo las bacterias que porten un plásmido crecerán en un medio con ampicilina.
3. Alto número de copias, hasta 500 copias por bacteria; de este modo se obtienen grandes rendimientos de ADN a partir de cultivos celulares pequeños.

4. Portan una región de policlonación que contiene varios sitios de corte por enzimas de restricción; así, muchos tipos de fragmentos de restricción pueden insertarse sin modificación.
5. La región de policlonación interrumpe la región codificadora del extremo 5' del gen lac z de E. coli; así, las colonias que albergan plásmidos con ADN extraño insertado pueden distinguirse de las que llevan plásmidos sin ADN insertado por una simple prueba de color.
6. El gen lac z está bajo el control de operador lac; así, los genes insertados en marco (codones en el marco de lectura señalado) pueden expresarse para producir productos de fusión β galactosidasa - gen extraño.
7. Portan un gen de duplicación de plásmido así, la duplicación de ADN del vector produce grandes cantidades de ADN plasmídico de doble cadena en ausencia de fago "auxiliar".
8. Portan un gen de duplicación del fago M13 así, es posible la producción de ADN de cadena sencilla y el empaque de este ADN en cubiertas de fagos en presencia del fago auxiliar.
9. Las regiones de policlonación están presentes en los vectores pUC118 y pUC119 en direcciones opuestas así, si pUC118 empaqueta una cadena de un gen clonado, pUC119 empaqueta la cadena complementaria.

Los distintos miembros de la serie de vectores pUC contienen series diferentes de sitios posibles de rompimientos por enzimas de restricción. Las regiones de policlonación de pUC 118 y pUC 119 contienen 10 sitios de corte por enzimas de restricción. La utilidad de los vectores pUC aumenta enormemente mediante una sencilla prueba de color que permite distinguir entre células que albergan plásmidos con ADN extraño insertado y células que albergan plásmidos sin ADN extraño insertado. La base de esta prueba indicadora de color es la inactivación funcional del segmento 5' del gen lac z presente en el vector por medio de la inserción de ADN extraño en la región de policlonación.

Un procedimiento normal para clonar ADN extraño en vectores pUC implica; 1) ligamiento del ADN extraño de interés con uno de los sitios de corte por enzimas de restricción en la región de policlonación del vector, 2) transformación de las células de una cepa apropiada de E. coli amp^r que lleve el gen lac z Δ M15 con los productos del ligamiento, y 3) sembrar las células transformadas en placas con un medio nutritivo de agar conteniendo Xgal y ampicilina. Sólo las células transformadas que contengan un plásmido pUC serán capaces de crecer en presencia de ampicilina. Una de las ventajas importantes del sistema de vectores de pUC 118 - 119 es que los ADN's extraños pueden ser con frecuencia clonados a la fuerza en la región de policlonación en una orientación predeterminada específica.

Vectores de Transcripción in vitro: Varios bacteriófagos, como los fagos de E. coli T3 y T7 y el fago SP6 de B. subtilis, codifican sus propias ARN polimerasas. El gen del fago que especifica la ARN polimerasa es transcrito por la ARN polimerasa de la célula hospedante, pero luego las "proteínas tardías" virales o los componentes estructurales de los virus hijos se producen a partir de genes que son transcritos por la ARN polimerasa respectiva del fago. Estas ARN polimerasas de fagos solo transcriben genes con secuencias promotoras únicas específicas del fago. No transcriben ningún gen de la bacteria hospedante. Por otra parte, cada ARN polimerasa de fago es muy específica para su propia secuencia promotora, en particular para una secuencia conservada de 18 a 22 pares de nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción 5' GTP. Agregando secuencias promotoras de T3, T7 o SP6 junto a las regiones de policlonación de vectores pUC

118 y pUC 119, es posible construir vectores en los cuales el ADN extraño insertado en la región de policlonación pueda ser transcrito in vitro usando la ARN polimerasa viral para su propia secuencia promotora, solo el gen insertado o el ADN de interés será transcrito in vitro. Ningún otro gen del plásmido estará adyacente a ese promotor fágico particular, de este modo ninguno de los genes del plásmido será transcrito.

Se han construido varios vectores de transcripción in vitro. Muy comúnmente, contienen promotores para dos ARN polimerasas virales diferentes en lados opuestos de la región de policlonación. Estos promotores están orientados a modo de dirigir la transcripción del ADN extraño localizado dentro de la región de policlonación.

Las poderosas herramientas que constituyen las tecnologías del ADN recombinante y la clonación de genes está basada casi exclusivamente en la utilización de la especificidad de la secuencia de las endonucleasas de restricción. En el análisis de genes, cromosomas y genomas de organismos, los biólogos moleculares dependen de su capacidad para cortar moléculas de ADN en las posiciones deseadas con enzimas de restricción. Los engarces (linkers) son moléculas de ADN de doble cadena corta que contienen sitios de rompimiento por enzimas de restricción; se sintetizan a partir de mononucleótidos por medio de métodos sencillos de química orgánica y se puede sintetizar cualquier secuencia. En el mundo de hoy de la Biotecnología, los engarces conteniendo una gran variedad de sitios de restricción simplemente se adquieren en cualquiera de las varias compañías que surten reactivos químicos a los laboratorios de investigación. Otras manipulaciones de los extremos de ADN se realizan con los denominados *adaptadores*, que son oligonucleótidos sintéticos que contienen dos sitios de rompimientos para las enzimas de restricción. Añadiendo adaptadores a los extremos de la secuencia de ADN de interés, se pueden convertir los extremos de una secuencia de rompimiento con enzimas de restricción en otra secuencia de rompimientos con enzimas de restricción. Por ejemplo, los adaptadores EcoRI-HindIII permiten convertir un fragmento de restricción EcoRI en un fragmento de restricción HindIII. Con este desarrollo, las técnicas actuales de la biología molecular permiten la modificación de las moléculas de ADN a voluntad, esto es, añadir o suprimir secuencias.

(12)

5. ANTICUERPOS MONOCLONALES

La tecnología de generación de células secretoras de anticuerpos monoclonales (AcM), desarrollada a partir del reporte original de Köhler y Milstein en 1975, ha revolucionado las posibilidades de uso de las inmunoglobulinas en la investigación básica, las técnicas diagnósticas, la seroterapia y los procesos industriales.

Los anticuerpos monoclonales se emplean en la purificación y caracterización de moléculas diversas, la manipulación de la fisiología y bioquímica celulares, la definición de fenotipos y subpoblaciones celulares, el tipaje de antígenos de tejido y de grupo sanguíneo, la detección de los niveles circulantes de hormonas y otros factores séricos, la demostración de daños tisulares, la detección de tóxicos, mutágenos y drogas, el estudio de la respuesta inmune y en apoyo a la fabricación de vacunas, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, parasitarias y de tumores malignos, la facilitación de trasplantes de órganos y tejidos, el diagnóstico agrícola y veterinario, y la purificación de fármacos y vacunas. Los anticuerpos monoclonales también se prueban para terapia de los tumores y de procesos sépticos e inflamatorios, y se evalúan como catalizadores de reacciones químicas y bioquímicas. (13)

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs), son moléculas de proteínas producidas por células especializadas en los vertebrados superiores. Se producen como repuesta a moléculas que son reconocidas por los organismos como extrañas. Su papel consiste en enlazar tales moléculas (antígenos), su enlace inicial activa varios mecanismos que logran la destrucción de la molécula extraña y la elimina del sistema.

Las inmunoglobulinas se dividen en cinco clases, sin embargo, comparten algunas característica estructurales: la estructura básica de las Igs es un multímero que contiene dos tipos de cadenas de polipéptidos una pesada y otra ligera. Estas se combinan en la fórmula general (H_2L_2), y en todos los anticuerpos las cadenas pesadas y todas las cadenas ligeras son idénticas. La estructura de la Inmunoglobulina G (IgG), que es la Ig comúnmente encontrada, se muestra en la **figura 3**. Hay dos sitios idénticos de enlace a antígenos en el grupo amino terminal de la molécula, la especificidad del sitio de enlace deriva de la secuencia de aminoácidos de ambas cadenas ligera y pesada. Las secuencias de aminoácidos que forman el sitio de enlace para el antígeno son altamente variables según los diferentes anticuerpos, mientras que el resto de la molécula tiene una secuencia de aminoácidos que es constante en todos los anticuerpos de una clase dada (o subclase, en el caso de IgG). El carboxilo terminal de la mitad de la molécula es el responsable para la activación de varios sistemas efectores biológicos para la eliminación o destrucción del antígeno. Hay varias subclases de IgG con diferentes propiedades biológicas que son derivadas de diferentes secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada.

La molécula de la inmunoglobulina G (IgG), está compuesta por dos cadenas idénticas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas. La asociación entre estas cadenas se mantiene por puentes disulfuros, cuya posición está indicada esquemáticamente, y por fuerzas no covalentes. Las regiones del carboxilo terminal de ambas cadenas pesadas y ligeras (C_H y C_L) tienen secuencias de aminoácidos relativamente constantes, cuando se comparan las IgGs de algunas especies y subclases. Tres regiones de la secuencia del extremo variable están indicadas por barras negras en las regiones amino terminal (V_H y V_L) del sitio de enlace para los antígenos. Dos enzimas proteolíticas, la pepsina y papaina, rompen la molécula para producir ambos fragmentos monocovalentes o bivalentes de enlace para el antígeno.

Las inmunoglobulinas son sintetizadas por células especializadas llamadas linfocitos B. Estos son producidos en la médula ósea durante toda la vida del animal, y circulan en la sangre y en la linfa. Cada célula B está programada para sintetizar la inmunoglobulina (Ig) de una sola secuencia de aminoácidos, y por lo tanto un solo enlace específico para el antígeno. Esto está determinado por variaciones al azar introducidas en la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal contribuyendo al sitio de enlace con el antígeno, la llamada región hipervariable o región determinante complementaria (CDRs), estas variaciones ocurren durante la maduración de cada célula B. Esta célula Ig específica es expresada en la membrana de los linfocitos B.

La mayoría de las Igs están destinadas a nunca encontrar un antígeno al cual se puedan enlazar, y los linfocitos que lo hacen eventualmente morirán y se perderán. Cuando ocurre algún encuentro, con el antígeno, actúa como un accionador, (con asistencia de un segundo tipo de linfocitos, las células T) que causa que se divida el linfocito B y se secrete el anticuerpo a los fluidos del cuerpo.

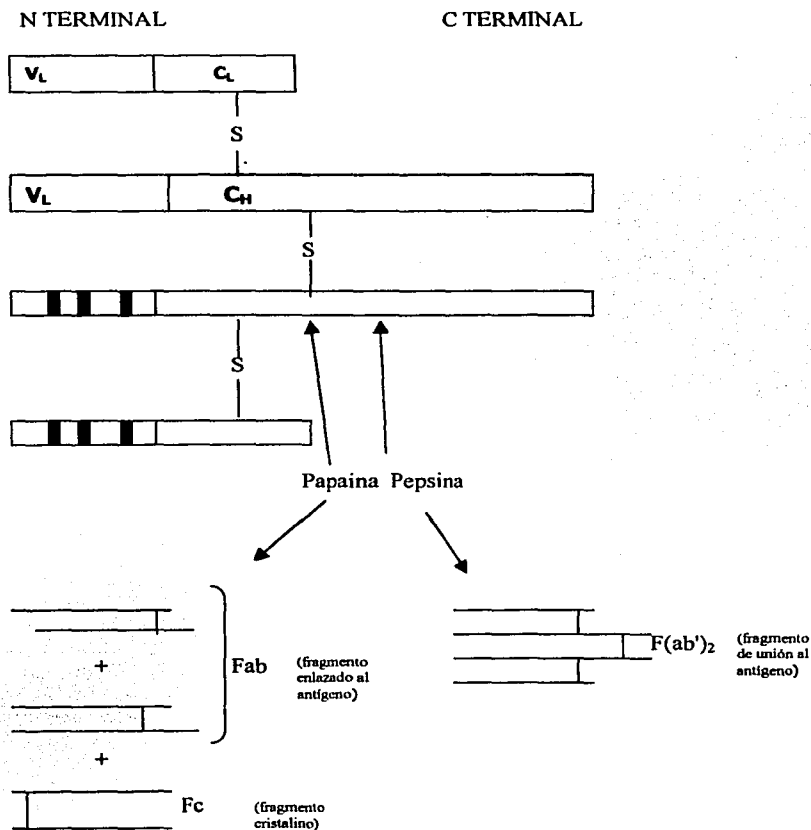


Fig. 3 Estructura de la inmunoglobulina G.

Todas las células hijas formarán anticuerpos idénticos que los hechos por la célula original paterna y el resultado es un aumento en la concentración de la inmunoglobulina específica, permitiendo finalmente la eliminación del antígeno. Este proceso de selección clonal se ilustra en el esquema de la figura 4.

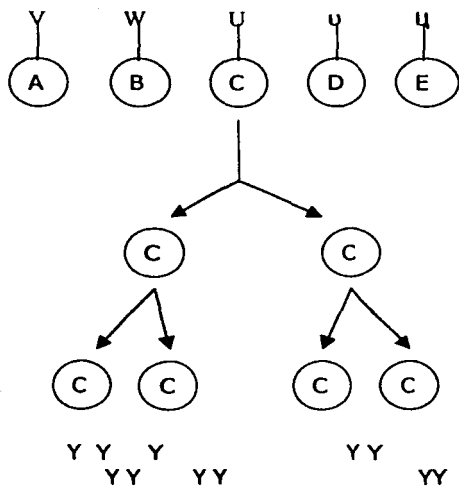


Fig. 4. Teoría de la selección clonal

Los anticuerpos en el suero de animales deliberadamente expuestos a antígenos extraños (inmunizados), son una mezcla compleja de muchas especificidades diferentes, y solo el 10% de la Ig enlazará el antígeno de interés. Este 10% constituirá por sí mismo un rango de enlaces afines al antígeno, clases de anticuerpos y sitios de combinación específicos, y esta heterogeneidad limita la utilidad de tal preparación.⁽¹⁰⁾

Los anticuerpos que son producidos en animales inmunizados están formados de muchos clones diferentes de linfocitos B; por lo tanto, se denominan anticuerpos policlonales. Porque la colecta de sangre de estos animales, por definición, resulta en mezclas de anticuerpos policlonales, el suero tiene múltiples epitopos (sitios de reconocimiento) con una extensa variedad de constantes de enlace (avidez) que además varía de lote a lote.

La técnica de los anticuerpos monoclonales (basada en que cada linfocito B sintetiza y expresa sólo un anticuerpo específico) supera todas estas limitaciones y permite la preparación de cantidades ilimitadas de anticuerpos homogéneos. Los anticuerpos que son producidos por líneas celulares inmortalizadas (hibridomas) derivados de una sola célula B, están referidos como anticuerpos monoclonales. La colecta de estos cultivos, conduce a un anticuerpo con un epitopo de reconocimiento específico y con una constante de enlace homogénea. Los linfocitos B tienen una duración de vida finita en los cultivos y tienen que ser inmortalizados para que puedan continuar la producción de anticuerpos monoclonales.⁽⁹⁾

Una parte esencial de la técnica es inmortalizar la producción de células maduras de anticuerpos (células del plasma), para que puedan proliferar indefinidamente, es decir alcanzar la producción de líneas celulares híbridas estables. Las células hijas de una sola célula secretora de anticuerpos, siendo genéticamente idéntica con el linfocito B paterno, sintetizará y secretará inmunoglobulinas exactamente de la misma especificidad. Estas células inmortalizadas pueden ser clonadas para producir líneas celulares (hibridomas) que producen anticuerpos homogéneos o monoclonales.⁽¹⁰⁾

Los anticuerpos se producen por diferenciación de los linfocitos B. Cada linfocito produce un anticuerpo de especificidad definida (i.e., la molécula de anticuerpo reconoce un sitio específico o epitopo en un antígeno).

La posibilidad de obtener preparaciones específicas, repetibles, e inagotables de anticuerpos con funciones predefinidas (anticuerpos monoclonales), se hizo realidad entre 1974 y 1975, como resultado de los experimentos realizados en Cambridge, Reino Unido, por George Köhler y Cesar Milstein, figura 5. Como en otros muchos casos, este descubrimiento de trascendental impacto práctico derivó de un estudio más básico. Köhler y Milstein investigaban los mecanismos del control genético de la síntesis de inmunoglobulinas y pensaron que una forma experimental de comprobar sus ideas era realizar fusiones entre células productoras de anticuerpos diferentes y determinar las restricciones existentes en los híbridos para la asociación de las cadenas ligeras y pesadas de diferentes orígenes.

Estos investigadores aprovecharon la existencia de mielomas murinos (ratones) inducidos mediante carcinogénesis química, y asequibles en forma de tumores transplantables y líneas de cultivo, así como la posibilidad ya demostrada de que era técnicamente posible obtener híbridos viables luego de la fusión de células en cultivo. En sus experimentos, Köhler y Milstein realizaron fusiones entre linfocitos provenientes de ratones BALB/c inmunizados con antígenos definidos y mielomas de la estirpe MOPC21, cuyas inmunoglobulinas aberrantes eran ya bien conocidas. Estos experimentos demostraron que era posible generar líneas híbridas (hibridomas) de crecimiento continuo en cultivos y capaces de secretar una variedad de anticuerpos, resultado de las combinaciones entre las cadenas pesadas y ligeras codificadas por cada célula parental. Parte de estas combinaciones eran aquellas correspondientes a anticuerpos reactivos contra el antígeno empleado para inmunizar los ratones. Los resultados indicaban también que si la fusión se producía entre linfocitos inmunes y mielomas mutantes (que hubieran perdido la capacidad de secretar sus propias inmunoglobulinas aberrantes) la única molécula producida por el hibridoma resultante sería aquella codificada por el linfocito parental.

Los hibridomas no solo secretan los anticuerpos codificados por el genoma del linfocito parental. También conservan varias de las características propias de estos mielomas.

- a) Crecen indefinidamente *in vitro*, soportando la congelación indefinida y la clonación (crecimiento a partir de una célula inicial). Esta última es esencial para garantizar el origen monoclonal de las preparaciones.
- b) Inducen tumores ascíticos cuando son inoculados a animales consanguíneos como los que les dieron origen, lo cual resulta de gran utilidad para los efectos de la producción.

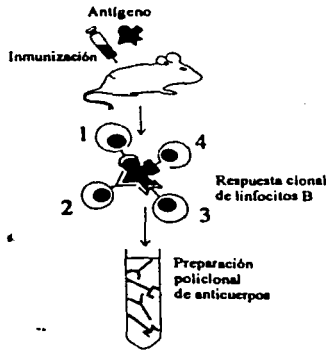


Fig 5. Producción de anticuerpos monoclonales. Las células esplénicas del ratón inmunizado se fusionan con células de mielomas adaptadas a cultivo. Los hibridomas resultantes se clonan, separándose de esta forma líneas celulares que secretan al sobrenadante del cultivo anticuerpos monoclonales de subclase, afinidad y especificidad idéntica.

Gracias a las características de la técnica de generación de hibridomas, los anticuerpos monoclonales resultantes no solo pueden ser seleccionados para su especificidad, sino también para aquellas funciones efectoras deseadas, o propiedades útiles para el investigador (isotipo, afinidad, capacidad de aglutinación, neutralización, captura, etc.).

Los anticuerpos monoclonales producidos por fusión celular de linfocitos y mielomas, han permitido obtener la especificidad, reproducibilidad e inagotabilidad imposibles de lograr por técnicas convencionales de inmunización y preparación de antiseros, y los han convertido rápidamente en uno de los elementos básicos para el desarrollo de la biomedicina moderna. Recientemente, se han generado anticuerpos monoclonales que catalizan reacciones enzimáticas debido a que identifican y estabilizan los productos intermedios de estas reacciones.

5.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS

El interés por la producción de anticuerpos monoclonales humanos tiene al menos tres motivaciones principales:

- a) La conveniencia de emplear inmunoglobulinas monoclonales en la terapéutica de varias enfermedades y disminuir los problemas derivados del uso de anticuerpos monoclonales murinos para estos fines.

- b) Las limitaciones en la producción de anticuerpos monoclonales de rata o ratón para algunos antígenos contra los cuales estas especies no evidencian una respuesta inmune humoral.
- c) La necesidad de conocer en mayor detalle los mecanismos de la respuesta humoral humana y, específicamente, su relevancia en el caso del cáncer, las enfermedades autoinmunes, los procesos alérgicos y las enfermedades infecciosas.

5.2 MODIFICACION DE ANTICUERPOS POR INGENIERIA GENETICA

La extensa experiencia acumulada en los últimos 10 años acerca de la estructura y secuencia de las Igs y sus genes, y el avance impetuoso de la ingeniería genética (en especial por el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa PCR), han abierto un campo tal de posibilidades para la modificación racional de los anticuerpos, que amenazan con sobrepasar rápidamente el impacto producido en su momento por la rápida difusión de tecnología de fusión para generar hibridomas.

Entre los ejemplos de más avanzada aplicación de estas nuevas tecnologías está la producción de anticuerpos quiméricos murino/humano. En estas construcciones se conservan las regiones variables del anticuerpo original de ratón o rata, o incluso solo la región determinante complementaria (CDR) y unos pocos residuos adicionales, transplantados sobre un "contexto" totalmente humano (*framework* y/o regiones constantes). De esta forma se dota al anticuerpo de las funciones efectoras propias de las Igs humanas, conservándose la especificidad del anticuerpo monoclonal original de origen murino, aumentándose la eficacia terapéutica. Existe un número creciente de Igs quiméricas en ensayo preclínico o clínico para problemas tan diversos como el tratamiento de la sepsis y los procesos inflamatorios, la terapéutica de los tumores, y el control del rechazo al trasplante de órganos y tejidos. En la **Figura 6** se muestra la producción de fragmentos de anticuerpos empleando microorganismos. La producción constitutiva de anticuerpos humanos en animales y plantas transgénicos, el desarrollo de animales quiméricos con respuestas inmunológicas humorales humanas y la posibilidad de producir cualquier anticuerpo humano deseado a partir de "librerías" génicas únicas, son algunas de las realidades y perspectivas de este nuevo campo. Entre los ejemplos de más avanzada aplicación está la producción de anticuerpos quiméricos murino/humano. Gracias al clonaje y manipulación de los genes de las regiones variables (V) y constantes (C) es posible modificar el anticuerpo de ratón (extremo izquierdo superior) a un anticuerpo quimérico (regiones V de ratón y C humanas), o "humanizado" (regiones CDR de ratón y FR y C humanas). En estos dos casos se emplean como hospederos células superiores para garantizar la glicosidación de la molécula. Los genes que codifican para la molécula original del anticuerpo pueden ser también para producir fragmentos Fab, Fv y Fv de cadena simple (scFv; donde se unen las regiones V mediante un linker artificial). La fusión de estos genes con otros para obtener toxinas, factores de crecimiento, citocinas, modificadores de la respuesta biológica, o simplemente grupos que permitan la derivatización, purificación o modificación posterior de la molécula, son variantes muy empleadas en la actualidad. La producción de pequeñas moléculas que no precisan glicosidación pueden hacerse alternativamente en bacterias o levaduras. En la parte baja de la figura, se esquematiza como en un futuro, a partir de la secuencia y estructuras de los CDR, se espera derivar una generación de moléculas sintéticas con capacidad de interactuar con el antígeno.

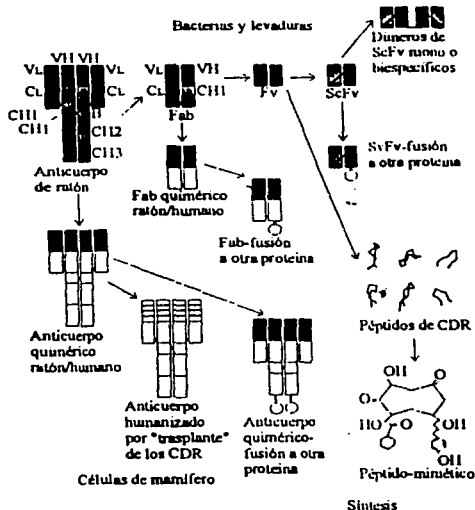


Figura 6: Ejemplos de modificaciones posibles que se realizan en un anticuerpo mediante técnicas de ingeniería genética.

Otro producto atractivo de esta tecnología son los fragmentos de anticuerpos producidos en microorganismos. Desde hace años se han venido empleando fragmentos de anticuerpos tipo Fab en el radioinmuno diagnóstico *in vivo* de tumores y otros tipos de lesiones. No obstante, la producción de estos reactivos a partir de la digestión bioquímica de las Igs es un proceso difícil de escalar con la calidad requerida para el empleo de los fragmentos en el humano.

HIBRIDOMAS POR FUSION CELULAR

La generación de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales es una tecnología "noble" que funciona en laboratorios con muy diverso equipamiento, condiciones y experiencia, siempre que los operadores se ajusten a un rigor experimental elemental. **Figura 7**

La misma consta de una sucesión de etapas:

1. Selección de la cepa y condiciones del ratón a inmunizar.
2. Definición del esquema de inmunización.
3. Desarrollo de un método analítico adecuado para el tamizaje de anticuerpos específicos.
4. Inmunización, titulación y selección de los animales donantes.
5. Preparación del mieloma parental.
6. Fusión.

7. Tamizaje de los anticuerpos y selección de los hibridomas.
8. Clonación de hibridomas. Retamizaje. Cultivo y congelación de clones.
9. Caracterización inicial de los anticuerpos
10. Producción y purificación de anticuerpos para caracterización y aplicación.

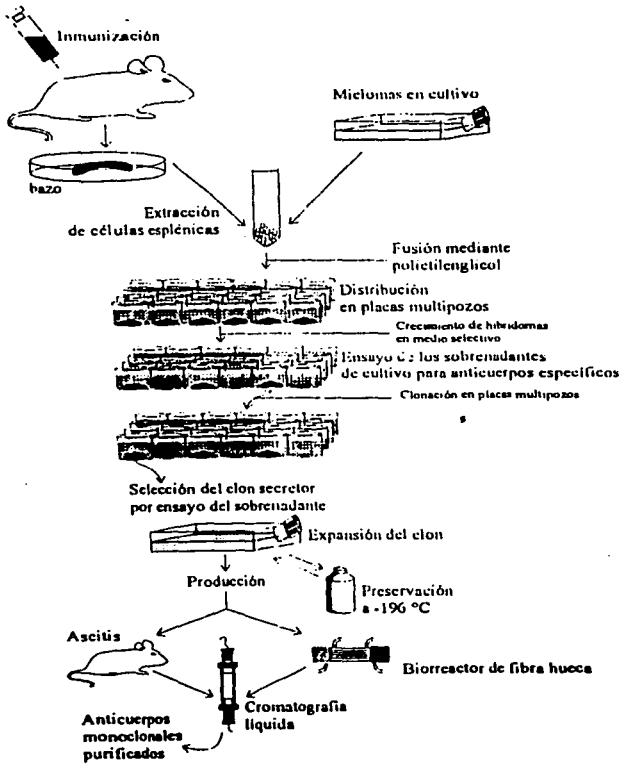


Figura 7: Producción de anticuerpos monoclonales en ratón.

Las células esplénicas extraídas del bazo del ratón inmunizado se fusionan mediante polietilenglicol con los mielomas provenientes de cultivo y siembran en placas multipozos, con medio de cultivo selectivo. A los 7 – 10 días de realizada la fusión solo los hibridomas han proliferado y cubierto parte de la superficie de los pozos, pueden ensayarse sus

sobrenadantes para detectar la presencia de anticuerpos específicos. Los hibridomas específicos identificados se clonan en placas multipozos y los cultivos resultantes se reanlizan para la secreción de anticuerpos específicos. Los clones específicos se expanden en frascos de cultivo y se conservan en nitrógeno líquido. La producción de los anticuerpos puede realizarse a partir de los sobrenadantes del cultivo de hibridomas en los biorreactores, o del fluido ascítico derivado del crecimiento tumoral de los hibridomas en ratones consanguíneos. En cualquiera de estos casos se puede realizar una purificación final de los anticuerpos mediante cromatografía.

5.4 CULTIVO DE MIELOMAS E HIBRIDOMAS

Las líneas de mielomas e hibridomas en cultivo están constituidas por células de linfoblastoides, con características particulares, entre las que están:

- a) Su carácter "inmortal" *in vitro*, que les permite proliferar indefinidamente, sobre la base de un adecuado suplemento de los factores necesarios en el medio de cultivo.
- b) Su capacidad para crecer en suspensión, sin necesidad de "anclaje" a un sustrato sólido para proliferar.
- c) La posibilidad de alcanzar altas densidades celulares en cultivo (alrededor de $5 \cdot 10^5$ células/ml en cultivo estacionario, $1-2 \cdot 10^6$ células/ml en frascos *spinner* y biorreactores, y hasta 10^8 células/ml en fibra hueca).
- d) Una complejidad mínima de los medios de cultivo que requieren.

Los mielomas e hibridomas son líneas celulares relativamente sencillas de mantener. La existencia de una función asociada en estos últimos (la producción de un anticuerpo específico) hace necesario que se propicien condiciones de cultivo tales que eviten un enriquecimiento de la población con "variantes" de más rápido crecimiento. Esta propiedad viene frecuentemente asociada a la pérdida de la alta secreción de las Igs, al ser estas dos características "excluyentes" en las células B normales. La inestabilidad intrínseca de los hibridomas se debe tanto a su carácter tumoral, como al propio hecho de que son células híbridas.

Por todo ello los hibridomas deben ser cultivados atendiendo a los siguientes principios:

1. Mantener las poblaciones en crecimiento exponencial (entre las $1 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^5$ células/ml de medio), reduciendo la posibilidad de situaciones de muy altas densidades, donde algunas células puedan tener ventaja.
2. Trabajar los cultivos lo más cercanos posibles de su origen, lo que se logra con un adecuado stock de células viables criopreservadas.
3. Realizar clonajes periódicos y reanálisis de la producción de anticuerpos (para los hibridomas), o para las propiedades necesarias en el mieloma.
4. Renovar periódicamente el frasco donde se mantienen las células, con el fin de reducir las interacciones con la matriz extracelular producidas por las propias células (a pesar de lo que los mielomas e hibridomas NO son dependientes de anclaje a un sustrato, las células se adhieren a la superficie de los frascos en la mayoría de las sublíneas existentes).

Los mielomas e hibridomas proliferan *in vitro* describiendo una clásica cinética exponencial inicial, seguida de una meseta que corresponde a las densidades máximas posibles en el volumen dado de medio de cultivo, para comenzar entonces a morir de manera exponencial ante el agotamiento del medio.

5.5 CARACTERIZACIÓN BÁSICA DEL HIBRIDOMA

Como parte de la caracterización básica *in vitro* de un hibridoma deben realizarse los siguientes estudios:

- a) Determinación del tiempo de doblaje: El tiempo de duplicación o Doblaje (Td) es un parámetro sencillo muy utilizado en cultivo para caracterizar una línea celular. Se define como el tiempo necesario para que una población celular duplique su número de células. Este parámetro es diferente al tiempo de ciclo celular (Tc), que representa el tiempo que toma a cada célula duplicarse. A medida que la fracción de células en reproducción de una población se acerca a 1, Td se asemeja más a Tc.
- b) Estabilidad: Se denomina estabilidad a la capacidad del hibridoma de mantener sus niveles de producción de inmunoglobulinas específicas en condiciones de cultivo continuo. La afectación de este parámetro está muy relacionada con la aparición de variantes no productoras en la población del cultivo. Es por tanto adecuado establecer cultivos continuos a los que, con frecuencia mensual, se les mida en condiciones semejantes la concentración de anticuerpos monoclonales, y se clonen para estimar el porcentaje de subclones positivos y negativos.

Otros elementos adicionales de caracterización *in vitro* pueden ser: (1) el cariotipo de la línea y (2) la presencia de retrovirus endógenos por microscopía electrónica de transmisión.

- c) Medios de cultivo: Los medios de cultivo sintéticos tienen como componentes básicos:
 1. Una mezcla de sales inorgánicas (fisiológicas) cuyo objetivo es mantener el pH, la osmolaridad y una adecuada concentración de iones necesarios en el metabolismo. En el caso de los hibridomas se acostumbra añadir algún tampón orgánico (ejemplo: HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinactano sulfónico), especialmente para la fusión y crecimiento inicial en las placas multipozo, con vistas a amortiguar las variaciones de pH que se producen necesariamente durante las inspecciones de las mismas.
 2. Una o varias fuentes de energía, habitualmente glucosa. Por sus característica metabólicas, los hibridomas son grandes consumidores de estas fuentes de energía.
 3. Un repertorio de aminoácidos, entre los que se encuentran los que habitualmente son esenciales para las células en el cultivo. La adición de L-glutamina por encima del contenido base del medio es necesaria para el cultivo de hibridomas, debido a que este aminoácido participa en la síntesis de los ácidos nucleicos.
 4. Un repertorio de vitaminas (coenzimas) específicamente del grupo B, para favorecer el tiempo de duplicación.

Es necesario, además, añadir una fuente de factores de crecimiento. La fuente de factores comúnmente empleada es el suero animal, aunque este contiene muchos otros elementos que parecen ser también necesarios, a medida que los medios sintéticos sean más simples. Cuando se han logrado identificar los factores necesarios para el crecimiento de una línea celular, éstos pueden añadirse directamente al medio y se evita el uso del suero.

Las células de cultivo requieren también elementos trazas y otras moléculas, que intervienen en los procesos de detoxificación y metabolismo aeróbico y en la estabilización de las membranas celulares.

En la actualidad existen medios "definidos" (de composición totalmente conocida) comerciales, libres o no de proteínas para el cultivo de hibridomas. Por ello es común que se sigan empleando en las etapas iniciales de generación de los hibridomas los medios base adicionado con suero fetal de bovino, suero de calostros de

bovino, o sueros donantes de bovinos siempre analizados con anterioridad para garantizar mejores condiciones de crecimiento de los clones híbridos.

- d) Escalamiento del cultivo de hibridomas: La producción de anticuerpos monoclonales se puede hacer de dos formas básicas: *in vitro*, a partir del sobrenadante de los cultivos de los hibridomas, e *in vivo*, a partir del crecimiento de los hibridomas en forma de tumores ascíticos en animales inmunocompatibles. En el primer caso, las concentraciones de anticuerpos monoclonales en el sobrenadante de los cultivos convencionales (estacionarios y en frascos *spinner*) son bajas, cuando se comparan mililitro a mililitro con el ascitis, alcanzando las primeras entre los 10 y 100 microgramos/mililitro, respecto a entre 1 y 10 microgramos/mililitro en el ascitis (con unos 5-10 mililitros por ratón). Es por ello que el escalado de la producción de anticuerpos monoclonales en ratones es muy conveniente para propósitos de diagnóstico *in vitro*, donde la cantidad de anticuerpos monoclonales por prueba es habitualmente discreta, y no existen restricciones mayores relativas al perfil higiénico sanitario del animal.

La producción en animales cobra otra dimensión cuantitativa y cualitativa cuando se trata de anticuerpos monoclonales para el uso humano, y aquellos empleados en la purificación de inyectables (farmacéuticos o vacunas). La producción de cientos de gramos (y kilogramos) de anticuerpos monoclonales al año para estos fines requiere de instalaciones adecuadas al número de animales (pueden llegar a estar en el orden de las decenas y cientos de miles por año), y animales de una alta calidad.

Existen regulaciones internacionales muy estrictas para la producción de anticuerpos monoclonales de uso humano (Instituto Nacional de Salud de E.U.). En el caso de emplear ratones, se presta una especial atención a la contaminación con un conjunto de 16 virus murinos y con micoplasma. La detección de alguno de ellos excluye automáticamente el uso de ascitis para fabricar cualquier producto de uso humano. Los animales deben ser por tanto "libres de patógenos específicos" y las instalaciones para su mantenimiento y para el procesamiento inicial y posterior del ascitis deben garantizar la exclusión de cualquier riesgo de contaminación.

Algunos países han llegado al extremo de excluir toda posibilidad de empleo de animales para la producción de anticuerpos monoclonales en los casos de productos para diagnóstico.

La alternativa al ascitis es el sobrenadante de los cultivos celulares. Pero es comprensible que con las técnicas convencionales de cultivo es imposible llegar a los niveles productivos necesarios. Para el escalamiento de las producciones en cultivo se han producido dos avances tecnológicos muy importantes:

1. Se han diseñado sistemas de cultivos a gran escala (biorreactores), con un grado de automatización y control considerable para la optimización de los parámetros que determinan el crecimiento celular, con el fin de propiciar no solo un mayor volumen de crudo, sino también un incremento en las concentraciones de anticuerpos monoclonales por volumen de cultivo.
2. Se han fabricado medios de cultivo que reducen o eliminan la necesidad del uso de suero como aditivo, y que facilitan el proceso de purificación, al reducir el nivel de las otras proteínas contaminantes.

Los biorreactores son ya empleados mundialmente para la producción a gran escala de anticuerpos monoclonales terapéuticos. Estos sistemas se clasifican como homogéneos, i.e., donde las células crecen suspendidas en el medio, en el mismo "compartimento" donde se

encuentra el producto secretado (los anticuerpos), y los heterogéneos (donde las células han sido "separadas" del grueso del volumen del medio, y crecen atrapadas o adheridas).

Entre los primeros tenemos los biorreactores de burbujeo y de agitación constante, derivados de los clásicos fermentadores para microorganismos, donde las células se encuentran en suspensión formando agregados y en movimiento constante gracias a impelentes mecánicos o efectos del burbujeo de gases. Existen diferentes variantes de sistemas heterogéneos por un lado están los biorreactores de células encapsuladas en microperlas de agarosa, otros geles, o en partículas de matrices orgánicas, y por otro, aquellos en que las células son atrapadas en "cartuchos" (cerámicas o fibra hueca). En estos ejemplos las densidades celulares alcanzadas son mayores y por tanto superiores las concentraciones de anticuerpos monoclonales en el medio. Un caso especial lo constituyen los biorreactores de fibra hueca. Esta tecnología simula la red capilar existente en los tejidos del organismo, con fibras semipermeables de muy pequeño diámetro. El medio de cultivo sin factores de crecimiento circula por la fibra (espacio intracapilar), y las células se encuentran en el exterior de la misma en un segundo compartimento del "cartucho" (espacio extracapilar). Los biorreactores de fibra hueca, por sus ventajas operativas, fácil instalación y calidad del producto obtenido, están en franca difusión en el mercado.

Por último, la producción en cultivo no está exenta de un riguroso control de calidad especialmente cuando los anticuerpos monoclonales se van a emplear en el hombre o en el proceso de producción de inyectables. Los hibridomas de ratón poseen retrovirus endógenos que deben ser eliminados durante el procesamiento de los crudos hacia el producto final. También es necesario verificar que el proceso de purificación elimina la posibilidad de agentes adventicios residuales. Por último, en el caso de que se empleen sueros bovinos como aditivos del medio, estos deben estar certificados para la ausencia de varios virus de esta especie. ⁽¹³⁾

En la actualidad, el procedimiento más común para obtener hibridomas, es la fusión químicamente inducida de células del bazo de ratón con células de mieloma de ratón. La célula hibridoma resultante, ratón-ratón, hereda de la célula de mieloma la capacidad para replicarse continuamente en el cultivo y hereda de las células del bazo la habilidad para producir el anticuerpo monoclonal. El banco de células del hibridoma puede ser usado para suministrar los anticuerpos monoclonales tanto in vivo (por ejemplo inyección en ratón y subsecuente colección de fluidos ascíticos) como in vitro (técnicas convencionales de cultivos de células).

Los avances recientes en genética molecular han llevado al desarrollo de transfectomas y los esquemas basados en la producción de E. coli y bacteriófagos pueden ofrecer ventajas para futuras producciones de anticuerpos monoclonales.

Las consideraciones que se establecen para la validación de procesos de purificación y los procedimientos analíticos para los anticuerpos monoclonales son conceptualmente similares a los que se establecen para productos del DNA recombinante. Esto se debe a que ambos tipos de productos son proteínas y además requieren de procedimientos similares de manejo y ensayo.

Ya que los anticuerpos monoclonales son producto de líneas celulares inmortalizadas, se debe garantizar que la contaminación potencial con ácido nucleico viral sea efectivamente eliminada o sea inactivada por los procesos de manufactura, exigencia común para productos recombinantes de líneas celulares continuas.

La aplicación comercial de los anticuerpos monoclonales incluyen tanto su uso en el diagnóstico como su uso terapéutico. En algunos casos, los anticuerpos monoclonales están acoplados a otras sustancias (por ejemplo un agente oncológico, toxinas, radionucleótidos), siendo el producto final de interés, el anticuerpo conjugado. En este caso, ambos el

anticuerpo intermedio y el producto final requieren de procesos de desarrollo y caracterización analítica perfectamente sustentados. ⁽⁹⁾

6. CARACTERÍSTICAS DE LOS PROCESOS DE PRODUCCIÓN

La principal diferencia entre los productos derivados de la Biotecnología y otros productos farmacéuticos son los medios de producción utilizados para generar el producto. La Biotecnología hace uso de organismos vivos genéticamente modificados para producir proteínas o producir péptidos. Esta aseveración se cumple tanto para los productos derivados de la tecnología del DNA recombinante como para los anticuerpos monoclonales. Los productos derivados de la biotecnología deben ser diferenciados de las proteínas y/o péptidos que han sido obtenidos por aislamiento de fuentes naturales tales como: plasma, suero o tejido, o por síntesis química.

Después de los procesos de purificación, los productos derivados de la Biotecnología no deben ser significativamente diferentes de otras proteínas farmacéuticas. Así, los requerimientos básicos para la validación de procesos, el control ambiental, la manufactura aséptica y los sistemas de control y aseguramiento de la calidad son fundamentalmente los mismos para todos los productos farmacéuticos. No obstante, la complejidad de estos sistemas es a menudo mayor para los productos derivados de la Biotecnología porque la producción de tales biomoléculas generalmente requiere procesos de propagación de células altamente desarrollados, métodos complicados de purificación y controles analíticos para asegurar su identidad, homogeneidad, la consistencia lote a lote y la seguridad.

6.1 PRODUCCIÓN DE ADN RECOMBINANTE

Los productos del DNA recombinante son actualmente producidos en sistemas procarióticos (bacterias) o eucarióticos (ejemplo: levaduras, cultivo de células de mamíferos). La elección del organismo de producción es generalmente una función directa de la complejidad molecular de la proteína que se desea producir, así como del costo y eficiencia de la fermentación o de los procesos de cultivos celulares. Los primeros productos derivados de la Biotecnología fueron producidos en *E. coli* ya que se basaron en el mayor conocimiento de la biología molecular de esta bacteria. Recientemente, se ha vuelto común el uso en escala industrial de cultivos celulares eucarióticos.

6.1.1 PRODUCCIÓN PROCARIÓTICA (BACTERIAS)

La producción bacteriana de productos derivados de la Biotecnología ofrece un gran número de ventajas así como ciertas desventajas. Como previamente se indicó, la biología de la bacteria, *E. coli*, así como su seguridad y su efectividad como organismo huésped para la producción ha sido bien documentada. Así, ha sido posible y a menudo más fácil la expresión de una nueva proteína en *E. coli* que en otros sistemas de expresión, teóricamente más adecuados. No obstante, esta ventaja, el hecho que *E. coli* generalmente produce proteínas en un estado químicamente reducido puede ser un inconveniente, ya que para tener los doblamientos apropiados, estas proteínas requieren la producción de enlaces

disulfuros intramoleculares por oxidación. Una segunda desventaja es que todas las proteínas de *E. coli* inician sus secuencias con un residuo de N-formilmetionina que no siempre puede ser removido por los sistemas proteolíticos de *E. coli* así es probable que se produzca un derivado metionil de la proteína natural deseada. Una tercera desventaja de la expresión en *E. coli*, es el potencial de la misma, para producir productos de degradación debido a trazas de impurezas de proteasas. Una cuarta desventaja, es el requerimiento de remoción de endotoxinas durante la purificación. Aún con estas limitaciones, la facilidad del uso de *E. coli* y su alta expresión para producir mayor cantidad de proteína ha dado como resultado el uso preferencial continuo de esta bacteria, siempre que sea factible.

Como se ha descrito, el elemento clave en la tecnología del DNA recombinante, es el plásmido recombinante, que contiene el gen que codifica para la proteína de interés. Los plásmidos son segmentos extracromosomales simples y pequeños de DNA bacteriano, que son aislados de una bacteria y se autorreplican. La tecnología básica involucra la ruptura enzimática específica de un plásmido usando endonucleasas, seguida de la inserción de una nueva molécula de DNA que contiene el gen de interés. El plásmido recombinante es considerado la materia prima cruda de la tecnología del DNA. El plásmido recombinante es introducido dentro del organismo huésped en un proceso llamado TRANSFORMACIÓN, donde éste pasa la nueva información genética y resulta en la producción de la proteína (producto). El crecimiento a escala industrial de organismos recombinantes se puede realizar en fermentadores comerciales en escala de más de 100,000 litros, haciendo de este tipo de producción extremadamente económico. Hay sin embargo, algunos casos en que se complican los sistemas de fermentación con *E. coli* ya que la proteína expresada puede causar toxicidad celular y/o ser extremadamente difícil de recuperar o purificar porque puede ser secuestrada dentro de los cuerpos de inclusión de las bacterias como grandes agregados semisolubles. Los avances recientes en la biología molecular de *E. coli* ha llevado a la habilidad de expresar proteínas dentro del espacio periplasmático, permitiendo eliminar los grupos N-metionina terminal no deseados y realizando más fácilmente la purificación de proteínas.

6.1.2 PRODUCCIÓN EUCARIÓTICA (CELULAS DE MAMÍFERO Y LEVADURAS)

El desarrollo de cultivo de células eucarióticas para la producción de vacunas ha sido establecido en la industria farmacéutica y se ha desarrollado una amplia base de datos para asegurar la adecuabilidad de tales proteínas en humanos. La inclusión de esta tecnología, para productos del DNA recombinante fue al principio una respuesta a la limitación del uso de *E. coli*, particularmente, con respecto a la producción de proteínas grandes o glicoproteínas. La expresión de células eucarióticas es una alternativa atractiva a los sistemas bacterianos, porque las células eucarióticas pueden secretar proteínas que están adecuadamente dobladas y que son idénticas en estructura primaria, secundaria y terciaria a la proteína natural humana. Originalmente, el aspecto económico de este sistema de producción ha dificultado su desarrollo. Sin embargo, avances recientes desarrollados para mejorar los niveles de expresión en cultivo de células a gran escala usando células de ovario de hamster chino (CHO), y en la formulación de más y mejores medios de cultivos definidos han aumentado la posibilidad del uso de sustratos de células eucarióticas. El número de pasajes de células requeridas para la clonación, selección, amplificación y establecer el banco de células para la producción, generalmente requiere del uso de líneas celulares inmortalizadas, porque las cepas no inmortalizadas (ejemplo; cultivos diploides)

no pueden ser propagadas lo suficiente como para proveer en un tiempo económicamente útil en la etapa de producción. Inicialmente los aspectos relacionados con la seguridad de líneas celulares inmortalizadas se han establecido tomando como referencia lo relacionado con la contaminación de oncogenes potencialmente virales y retrovirales.

Estas exigencias han sido minimizadas por el análisis exhaustivo y caracterización de bancos de células maestros para agentes adventicios (accidentalmente introducidos); por estudios efectivos de la validación de procesos y por los datos de seguridad acumulados hasta la fecha sobre productos fabricados por este método. Como resultado de la caracterización a fondo el banco de células maestro, ya se usa para la producción a gran escala. Otras líneas celulares eucarióticas, por ejemplo, aquellas derivadas de células de insectos, pueden ser útiles para conseguir muchas más ventajas conformacionales y postranslacionales de las que han sido descritas para los cultivos de células de mamíferos.

Se ha explorado ampliamente, el uso de algunas cepas de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* para la producción. La producción de proteínas en levaduras ofrece, al menos teóricamente, muchas ventajas sobre *E. coli*, aunque provoca que surjan nuevas inquietudes. Cómo en *E. coli*, las levaduras pueden mantener plásmidos estables extracromosomalmente y sin embargo es diferente de *E. coli*, ya que la levadura posee la habilidad para producir glicoproteínas.

6.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos por dos rutas principales, dependiendo, si son de origen humano o de ratón. Para anticuerpos de origen de ratón, los linfocitos apropiados son seleccionados del bazo e inoculados en ratones o ratas. La célula es entonces fusionada con una línea de células transformadas, tal como una línea celular de mieloma, produciendo una célula hibridoma. Las células del hibridoma son seleccionadas y usadas para producir el anticuerpo monoclonal.

Para anticuerpos de origen humano, los linfocitos B pueden ser seleccionados clonalmente por la especificidad del enlace hapteno de su anticuerpo, estas células seleccionadas pueden ser inmortalizadas por infección con virus. El resultante de la célula fusionada o transformada puede proliferar indefinidamente en un biorreactor, o pueden ser inyectados en ratones en cuyos fluidos ascíticos se puede obtener la proteína.

El anticuerpo producido es dirigido por la información genética que reside en las células o que fue adquirido durante la fusión y es secretado dentro del medio del cual puede ser fácilmente purificado. Las células del hibridoma deben ser minuciosamente analizadas y caracterizadas en la misma ruta general como en un banco de células de DNA recombinante. El banco de células resultante, es usado para la fabricación del producto a escala industrial o por recolección de fluidos ascíticos de ratones inoculados con células transformadas.⁽⁹⁾

Una vez que los cultivos de hibridomas se han seleccionado y clonado repetidamente, es frecuente inocular un grupo de animales para evaluar, por una parte, la eficiencia de crecimiento tumoral, y, por otra, las concentraciones de anticuerpos monoclonales en el ascitis. Se realizan también los primeros ensayos de purificación, y se preparan anticuerpos en cantidad y pureza suficientes para profundizar en su caracterización o evaluar su aplicación potencial.⁽¹³⁾

6.3 FERMENTACIONES (BACTERIAS Y LEVADURAS)

Una gran cantidad de conocimientos que se han obtenidos para la producción de proteínas recombinantes en bacterias y levaduras, han permitido resolver el problema principal de la fermentación que había sido la demostración de la consistencia en las condiciones de fermentación. Las fermentaciones con bacterias y levaduras usualmente son hechas en periodos cortos bien definidos para controlar y monitorear la velocidad de crecimiento y las condiciones de expresión del producto. La presencia de organismos contaminantes puede ser detectada por efectos en la velocidad de crecimiento, la pureza del cultivo, el perfil de ácidos grasos, etc., y es causa suficiente para suspender la fermentación. La estabilidad genética de la producción de plásmidos para bacterias puede ser monitoreada por aislamiento y análisis de la secuencia de nucleótidos o por mapeo de restricción de DNA. Este resultado puede ser confirmado por el mapeo peptídico de la proteína expresada para cada lote de producto manufacturado. Es muy importante optimizar las condiciones de fermentación, así que debe limitarse o evitarse completamente la cantidad de procesos proteolíticos, que puedan ocurrir durante el proceso. El proceso proteolítico es a menudo un problema que se presenta en la fermentación con *E. coli* y puede provocar dificultades en la recuperación y propiciar un rendimiento bajo del producto. Finalmente, la conformación de la proteína y sus efectos sobre la potencia pueden ser dirigidos por los procesos de fermentación.

6.3.1 CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

El origen de las técnicas de cultivos a gran escala para la producción de productos derivados de la Biotecnología puede remontarse a la industria de las vacunas.

El desarrollo de cultivos de células en suspensión, a gran escala, usando organismos recombinantes que secretan la proteína deseada dentro del medio ha tenido un impacto significativo en la Biotecnología. Actualmente pueden producirse grandes proteínas glicosiladas en cantidades suficientes para el mercado. El uso de cultivos de células eucariotas, no obstante, es complicado en aspectos tales como la estabilidad genética, el desdoblamiento de la proteína, las condiciones de cultivo celular y la velocidad de crecimiento. Por ejemplo: la estabilidad genética del cultivo de células no puede ser dirigido tan fácilmente como la fermentación de *E. coli* por técnicas como el análisis de la secuencia de plásmidos, porque el gen que codifica para el producto es incorporado dentro del genoma de la célula y no es fácilmente recuperado. Una alternativa es el mapeo peptídico de la proteína expresada, y se requiere una adecuada resolución y sensibilidad para detectar mutaciones sutiles.

Un punto crítico es, poder garantizar la ausencia de organismos adventicios en cultivos celulares. Así como demostrar que no están presentes bacterias, levaduras y mohos en los cultivos celulares, la manufactura debe proveer evidencia para cada cultivo de que hay ausencia de micoplasmas y virus adventicios. Es importante reconocer que ciertos hibridomas usados para la producción de anticuerpos monoclonales pueden contener retrovirus endógenos. No obstante, debe demostrarse que si hay virus presentes en el cultivo, éstos son removidos del producto final. Para cumplir con estas exigencias, se requiere del desarrollo de técnicas analíticas adecuadas para asegurar la ausencia de contaminación por micoplasmas o virus adventicios humanos y animales.

El grado y tipo de glicosilación puede ser importante en el diseño del cultivo celular para la producción de proteínas glicosiladas. El grado de glicosilación presente puede

afectar el tiempo de vida media del producto in vivo así como su potencia y antigenicidad. Aún cuando, el estado de glicosilación del producto en el cultivo celular es difícil de determinar, se puede verificar su consistencia si las condiciones del cultivo son altamente reproducibles. ⁽⁹⁾

7. FÁRMACOS Y MEDICAMENTOS DE ORIGEN BIOTECNOLÓGICO PROTEÍNAS CON APLICACIONES MÉDICAS

Se considera que más de 3,000 enfermedades humanas resultan de defectos genéticos. Se sabe que muchas de estas son ocasionadas por mutaciones en genes individuales que resultan en la síntesis de productos génicos defectuosos o completamente no funcionales. Las anomalías que se presentan en individuos así como enfermedades hereditarias también resultan con frecuencia de deficiencias específicas de enzimas. En principio, se podría esperar tener la capacidad de tratar estas enfermedades administrando las enzimas faltantes si hubiera disponibilidad en cantidades adecuadas de enzimas puras. En realidad, dadas las herramientas de la ingeniería genética, existe poca duda acerca de la capacidad de producir grandes cantidades de cualquier enzima u otra proteína de interés (tabla 2). Por otra parte, los suministros de enzimas no deben ser un factor importante en el futuro ya que habrá la posibilidad de programar microorganismos recombinantes para sintetizar grandes cantidades de cualquier proteína deseada. ⁽¹²⁾

PROTEÍNA	USO CLÍNICO
Insulina	Diabetes
Hormona de crecimiento	Enanismo hipopituitario
Tejido activador de plasminógeno	Lisis de coágulos
Eritropoyetina	Anemia
G - CSF (Factor de estimulación de colonias de granulocitos)	Quimioterapia del cáncer
GM - CSF (factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos)	Transplantes de médula ósea
Factor VIII	Hemofilia
Interferón - α	Cáncer, hepatitis B, leucemia
Interferón - β	Cáncer, esclerosis lateral amiotrópica, verrugas genitales
Interferón γ	Cáncer, complejo relacionado con el SIDA, osteoporosis

Tabla 2. Proteínas recombinantes aprobadas

7.1. USO TERAPÉUTICO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES APROBADAS⁽¹⁰⁾

7.1.1 INSULINA

La Insulina (Fig. 8) se ha usado para el tratamiento de la diabetes por varias décadas, se ha producido durante varios años a partir de páncreas de porcinos y bovinos. Sin embargo, desde 1982, se aprobó para la venta en cualquier farmacia la insulina humana producida por bacterias recombinantes. En consecuencia, la insulina humana fue el primer logro comercial de las nuevas tecnologías del ADN recombinante en el campo de los productos farmacéuticos. ⁽¹¹⁾

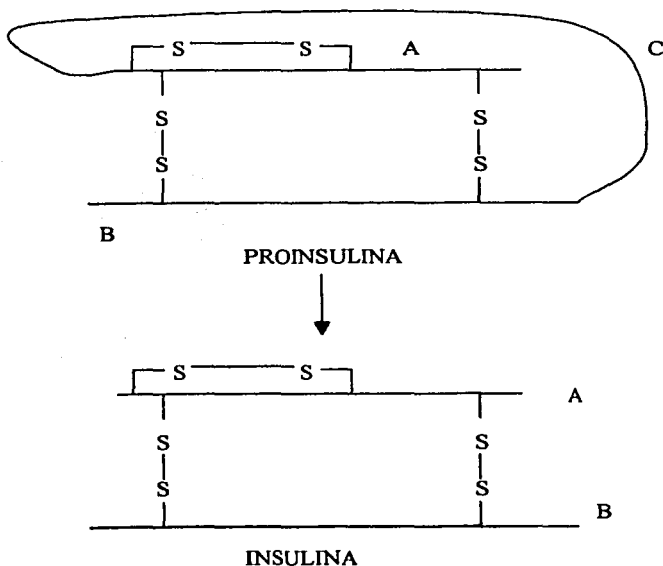


Fig. 8. Estructura de la proinsulina e insulina

Esta hormona es necesaria para que el cuerpo use correctamente los alimentos, especialmente el azúcar. La diabetes ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina. El control de la diabetes es un trabajo conjunto entre el paciente y el médico responsable, y en algunos casos el médico puede prescribir inyecciones de insulina para que los niveles de glucosa estén cercanos a los niveles normales. La insulina es una hormona producida por el páncreas, en los Islotes de Langerhans, la insulina acumulada en vesículas secretoras como una sola cadena polipeptídica se conoce como proinsulina. El primer tercio de la cadena (cadena B) y el tercio final de la cadena (cadena A) de la proinsulina se unen por medio de puentes disulfuro, antes de la secreción al torrente sanguíneo el tercio medio de la cadena (cadena C) de la molécula de proinsulina se corta, dejando las cadenas A y B unidas por los puentes disulfuro como la insulina activa. Se ha demostrado que la bacteria

E. coli no es capaz de remover la cadena C, por lo que existen varias estrategias para producir la insulina, una de las estrategias con mayor éxito consiste en sintetizar primero la cadena A y la cadena B por separado y posteriormente unir las.

La secuencia de genes determinado por la cadena A ha sido fusionado al gen de la β -galactosidasa (lac Z) de *E. coli*. Toda la fusión de LacZ y la cadena A se clona dentro del plásmido PBR322. La bacteria con el plásmido sintetiza β -galactosidasa con la cadena de insulina A y el carboxi terminal final. En el empalme de la proteína híbrida se encuentra el residuo del aminoácido metionina que puede ser separado específicamente por tratamiento con bromuro de cianógeno. Afortunadamente la insulina no contiene algunos residuos de metionina así que la cadena A de la insulina puede ser separada de la β -galactosidasa por un simple tratamiento químico. La cadena B se produce de la misma manera. Después de la purificación de las dos cadenas estas se mezclan y se oxidan, posteriormente se reducen para que se puedan formar los puentes disulfuros para producir la forma activa de la insulina.⁽¹²⁾

7.1.2 HORMONA DE CRECIMIENTO (hHG)

La Hormona de Crecimiento es una sola cadena polipeptídica de 191 aminoácidos de largo que se produce en la glándula hipófisis y se requiere para el crecimiento normal.

El investigador Lin G. Wang X y colaboradores clonaron al ADN que codifica al gen de la Hormona de Crecimiento I en peces de colores, clonando dentro del vector de transferencia de baculovirus pSXIVVI+ X3 para probar la expresión del gen de la Hormona de Crecimiento utilizando el vector TnNPV-SX+ gf GH-I 21a. Los investigadores sugieren que el sistema de expresión en baculovirus puede ser usado para producir Hormona de Crecimiento en diferentes especies de peces.⁽¹⁴⁾

La región que tiene una secuencia de 134 a 150 aminoácidos en la Hormona de Crecimiento Humana (hGH) se conoce por ser desdoblada por proteasas (plasmina y trombina) en el plasma humano, Alam, K. S., Marimoto M. Yoshizato and H. Fujikawa, estudiaron la primera mutagénesis dirigida del oligonucleótido que se usó para producir la Hormona de Crecimiento Humano recombinante resistente a proteólisis efectuadas por esas proteasas, y demostraron que la sustitución del Arg134 y Thr135 de la Hormona de Crecimiento Humana por Asp134 y Pro135 produce una mutante de Hormona de Crecimiento Humana resistente a trombina, y la sustitución de Arg134, Thr135 y Lis140 con Asp134, Pro135 y Ala140 hace que la hormona sea insensible a proteólisis in vitro por plasma humano incubado por 7 días. Estas alteraciones en los residuos de aminoácidos de la Hormona de Crecimiento Humana no modifican su conformación biológica y conserva su actividad promotora de crecimiento sobre células cancerígenas de ratas Nb2 y células cancerígenas de corazón humanas T-47D.⁽¹⁵⁾

Usando proteasas de genes neutrales de *Bacillus amyloliquefaciens* (npr), Uchida H. Naito N. Asada N. y colaboradores construyeron un sistema de expresión de Hormona de Crecimiento de 20-kDa (20Kda hGH) en *E. coli*. La señal de la región de secreción de npr se modificó insertando un fragmento que codifica al grupo 2Lis-5Leu. En este sistema de expresión se encontró que la co-expresión de la glutatión reductasa incrementa notablemente los niveles de acumulación de 20kda hGH en el periplasma y se confirmó que se procesó adecuadamente la 20Kda hGH. Esta 20Kda hGH se purificó y se sometió a análisis de propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas las cuales todavía no son claras debido a la dificultad en la preparación de muestras con la estructura original. El producto recombinante secretado posee enlaces disulfuros reales y mostró pesos moleculares muy cercanos a los esperados.⁽¹⁶⁾

El sistema de *Bacillus brevis* ha mostrado características de muy alta productividad de proteínas heterólogas y muy baja actividad de proteasas extracelulares. Por lo que, se ha observado poca degradación de algunas proteínas. Sin embargo, la degradación de algunas proteínas heterólogas, especialmente proteínas de mamíferos, da como resultado una baja productividad de las mismas. Se utilizó una expresión mutante de niveles bajos de proteasas y adicionando EDTA al medio, la Hormona de Crecimiento Humana se produjo exitosamente utilizando el sistema de *B. brevis*. Por lo que al optimizar las condiciones del cultivo, se alcanzó la producción de hGH más elevada de 240 mg/l.⁽¹⁷⁾

Los pacientes con síndrome de intestino corto, normalmente tienen problemas de desnutrición debido a que tienen problemas de absorción de los alimentos. Ellegard L. y Bosaeus, estudiaron los efectos de dosis bajas de rhGH encontrando que incrementa el peso en pacientes que sufren este síndrome.⁽¹⁸⁾

Hogeveen, M. y Noordam C. Otten B. estudiaron el incremento de altura y peso antes y durante el tratamiento con la hormona de crecimiento humano (hHG) en pacientes con craneofaringioma. El peso fue expresado como índice de masa del cuerpo. Los autores llegaron a la conclusión, de que hay una gran variación en la desviación estándar de la altura y del índice de la masa del cuerpo en el tiempo de la presentación inicial y también durante el crecimiento espontáneo después del tratamiento del tumor. El crecimiento espontáneo postratamiento está relacionado con las concentraciones séricas de prolactina. El tratamiento con la hormona de crecimiento incrementa significativamente la desviación estándar de la altura durante los primeros 2 años, mientras que la desviación estándar del índice de la masa del cuerpo no cambió.⁽¹⁹⁾

Fazio S. y colaboradores diseñaron un estudio para evaluar la presión sistólica y la función ventricular en pacientes con trastorno en la secreción de la hormona de crecimiento, en un intento para elucidar el mecanismo de interacción de la hormona de crecimiento con el desempeño del corazón. Se realizó el estudio en pacientes con acromegalia activa, libres de diabetes mellitus y enfermedades en la arteria coronaria, así como sujetos con deficiencia congénita de hormona de crecimiento. Este estudio demostró que la hormona de crecimiento juega un papel importante en el control de la presión cardíaca y desarrolla un mecanismo para el crecimiento del tejido del miocardio mediado por los efectos de la hormona.⁽²⁰⁾

7.1.3 ERITROPOYETINA

La hormona que regula la producción de células rojas en la sangre es la eritropoyetina. La eritropoyetina es una glicoproteína con una masa molecular de aproximadamente 30 kDa, que circula en el plasma humano. Existen dos formas, la alfa (39% de CHO) y beta (24% CHO) que están disponibles para uso clínico, y no parece haber alguna diferencia en la farmacocinética de estas dos formas de la eritropoyetina. Esta hormona se produce principalmente en las células intersticiales de la capa peritubular capilar de los riñones y en los hepatocitos en mamíferos adultos. La Eritropoyetina se ha utilizado en la clínica para el tratamiento de: anemias asociadas con enfermedades renales en la etapa final, como agente quimioterapéutico en cáncer, en pacientes infectados con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) que reciben AZT. Otras anemias reportadas que responden a la terapia con Eritropoyetina son la anemia prematura, artritis reumatoide y mielodisplasia.^(21,22)

La eritropoyetina recombinante humana, se produce mediante la tecnología del ADN recombinante utilizando como sistema de expresión un clon de células de mamíferos (CHO) que contiene el gen sintético que codifica a la eritropoyetina humana.⁽²³⁾

Los investigadores Mittleman y colaboradores encontraron que el mieloma múltiple (MM) está comúnmente asociado con anemia y la causa de ésta sido asociada a una inadecuada producción de Eritropoyetina. ⁽⁷⁴⁾

7.1.4 FACTOR VIII

El factor VIII o Factor antihemofílico consta de dos componentes, un gran componente con un peso molecular de millones de daltons y otro más pequeño con un peso molecular de aproximadamente 230,000 daltons. El componente menor es más importante en la vía intrínseca de la coagulación y el déficit de esta parte del Factor VIII provoca la hemofilia clásica. Otra enfermedad hemorrágica con unas características algo diferentes, llamada enfermedad de von Willerbrand, es el resultado de la pérdida del componente mayor. ⁽²¹⁾

El avance de la tecnología ha permitido la producción de proteínas recombinantes a escala industrial lo que ha revolucionado los tratamientos de la hemofilia. Los factores de coagulación recombinante tienen un bajo riesgo de transmisión de agentes infecciosos y sus usos podrían erradicar la amenaza de infecciones de virus tales como la Hepatitis C y el virus de inmunodeficiencia humana. Las proteínas humanas recombinantes juegan un papel importante en la terapia, durante estimulación de la hematopoyesis después de la quimioterapia. Debido a que las proteínas recombinantes son copias de las proteínas endógenas, se puede asumir que éstas deben ser toleradas. ^(25,26)

El Factor VIII se obtiene a partir de anticuerpos monoclonales murinos utilizando ligandos de afinidad para aislar al Factor VIII. Se prepara a partir de la inserción de cADN que codifica para la proteína del factor VIII en cultivos de células de mamíferos (ovarios de hámster chinos o riñón de hámster chino). El factor VIII se aísla del cultivo celular por medio de cromatografía de afinidad usando anticuerpos monoclonales murinos contra factor VIII con actividad específica. ⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾

Los científicos Fijnvandraat y Berntor en sus investigaciones acerca de la farmacocinética de una segunda generación del factor VIII recombinante con dominio B eliminado, concluyen que la delección del dominio B del factor VIII recombinante *in vivo* no influye en su actividad farmacocinética. ⁽²⁹⁾

Courter y colaboradores presentan una comparación de resultados de los parámetros farmacocinéticos del factor VIII derivado del ADN recombinante y el factor VIII concentrado derivado del plasma, y evalúan la seguridad y eficacia a largo plazo del tratamiento en casa con el factor VIII recombinante en sujetos con hemofilia A. La respuesta al tratamiento en casa, con el factor VIII recombinante, fue categóricamente excelente. Se observaron reacciones adversas pero ninguna fue seria. ^(30,31) Por otro lado los científicos Kelly KM y Butler RB. demostraron que la infusión del factor VIII recombinante produce significativamente una mejor respuesta y recuperación que la infusión de factor VIII derivado del plasma altamente purificado en niños con hemofilia A. La respuesta en los niños después de la infusión del factor VIII recombinante fue similar a la de los adultos. ⁽³²⁾

7.1.5 INTERFERONES (IFN)

En 1957, se descubrió que un factor soluble producido por células B expuestas a virus inactivo, era capaz de transferir "interferencia" de la replicación viral a células recién obtenidas. Por lo tanto se le denominó "interferón" y desde entonces se ha descubierto que los interferones son una gran familia de glicoproteínas secretadas que tienen actividad

antiviral en respuesta a varios estímulos. Los interferones tienen efectos antivirales, antiproliferativos y efectos inmunomodulatorios sobre diferentes poblaciones de células blancas. En la actualidad, los interferones se clasifican de acuerdo a varias propiedades bioquímicas en tres grupos designados como IFN α , IFN β e IFN γ . El IFN α y el IFN β , son estables en medio ácido y son producidos en principio por leucocitos y fibroblastos en respuesta a virus o RNA de doble cadena. En contraste, el IFN γ es un interferón ácido lábil, producido en un principio por linfocitos T en respuesta a mitógeno o antígeno y, a menudo, se denomina interferón inmuqe. Desde que los interferones humanos recombinantes están disponibles, estos se han probado en un amplio espectro de enfermedades. Se ha establecido el uso de interferones en el tratamiento de leucemia, leucemia crónica mielógena y mieloma múltiple. Sin embargo, aunque se ha documentado actividad contra linfoma, melanoma, cáncer renal celular y tumores carcinógenos, su papel en el tratamiento de estos tumores no es muy claro. Su uso en el tratamiento de tumores comunes sólidos como el cáncer de pulmón y cáncer colorectal, el uso de interferones está todavía en experimentación. ^(21,33,34)

Los científicos Dunster C.A. y Cheeseman K.H., construyeron la línea celular CH0320 producida por células de ovarios de hámsters chinos resistente al estrés oxidativo para producir interferón gama humano. ⁽³⁵⁾

La hepatitis C crónica es una enfermedad asociada significativamente a la morbilidad y mortalidad. Actualmente se ha aprobado el uso del interferón alfa en las terapias para hepatitis C crónica. La eficacia y seguridad del interferón obtenido en el tratamiento de la hepatitis C crónica se evaluó y se demostró que este interferón fue bien tolerado, por lo que los investigadores demostraron que el interferón es efectivo en la terapia inicial para pacientes con hepatitis C crónica. ⁽³⁶⁾

Los investigadores Chung y colaboradores evaluaron el efecto del interferón alfa humano recombinante en pacientes con hepatitis B asociada a glomerulonefritis (HBV-GN). Los científicos llegaron a la conclusión de que el interferón alfa no es fue efectivo en pacientes con glomerulonefritis membrano proliferativa, y que la mejora de la proteinuria sólo se llevó a cabo en pacientes con glomerulonefritis proliferativa mesangial membranosa sin la desaparición de la antigenemia de la hepatitis B. ⁽³⁷⁾

Vey N., Fossat C. y colaboradores, evaluaron los efectos de la combinación del interferón gama (IFN-gama) y la interleucina-2 (IL-2), después de un transplante de médula ósea autóloga. Los resultados obtenidos sugieren que la combinación pudo haber prolongado la activación inmunológica provista por la interleucina-2 y mejorar algunos efectos colaterales de la interleucina-2 sobre la función de los granulocitos. Es necesario realizar estudios controlados para evaluar el impacto de esta estrategia sobre los resultados de la respuesta biológica en pacientes. ⁽³⁸⁾

Como no hay un tratamiento que sirva para sobrevivir a los efectos del carcinoma renal avanzado, Onishi T., trató de estudiar los efectos de la prolongación de subsistencia en pacientes con este tipo de carcinoma renal avanzado realizando unos análisis comparativos entre los pacientes tratados con interferón y los pacientes que recibieron otro tipo de tratamientos y llegó a la conclusión de que el tratamiento con interferón puede contribuir a prolongar el tiempo de supervivencia en comparación con pacientes quienes recibieron otros tratamientos. ⁽³⁹⁾

Raffa S. Albani y colaboradores desarrollaron un trabajo de análisis sobre el uso de interferones en la hepatitis crónica correlacionada con virus y presentan una revisión bibliográfica sobre: virus causantes de la hepatitis crónica, tipo y duración del tratamiento, criterios para escoger a los pacientes observados, efectos clínicos, efectos sobre los virus y efectos sobre la situación histopatológica. Los resultados confirman que la eficacia del

interferón contra la hepatitis B crónica correlacionada con virus es más grande que la eficacia contra la hepatitis C crónica. ⁽⁴⁰⁾

7.1.6 INTERLEUCINAS

Las citocinas son proteínas similares a hormonas que son producidas por células inmunitarias y otras células que regulan la función del sistema inmunitario, por lo general, son péptidos o glicoproteínas sintetizadas o secretadas, con pesos moleculares de 6,000 a 60,000 daltones. Incluyen linfocinas y monocinas, que son producidas por linfocitos y monocitos, respectivamente. La tecnología del ADN recombinante, ha proporcionado cantidades ilimitadas de citocinas muy purificadas, lo que permite la evaluación clínica de estas sustancias en ausencia de contaminantes biológicamente activos. La mayor parte de las citocinas se ha utilizado en estudios de fase I para determinar su seguridad y farmacología, y están en estudios de fase II para determinar su actividad inmunomoduladora en situaciones clínicas específicas y definir regímenes de tratamientos.

Las interleucinas son citocinas producidas por células del sistema inmunitario que regulan la respuesta inmunitaria, así como la hematopoyesis y el metabolismo. Hasta ahora de todas las interleucinas solo la interleucina 2 (IL-2) ha sido evaluada clínicamente. La observación de que IL-2 puede llevar a cabo la proliferación y la activación de células asesinas activadas por la linfocina (LAK), capaces de lisar selectivamente células tumorales, ha estimulado estudios clínicos de IL-2 más células LAK para el tratamiento del cáncer. ⁽³³⁾

Las citocinas, están involucradas en la regulación del crecimiento celular, diferenciación y activación. La interleucina-2 es reconocida por sus efectos antitumorales y tiene una aceptada terapia para un gran número de tumores malignos. La interleucina-1 y la interleucina-11 son importantes como factores trombopoyéticos mientras que la interleucina-6 ha sido introducida en tratamientos clínicos como factor de crecimiento de plaquetas y como un agente antitumoral. La interleucina-4 ha mostrado efectos inhibitorios de crecimiento contra muchas líneas celulares tumorales sólidas in vitro pero su efecto directo sobre tumores humanos in vivo aún debe ser explorado. La interleucina-12 juega un papel importante en la activación antitumoral de la inmunidad celular. Cuando se da un tumor asociado a antígenos, la interleucina-12 provee efectividad contra muchas formas de tumores sólidos metastásicos. Las inmunotoxinas parecen ser prometedoras, aunque es necesario resolver los problemas relacionados con la antigenicidad de la molécula y desarrollo del anticuerpo. ⁽⁴¹⁾

Koterman A. y colaboradores construyeron una cepa de *E. coli* K12 para obtener una expresión eficiente de interleucina-8 humana recombinante biológicamente activa. El desarrollo de los procesos de fermentación y purificación del laboratorio para la producción a gran escala, incluye un control automatizado para el paso inicial de la cromatografía de afinidad y que cumple con las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP). ⁽⁴²⁾

El receptor antagonista de la interleucina-1 (IL-1ra) descubierta recientemente por los científicos Zanete D. Dundon y colaboradores es una citocina que inhibe específicamente las actividades pro-inflamatorias de la interleucina-1 en varias condiciones experimentales. Este receptor se obtuvo de acuerdo a un proceso de purificación que se desarrolló para la forma soluble de la proteína usando la cromatografía de intercambio catiónico en un lecho de adsorción seguido por una separación por cromatografía de intercambio aniónico. Con los resultados obtenidos y sin ningún proceso de desnaturalización/renaturalización, se verificó la pureza e identidad del producto final. ⁽⁴³⁾

Cha HJ., Dalal NG trabajaron con una fusión de proteínas, interleucina-12 humana (hIL-2) y proteína verde fluorescente (GFP) que se expresó en células de insectos Sf-9 infectados con baculovirus recombinante derivado del virus nuclear poliedrosis de *Autographa californica* (AcNPV). Los resultados demostraron que la GFP es un efectivo marcador no invasivo para la expresión y purificación de proteínas heterólogas en células de insecto utilizando un sistema de expresión de baculovirus. ⁽⁴⁴⁾

Por otro lado la infección por VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) se caracteriza por una variedad de problemas en la regulación de la expresión de citocinas. Estos problemas incluyen una disminución general en la expresión de citocinas tipo 1 T-cooperadoras, un incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, un posible incremento en la citocinas tipo 2 cooperadoras, y un aumento en la expresión de interferones antivirales y TGF-beta. Estas perturbaciones pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad del VIH para dañar la respuesta de la inmunidad celular y las células pierden sus características por la infección del VIH y el SIDA por la aceleración de la replicación del VIH-1. El tratamiento utiliza citocinas y sus inhibidores pueden proveer una utilidad adjunta en el manejo de la enfermedad del VIH-1, y al mismo tiempo, estos estudios pueden ser diseñados para ayudar a aclarar el papel de la citocina en la desregulación de la patogénesis de la enfermedad del VIH-1. Sin embargo, el poder de la combinación de fármacos antiretrovirales puede reducir los niveles en plasma del VIH por debajo de los límites de detección, aún no está claro si la reconstitución inmunológica es una consecuencia de estas intervenciones. Los tratamientos con terapias basadas en la inmunidad, incluyen tratamientos de citocinas y sus inhibidores. Se proponen nuevos tratamientos con las investigaciones necesarias asociadas. ⁽⁴⁵⁾

7.1.7 TEJIDO ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO (TPA)

El tejido activador de plasminógeno es una glicoproteína de 527 aminoácidos, es sintetizado por una línea celular de mieloma de humano usando tecnología del ADN recombinante. Esta enzima enlaza a la fibrina en un trombo, causando una conversión de plasminógeno a plasmina. Esta conversión resulta en una fibrinólisis local y un decremento del fibrinógeno circulante. Después de terminada la infusión, con el producto comercial (Alteplase), el 80% de éste se ha eliminado del plasma por el hígado. La actividad de la enzima de Alteplase es de 580,000 Unidades Internacionales/miligramo. ^(27,46)

El tejido activador de plasminógeno se produce utilizando la tecnología del ADN recombinante, es sintetizado usando ADN complementario del tejido activador de plasminógeno humano obtenido de una línea celular de melanoma humano, utilizando una línea celular de mamífero (células de ovario de hámster chino) dentro de la cual el ADN complementario para el tejido activador de plasminógeno ha sido genéticamente insertado. ⁽²⁷⁾

En los Estados Unidos de Norteamérica, en el año de 1996, el tejido activador de plasminógeno se aprobó para el tratamiento de ataque isquémico agudo. Su uso fue recientemente aprobado en Canadá, ya que se había evaluado la seguridad, viabilidad y eficacia del tratamiento en un Hospital de Canadá. La seguridad y los datos obtenidos de los pacientes se compararon favorablemente con los obtenidos de la fase IV del Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y Ataques. Esta revisión ha impulsado a cambios en la comunidad canadiense para mejorar la eficiencia del tratamiento. ⁽⁴⁷⁾

La trombolisis intravenosa que se obtiene con tejido activador de plasminógeno recombinante mejora los resultados en pacientes con ataques isquémicos, quienes pueden

ser tratados dentro de 3 horas de iniciados los síntomas. Los investigadores Chapman y Woolfendeng demostraron la eficacia de la trombolisis intravenosa a pesar de un incremento en el riesgo de alteraciones hemorrágicas severas en pacientes tratados con tejido activador de plasminógeno recombinante. Los investigadores desarrollaron un análisis de factor de riesgo para alteraciones hemorrágicas severas. Este análisis confirmó la importancia de la prolongación de hipotenuación como un factor de riesgo para estas alteraciones. Los resultados también sugieren que pacientes viejos y aquellos quienes han usado aspirina antes del ataque presentan un riesgo más alto de una alteración hemorrágica severa sobre el tejido activador de plasminógeno recombinante.⁽⁴⁸⁾

En los casos de una obstrucción trombótica de una prótesis de válvula cardiaca mecánica se requiere de terapia urgente. Serpi M y colaboradores reportaron sobre el tratamiento de la prótesis de válvula trombótica con tejido activador de plasminógeno recombinante en niños a quienes se les ha colocado una válvula atrioventricular. La terapia fue un éxito, pero en algunos casos la prótesis tenía que ser reemplazada.⁽⁴⁹⁾

El uso de tejido activador de plasminógeno recombinante ha sido recomendado en el tratamiento contra la formación de la membrana fibrinosa postquirúrgica, en la cirugía de cataratas en adultos. Su uso en casos pediátricos esta bien documentado, por lo que se puede concluir que el tejido activador de plasminógeno recombinante puede ser usado con seguridad y eficiencia para tratamientos severos de membranas fibrosas como resultado de una extracción de cataratas pediátricas. Este tratamiento ayuda a recuperar la vista a los niños y también permite un reducido régimen de terapia tópica esteroideal para ser usada después de la operación.⁽⁵⁰⁾

7.1.8 FACTOR DE ESTIMULACIÓN DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G - CSF)

Los factores de estimulación de colonias de granulocitos (CFS) son citocinas que estimulan un número limitado de células madres pluripotenciales, presentes predominantemente en la médula ósea, para producir grandes cantidades de plaquetas, eritrocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos. El factor de estimulación de colonias de granulocitos tiene un peso molecular entre 18,000 y 22,000 daltons, es producido principalmente por los monocitos y sus efectos principales son: la generación de neutrófilos, además estimula las actividades funcionales de los neutrófilos maduros al incrementar la producción del anión superóxido, fagocitosis, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos y por ser un mediador central de respuesta endógena a infecciones e inflamación, por lo que se ha aprobado para su uso en la prevención de infecciones relacionadas a complicaciones en pacientes con cáncer maligno no mieloides, durante la terapia antineoplásica que se asocia con un alto riesgo de neutropenia severa. La administración del factor de estimulación de colonias de granulocitos proporciona el mejoramiento de las defensas del huésped con efectos antiinflamatorios. Existe evidencia de estudios en animales y clínicos que la administración del factor de estimulación de colonias de granulocitos puede ser benéfico en infecciones no neutropénicas.^(33,51)

Este producto se obtiene utilizando la tecnología del ADN recombinante, se usa como sistema de expresión un clon de E. coli, que contiene un gen del factor de estimulación de colonias de granulocitos humano.⁽²⁷⁾

El factor de estimulación de colonias de granulocitos puede ser administrado a donadores sanos para inmovilizar a las células CD34+ progenitoras de sangre periférica para trasplantes de algún órgano. Por lo que se desarrolló un estudio de la modulación de

las células T, en modelos de animales y humanos recibiendo el factor de estimulación de colonias de granulocitos. La evidencia experimental obtenida se caracteriza por una poderosa acción inmunoreguladora ejercida por el factor de estimulación de colonias de granulocitos, y consiste de: (1) incremento en las citocinas insolubles inmunoreguladoras, (2) inhibición de la proliferación de linfocitos, y (3) inducción de activación parcial de los linfocitos después del reto mitogénico. ⁽⁵²⁾

Estudios efectuados por Altunbas H, Yazicioglu G y colaboradores en un paciente gravemente enfermo y que desarrolló agranulocitosis debido a la terapia con propiltiouracilo, después de interrumpido el tratamiento con dicho fármaco, se inició un régimen de antibiótico de amplio espectro más el factor de estimulación de colonias de granulocitos recombinante y un factor humano de crecimiento hematopoyético y se encontró que la cantidad de granulocitos en el paciente volvió a su estado normal, por lo que estos investigadores llegaron a la conclusión de que el factor de estimulación de colonias de granulocitos reduce el riesgo y la severidad de la infección en pacientes con agranulocitosis inducida por propiltiouracilo, y éste tratamiento podría ser aceptado como parte de la terapia estándar. ⁽⁵³⁾

Los estudios sobre el papel que representa el factor de estimulación de colonias de granulocitos endógenos en la defensa del huésped indican que, en adición, a su papel de agente anti-infeccioso, sus citocinas tienen una función inmunoreguladora y también aumentan la eficacia de los antibióticos. Los tratamientos clínicos y preclínicos con el producto comercial Filgrastim, factor de estimulación de colonias de granulocitos humano metionil recombinante, en infecciones neutropénicas y no neutropénicas demuestran una reducción en la morbilidad y mortalidad. Esto se atribuye a la habilidad del Filgrastim para controlar las complicaciones infecciosas y a que permite la continuación de terapias inmunosupresivas. ⁽⁵⁴⁾

Las principales reacciones adversas de fármacos anti-tiroideos; son hematológicos; la anemia aplásica es una de las más raras y más severas complicaciones. El uso del factor de estimulación hematopoyético humano recombinante fue reportado como benéfico en pacientes quienes desarrollaron agranulocitosis, sin embargo existe todavía alguna duda con respecto a la eficacia en la anemia aplásica. El científico Mezquita P, presentó un caso de una paciente con una enfermedad grave que desarrolló anemia aplásica por exposición a metamizol. El retiro del metamizol y una temprana dosis del factor de estimulación de colonias de granulocitos humano recombinante, permitió una favorable recuperación de la cantidad de células rojas periféricas. Por lo que concluye que el uso de factores de estimulación hematopoyéticos podría ser un medio adecuado para llevar a cabo la corrección de severas reacciones adversas hematológicas inducidas por la tiamida. ⁽⁵⁵⁾

A. Ventura y colaboradores estudiaron a un paciente afectado por el Síndrome de Shwachman quien presentó severa neutropenia y frecuentes infecciones supurativas, al cual trataron exitosamente con el factor de estimulación de colonias de granulocitos. Por lo que concluyeron que el factor de estimulación de colonias de granulocitos humano recombinante puede ser un útil agente terapéutico en pacientes con neutropenia sintomática en el Síndrome de Shwachman. ⁽⁵⁶⁾

El factor de estimulación de colonias de granulocitos ha demostrado que mejora el estado de neutropenia en pacientes con daño en la médula ósea. Scagni P; Saracco P, y colaboradores estudiaron los efectos a largo plazo en pacientes con anemia de Fanconi y severa neutropenia. El uso del factor de estimulación de colonias de granulocitos resultó en una mejora del estado clínico, pero a largo plazo de administración puede causar reacciones adversas por lo que requiere un monitoreo hematológico. ⁽⁵⁷⁾

Estudios realizados por De Lalla F y colaboradores en pacientes adultos con meningitis no neutropénicas y que recibieron el factor de estimulación de colonias de granulocitos, combinando la terapia con cefotaxime y dexametasona. Los investigadores reportan que después de recibido el tratamiento los pacientes se recuperaron sin secuelas en todos los casos. Por lo que los investigadores con este estudio demuestran que la administración del factor de estimulación de colonias de granulocitos parece ser seguro y efectivo en estos casos. ⁽⁵⁸⁾

El factor de estimulación de colonias de granulocitos recombinante humano es actualmente usado para el tratamiento de varios tipos de neutropenia, tratamientos de anemia aplásica, movilización de células progenitoras de sangre periférica. Sin embargo el factor de estimulación de colonias de granulocitos recombinante humano no es sólo un factor de crecimiento para el linaje mieloide, pues también actúa como un modulador de la conducta de los neutrófilos. El tratamiento con el factor de estimulación de colonias de granulocitos recombinante humano causa un aumento de funciones tales como fagocitosis, generación de anión superóxido, quimoluminescencia así como muerte bacteriana. ⁽⁵⁹⁾

7.1.9 FACTOR DE ESTIMULACIÓN DE COLONIAS DE GRANULOCITOS MACRÓFAGOS (GM – CSF)

El factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos tiene un peso molecular entre 14,000 y 38,000 daltons, las principales células productoras son las células T y su efecto principal es la mielopoyesis. ⁽²⁷⁾

El factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos se produce mediante tecnología del ADN recombinante, utilizando como sistema de expresión un clon de *E. coli* que contiene un plásmido hibridizado con el gen oligosintético que codifica para el GM-CSF humano. También se puede obtener con la técnica de ADN recombinante utilizando un sistema de expresión en levaduras (*S. cerevisiae*) ^(23,27)

La célula CD14 es una diferenciación en la etapa de enlace del glucosil-fosfatidilinositol ligado a glicoproteína sobre monocitos en sangre periférica humana y tejido de macrófagos, que funciona como receptor para los lipopolisacáridos. Los efectos del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos en citocinas son la proliferación y diferenciación, induciendo propiedades a las líneas celulares mieloides. El factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos descendientemente regula la expresión sobre los neutrófilos. El factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos también disminuye la espontánea liberación de CD14 en cultivos de monocitos. ⁽⁶⁰⁾

El cáncer asociado con neutrofilia marcada es relativamente raro. Los investigadores Sato T y colaboradores reportaron dos casos de carcinoma tiroideo anaplásico asociado con neutrofilia. Los investigadores midieron la concentración del factor de estimulación de colonias de granulocitos, factor de estimulación de colonias de macrófagos, interleucina-alfa, interleucina-beta, interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral en suero, en efusión pleural, fluido ascítico de la región del carcinoma tiroide. La ineterleucina-6, el factor de estimulación de colonias de granulocitos y el factor de estimulación de colonias de macrófagos parecieron jugar el papel principal en uno de los casos de neutrofilia, y los elevados niveles de interleucina-6 y el factor de estimulación de colonia de macrófagos parecieron contribuir principalmente a la neutrofilia en el otro caso. Este es el primer reporte que describe la contribución del factor de estimulación de colonias de macrófagos a la neutrofilia en pacientes con carcinoma en tiroides. ⁽⁶¹⁾

El propósito de las investigaciones de los científicos Saarinen-Pihkala y colaboradores, fue probar el efecto del incremento de la dosis de quimioterapia y reducir los días con fiebre neutropénica en niños con alto riesgo de leucemia aguda linfoblástica por el uso sistemático del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos. El uso sistemático del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos mejoró la intensidad de dosis por el acortamiento del tratamiento intensivo. El uso del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos redujo los días de antibióticos por paciente, en alrededor de una semana, obteniéndose una reducción en el costo del tratamiento. ⁽⁶²⁾

El PIXY321 es una nueva fusión de proteínas del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos recombinante humano e interleucina-3, que inhibe el efecto biológico en citocinas paternas in vitro y en estudios pre-clínicos. Vadhan-Raj y colaboradores evaluaron pruebas de la seguridad clínica y los efectos hematopoyéticos de este híbrido de citocina. El tratamiento se asoció con incrementos significativos de células blancas en sangre, neutrófilos, plaquetas y cuenta de reticulocitos. El tratamiento fue tolerado, aunque se presentaron únicamente los efectos adversos más comunes en el sitio de la inyección. Los resultados de este estudio demuestran la actividad biológica y clínica de una molécula genéticamente fusionada por bioingeniería de dos citocinas hematopoyéticas en humanos con función hematopoyética. ⁽⁶³⁾

Los determinantes del complejo Principal de Histocompatibilidad clase II (MHC) son los elementos de restricción involucrados en la activación específica del antígeno de los linfocitos T-cooperadores y en la interacción con moléculas CD4. Estos se expresan sobre un número limitado de células tipo, principalmente dotadas de capacidad de presentación de antígeno. Los científicos Spagnoli G.C. y colaboradores reportaron que la expresión del determinante MHC clase II es detectable in vivo en granulocitos de sangre periférica en pacientes politraumatizados, debido a administración intravenosa del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos humano recombinante. Así este tratamiento podría incrementar el número de células potencialmente capaces de presentar antígenos restringidos a la clase II en estos pacientes. ⁽⁶⁴⁾

7.2 MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS

ALTEPLASE: Tejido activador de plasminógeno recombinante

Nombres comerciales: Actilyse®, Activase®

Clasificación: Fibrinolítico. ⁽⁶⁵⁾

Es un producto liofilizado estéril que se administra por vía intravenosa después de reconstituirlo con agua estéril para inyección. Su potencia biológica se determina in vitro por prueba de lisis de coágulos y se expresa en unidades internacionales. La actividad específica del Activase es de 580,000 UI/mg. ⁽²⁷⁾

ReoPRO: Tejido activador de plasminógeno recombinante. Es efectivo en la inhibición de coágulos de sangre por inhibición de la agregación de plaquetas. Es usado para tratamientos de enfermedades cardiovasculares. ReoPro está actualmente a la venta en numerosos países como: Estados Unidos, Canadá, Alemania, Reino Unido, Francia Suiza, Grecia, Australia, Suecia y España.

RETEVASE: (Retepase) Es un potente fibrinolítico. Es administrado para el tratamiento de infarto agudo al miocardio. RETEVASE es una activador de plasminógeno no glicosilado recombinante que convierte al plasminógeno en plasmina una enzima que ayuda a romper los coágulos que bloquean a las arterias coronarias. Este producto se encuentra a la venta en Estados Unidos desde 1997.

REMICADE: Es un anticuerpo monoclonal quimérico que enlaza al factor de necrosis tumoral alfa, que se cree es crítico en reacciones del cuerpo humano a la inflamación. REMICADE es utilizado primeramente para tratamientos de enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad de Crohn y para artritis reumatoide. La FDA aprobó el REMICADE en agosto de 1994 para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

PANOREX: Adyuvante en la terapia de cancer colorrectal; (solo disponible en el mercado alemán). Es el primer anticuerpo monoclonal aprobado para el cáncer. ⁽⁶⁶⁾

BIOYETIN: Es la primera eritropoyetina recombinante humana desarrollada con tecnología mexicana. BIOYETIN está indicado para promover la recuperación de la fórmula roja en las anemias asociadas a deficiencias de eritropoyetina, en pacientes con: insuficiencia renal crónica: sintomática o dependiente de transfusión, infección por VIH y en condiciones malignas; neoplasias.

Bioyotin es un polvo liofilizado para solución inyectable. Su presentación comercial consiste en un frasco ampula con polvo liofilizado que contiene: 1,000 UI, 2,000 UI y 4,000 UI por frasco.

GRAMAL: (Molgramostim rHUGM-CSF). Es una citocina que apoya la supervivencia, expansión y diferenciación de las células progenitoras de la médula ósea. La administración del GM-CSF produce en la médula ósea: 1) rápido aumento de la celularidad y 2) desplazamiento de la relación celular eritroide/granulocitos; lo cual indica un aumento en la proliferación de líneas celulares granulocitos-macrófagos. GRAMAL está indicado para promover y acelerar la recuperación de la médula ósea en pacientes: en tratamiento con quimioterapia citotóxica, en tratamiento con radioterapia, en transplante de médula ósea, con defectos de la hematopoyesis, con infección y neutropenia.

La presentación comercial de Gramal consiste en un frasco ampula con polvo liofilizado para inyección que contiene Molgramostin (rHuGM-CSF) 150µg, 300µg y 400µg por cada frasco.

PROQUIFERON: (Interferón alfa-2a). Es una proteína soluble en agua altamente purificada, compuesta por 165 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 19,000 daltons. Es producido mediante la técnica del ADN recombinante usando una cepa de E. coli; el interferón alfa-2a recombinante, al igual que el interferón alfa endógeno, producido principalmente por los leucocitos, tiene efectos antivirales, antitumorales e inmunomoduladores. En clínica se utiliza en los siguientes padecimientos:

- a) Hematológicos: Leucemia de células velludas, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple.
- b) Oncológicos: Sarcoma de Kaposi asociado a SIDA, melanoma maligno.
- c) Viroológicos: Hepatitis crónica B, hepatitis crónica C.

Proquiferón polvo para inyección, se suministra en forma de polvo liofilizado que puede ser reconstituido para inyectarse. Cada frasco ampula contiene 3, 4.5, y 9 Millones de UI de interferón alfa-2a recombinante.

URIFRON: (Interferón alfa-2b). Es una proteína recombinante humana de 165 aminoácidos con un peso molecular de 19.3 kDa. URIFRON tiene propiedades antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras bien establecidas. Potencializa la acción de fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer y el SIDA. Está indicado como agente único o asociado a quimioterapia en los siguientes padecimiento: hepatitis crónica activada por virus tipo B y C, condiloma acuminado, leucemia de células velludas, mieloma múltiple, mieloma maligno y sarcoma de Kaposi asociado a SIDA.

Urifron polvo para inyección, se suministra en forma de polvo liofilizado que debe ser reconstituido para inyectarse. Cada frasco ampula contiene 3, 5 y 10 Millones de UI de interferón alfa-2b recombinante. ⁽²³⁾

PROLEUKIN: (Interleucina-2; aldesleukin). Es una interleucina-2 recombinante humana, que se produce mediante ingeniería genética por recombinación del ADN en cepas de *E. coli*. Proleukin tiene propiedades inmunorreguladoras, las propiedades de Proleukin incluyen: incremento de la mitogénesis de los linfocitos, incremento de la citotoxicidad de los linfocitos, inducción de la actividad de las células NK (Natural Killer) e inducción de la producción del interferón gama. Proleukin está indicado en el tratamiento del cáncer metastásico, del melanoma maligno avanzado, de la leucemia aguda megaloblástica en recaída y trasplante de médula ósea. ^(27, 67)

FILGRASTIM: (Factor de estimulación de colonias de granulocitos). Se produce utilizando la tecnología del ADN recombinante en *E. coli*. El factor de estimulación de colonia de granulocitos regula la producción de neutrófilos. Su uso está relacionado con anemia, anemia aplásica, trasplante de médula ósea y enfermedades relacionadas con el SIDA. Este producto aún no está aprobado por la FDA.

SARGRAMOSTIN: (Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos). Se produce utilizando tecnología del ADN recombinante utilizando como sistema de expresión una levadura (*S. cerevisiae*). Sargramostin está indicado en enfermedades relacionadas con el SIDA, anemia, trasplante de médula ósea. Este producto todavía no está aprobado por la FDA. ⁽²⁷⁾

ONTAK: Es una fusión de proteínas, consistente de fragmentos de toxina diftérica genéticamente fusionada a interleucina -2. El blanco del ONTAK son los receptores de la interleucina-2 de superficie de células malignas y algunos linfocitos normales. La FDA ha aprobado el ONTAK para el tratamiento de pacientes con linfomas cutáneos persistentes o recurrentes quienes las células malignas expresan el componente CD25 del receptor de la interleucina-2. ^(68,69)

CORSEVIN MTM: (antitrombina Mab). (No disponible en el mercado) es un antifactor VIII anticuerpo monoclonal quimérico, producto que intenta ser usado como un anticoagulante. El factor VIII es uno de los factores primario que juegan un papel en el proceso de coagulación de la sangre. La compañía biotecnológica norteamericana Centocor ha completado la fase I del tratamiento clínico y está evaluando los protocolos para tratamientos clínicos adicionales.

GeneVax®: (No disponible en el mercado). Centocor está desarrollando una vacuna genéticamente basada en el empleo de métodos directos de inyectar ADN al sitio blanco. Centocor espera desarrollar vacunas para el cáncer de próstata, seno y colorectal. En 1997, se inició el estudio clínico de la fase I del tratamiento para evaluar la vacuna para el cáncer colorectal y en 1998 se inició la fase I del tratamiento para cáncer de próstata y pulmón. ⁽⁶⁶⁾

8. CONTROLES DE LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN Y DE LOS CULTIVOS CELULARES

Debido a que en los procesos de producción se utilizan sistemas vivos, se deben revisar cuidadosamente todos los aspectos relacionados directamente con los procesos biotecnológicos. Se debe exigir el cumplimiento de las consideraciones relacionadas con la producción de proteínas en bacterias, por ejemplo, fundamentalmente: sistemas para el aseguramiento de la estabilidad genética, consistencia en el rendimiento del producto y evidencia de la ausencia de contaminación de organismos adventicios. Estas mismas consideraciones se aplican a cultivo de células eucarióticas a gran escala donde, como ya se indicó, hay también consideraciones significativas relacionadas con el uso de líneas celulares inmortalizadas así como la probable presencia de DNA/RNA oncogénico e impurezas de proteínas del medio.

8.1 PROCESOS PARA RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN

La recuperación de proteínas obtenidas tanto de fermentación como de cultivos celulares está generalmente basada en técnicas eficientes de separación, como las siguientes:

8.1.1 MÉTODOS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA PRODUCTOS DERIVADOS DE LA BIOTECNOLOGÍA

- ❖ Cromatografía de Enfoque isoelectrico
- ❖ Cromatografía de Interacción Hidrofóbica
- ❖ Cromatografía de Transferencia de Carga
- ❖ Cromatografía de Exclusión (Por tamaño)
- ❖ Cromatografía de Intercambio Iónico (Catiónico y Aniónico)
- ❖ Cromatografía de Afinidad (Químicos, Anticuerpos monoclonales, Receptores celulares, Colorante/ligando, Quelatos con metales)

Los procesos de recuperación se inician con el aislamiento de la proteína deseada del medio de fermentación o del medio de cultivo celular, a menudo impuro. La ventaja del cultivo celular y de los productos derivados de levaduras es que muchas de estas proteínas son secretadas directamente dentro del medio, así solo requieren la separación de las células para obtener una purificación significativa. Para productos derivados de *E. coli*, es a menudo necesaria la lisis de la bacteria para recuperar la proteína deseada. Es importante en cada caso llevar a cabo una purificación de la proteína deseada ya que las proteasas liberadas, por el organismo lisado, pueden romperla. Las trazas de proteasas son un problema mayor en la purificación de productos derivados de la Biotecnología porque

pueden ser muy difíciles de eliminar y complicar los procesos de purificación y pueden afectar significativamente la estabilidad del producto final.

Los procesos de recuperación están diseñados para purificar el producto final a altos niveles. El requerimiento de pureza para un producto depende de muchos factores, sin embargo, el uso crónico de estos productos obliga a requerir una pureza mayor que la de aquellos propuestos para uso único. Los productos de la Biotecnología contienen ciertas impurezas y los procesos de recuperación están específicamente diseñados para eliminarlos o minimizarlos. Estas impurezas (tabla 3) incluyen trazas de DNA, factores de crecimiento, proteínas residuales del huésped, endotoxinas y proteínas residuales de células del medio. Las impurezas más comunes y los métodos de ensayo adecuados para detectarlos son los siguientes:

8.1.2 IMPUREZAS POTENCIALES Y CONTAMINANTES EN LOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LA BIOTECNOLOGÍA

IMPUREZAS O CONTAMINANTES	MÉTODOS DE DETECCIÓN
<p style="text-align: center;">Impurezas</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Endotoxinas ▪ Proteína de la célula huésped. ▪ Otras impurezas de proteínas ▪ DNA ▪ Proteínas mutantes ▪ Formilmetionina ▪ Metioninas oxidadas ▪ Ruptura proteolítica ▪ Agregado de proteínas ▪ Desamidación <p style="text-align: center;">Contaminantes</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Microbianos (bacterias, hongos y levaduras) ▪ Micoplasmas ▪ Virus (endógenos o adventicios) 	<ul style="list-style-type: none"> → Prueba de endotoxina bacteriana. Prueba de pirógenos. → SDS-PAGE^(a)-inmunoensayos → SDS-PAGE, HPLC^(b), inmunoensayos → Hibridación del DNA, espectrofotometría UV, enlace de proteínas → Mapeo de péptidos HPLC, IEF^c, MS^(d) → Mapeo de péptidos HPLC, MS → Mapeo de péptidos, análisis de aminoácidos, HPLC, análisis de degradación de Edman, MS → IEF, SDS-PAGE(reducido), análisis de degradación de Edman → SDS-PAGE, HPSEC^(e) → IEF, HPLC, MS, análisis de degradación de Edman → Prueba de límite microbiano, prueba de esterilidad, pruebas microbiológicas. → Método modificado 21 CFR^(f), DNAF^(g) → CEP^(h) y Had⁽ⁱ⁾(solo virus exógenos) actividad de la transcriptasa reversa, MAP^(j)

Tabla 3: Impurezas o contaminantes y los métodos de detección

^a Docecil sulfato de sodio- electroforesis en gel de poliacrilamida

^b Cromatografía Líquida de Alta Resolución

^c Enfoque Isoeléctrico

^d Espectroscopía de Masas

^e Cromatografía de Exclusión de Tamaño de Alta Resolución

^f Guías del Código Federal de Regulaciones, título 21

- ^g Enlace DNA-fluorocromo
- ^h Efecto citopático
- ⁱ Hemadsorción
- ^j Producción de anticuerpos de ratón.

El cromatofoco y la cromatografía en fase reversa son métodos de purificación que usan sustancias químicas tanto en la fase estacionaria como en la fase móvil y éstas pueden llegar a ser impurezas en el producto final. Como cualquier nueva tecnología, el costo de la validación (demostrar que se eliminan sustancias químicas potencialmente nocivas) le incumbe al productor. La validación es necesaria cuando es aislado el anticuerpo monoclonal como producto final y/o al usar alguna técnica en algún paso de la purificación del anticuerpo monoclonal. El proceso debe demostrar que logra remover del filtrado anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Es necesario asegurar la ausencia de agentes adventicios tales como virus y micoplasmas en la línea celular que es la fuente de los anticuerpos monoclonales. El principal problema es la posibilidad de contaminación del producto con una sustancia antigénica cuya administración podría causar detrimento de los pacientes. Es necesario el monitoreo continuo de los procesos para evitar o eliminar tales contaminaciones. Este problema de la antigenicidad relacionada con la actividad, así como con las proteínas del huésped se presenta solo en los productos derivados de la Biotecnología, en contraste a los farmacéuticos tradicionales. En los métodos de manufactura que utilizan ciertos disolventes deberá monitorearse si estos disolventes son capaces de causar rearreglos químicos, que puedan alterar el perfil antigénico del fármaco. El productor también está obligado a producir evidencias con respecto al funcionamiento consistente de cualquier nueva columna cromatográfica. Las consideraciones para los productos de dosis simple como vacunas, pueden diferir ya que no son administradas continuamente y en este caso, la antigenicidad es deseable. Por otro lado, es necesario validar la eliminación de proteínas extrañas. A diferencia de los fármacos derivados de fuentes naturales, en los productos derivados de la Biotecnología se debe requerir la validación para la eliminación de ácidos nucleicos durante la purificación. ⁽⁹⁾

Por consiguiente, la seguridad de los consumidores y pacientes ha llegado a ser uno de los pre-requisitos para el desarrollo de productos biofarmacéuticos, su producción y comercialización. La habilidad para proveer un producto efectivo, puro y seguro es un factor primario para determinar el éxito de un producto. ⁽⁷⁾

8.2 DETERMINACIONES PARA PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS

Existen numerosas razones que justifican que las regulaciones sean tan estrictas; puede haber problemas de adulteración, la producción de nuevos fármacos con un incremento de la complejidad de la producción tecnológica, la potencia, estabilidad de los productos biofarmacéuticos y la política relacionada con los impactos ambientales de los procesos biotecnológicos. Los riesgos involucrados están basados en factores reales, accidentales o incidentales, tales como la contaminación de productos de la sangre con virus e infecciones subsecuentes de pacientes; en otros casos, tales como la eliminación del ADN recombinante.

Existe un especial interés en este contexto, para asegurar que un fármaco cumpla con los requerimientos de seguridad, identidad y potencia y cumpla con las características de pureza y calidad realizándole a cada materia prima o producto fabricado los siguientes análisis: ⁽⁷⁰⁾

- 1 Empaque y almacenaje ^(9,28,71)
 - 2 Identificación: Utilizando métodos químicos y físicos. ^(9,28,71)
 - 3 Mapeo de péptidos ⁽⁹⁾
 - 4 Endotoxinas bacterianas ^(9,71)
 - 5 Pureza cromatográfica ⁽⁹⁾
 - 6 Contenido de proteínas ⁽⁹⁾
 - 7 Pruebas de potencia biológica ^(9,28)
 - 8 Etiquetado ⁽⁹⁾
 - 9 Constitución de la solución ⁽⁹⁾
 - 10 Seguridad ^(9,28)
 - 11 Esterilidad ^(9,28)
 - 12 Uniformidad de dosis por unidad ^(9,28)
 - 13 pH ^(9,28)
 - 14 Contenido de agua ⁽⁹⁾
 - 15 Contenido de una sola cadena ⁽⁹⁾
 - 16 Porcentaje de monómeros ⁽⁹⁾
 - 17 Descripción ⁽²⁸⁾
 - 18 Pirógenos ⁽²⁸⁾
 - 19 Proteínas totales ⁽²⁸⁾
 - 20 Variación de volumen ⁽²⁸⁾
 - 21 Hermeticidad ⁽²⁸⁾
 - 22 Proteínas derivadas de la célula huésped. ⁽²⁸⁾
 - 23 DNA derivado de la célula huésped o vector ⁽²⁸⁾
 - 24 Proteínas relacionadas ⁽⁷¹⁾
 - 25 Enfoque isoeléctrico ⁽⁷¹⁾
- Otras determinaciones específicas para fármacos como:
- 26 Radioinmunoensayo para eritropoyetina (EPO) ⁽²⁸⁾
 - 27 Impurezas de masas moleculares diferentes del interferón alfa-2 ⁽⁷¹⁾

9. ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

En general, los sistemas de aseguramiento de calidad para los productos derivados de la Biotecnología son muy similares a aquellos sistemas de aseguramiento de calidad empleados rutinariamente para los productos farmacéuticos tradicionales, es decir, se trabaja a nivel de materias primas, de pruebas para producto intermedio y de liberación para el producto terminado, la documentación de los procesos de manufactura y control de procesos y en procesos asepticos. Los sistemas de control de calidad para los productos derivados de la Biotecnología incorporan algunas de las mismas filosofías aplicadas a los productos farmacéuticos de bajo peso molecular. Esto incluye el uso de estándares de referencia químicos (certificados) para evaluar un amplio espectro del producto y/o impurezas potenciales conocidas y productos de degradación. Los sistemas de control de calidad para los productos derivados de la Biotecnología, son generalmente análogos a aquellos establecidos para los productos biológicos tradicionales con respecto a determinar la esterilidad del producto, la seguridad del producto en animales de experimentación y la potencia del producto. Estos productos deben cumplir con los requerimientos oficiales señalados para inyectables por ejemplo, pH, ausencia de partículas, prueba de endotoxina bacteriana (pirógenos) e impurezas en productos oficiales.

La diferencia fundamental entre los sistemas de aseguramiento de calidad para los productos derivados de la Biotecnología y los productos farmacéuticos tradicionales está en el tipo de métodos que se usan para determinar la identidad del producto, la potencia, la pureza y los perfiles de impurezas. Además en el aseguramiento de calidad de productos derivados de la Biotecnología es necesario frecuentemente utilizar una combinación del control del producto final y las pruebas de validación del proceso, para asegurar la eliminación de impurezas reales o impurezas potenciales a los niveles sugeridos por las agencias regulatorias. Los productos derivados de la Biotecnología generalmente requieren una detallada caracterización de los organismos de producción (células) una evaluación completa e inequívoca de los medios de crecimiento y propagación de las células y del proceso de recuperación del producto final.

La complejidad de los sistemas de control de calidad de los productos derivados de la Biotecnología está relacionada con características tanto de tamaño y estructura del producto como con los procesos de manufactura. En general, los sistemas de control de calidad para productos producidos en células procariotas son menos complejos que los sistemas requeridos para los productos producidos en células eucariotas. Los sistemas de control de calidad para los organismos procarióticos usualmente incluyen documentación del origen de la cepa productora y abarca las pruebas tradicionales para los organismos adventicios, cariotipo, fenotipo y resistencia a antibióticos. Adicionalmente, pueden ser útiles algunas de las nuevas técnicas tales como mapeo de restricción de DNA, secuencia de análisis de DNA y monitoreo rutinario que puede incluir la medición de los niveles de RNA mensajero y plásmidos de DNA.

El control de calidad para el patrón de células y el banco de células de trabajo para la producción de organismos eucariotas generalmente incluye pruebas para organismos adventicios, cariotipo, identidad y monitoreo de estabilidad. Todas las líneas celulares eucarióticas (excepto levaduras) son generalmente probadas para la presencia de retrovirus, marcadores de actividad retroviral y tumorigenicidad, sin embargo, muchas de estas pruebas pueden ser de valor limitado.

9.1 FORMULACIÓN DEL PRODUCTO

Los productos derivados de la Biotecnología son proteínas y péptidos, los cuales son moléculas relativamente inestables comparadas con otros productos farmacéuticos orgánicos. La mayoría de los procesos biotecnológicos incluyen en el proceso de purificación la transferencia de proteínas de un buffer estabilizante o solubilizante a otro. Finalmente, la proteína se coloca dentro de su solución final dosificada donde se logra la estabilidad a largo plazo. De hecho, estos productos a menudo requieren liofilización para alcanzar este tipo de estabilidad, debido al potencial de degradación por una gran variedad de mecanismos incluyendo desaminación, agregación, oxidación y posibles proteólisis por niveles trazas de proteasas de la célula huésped. La forma final dosificada de la proteína generalmente contiene compuestos estabilizadores que proporcionan el pH óptimo y las condiciones de solución necesarias para la estabilidad a largo plazo y/o las propiedades del producto para su administración correcta (tonicidad). Entre estos compuestos se incluyen proteínas, alcoholes polihídricos, aminoácidos, carbohidratos, agentes para dar volumen, sales inorgánicas y surfactantes no aniónicos. De hecho, estos excipientes en ocasiones se requieren para contribuir a la formación estable del liofilizado. Algunos de los requerimientos especiales para los productos liofilizados, por ejemplo, el control de los niveles de humedad, que generalmente están definidos en la monografía individual del

producto en la USP, son muy importantes para la estabilidad del producto. Significativamente, la evaluación de la estabilidad de la proteína usualmente requiere el uso de múltiples métodos analíticos, cada uno puede ser usado para evaluar un mecanismo específico de degradación de las proteínas.

Los estudios de estabilidad acelerada para predecir el tiempo de vida de las formulaciones de proteínas son a menudo complicados, por los efectos de la temperatura en la conformación de las proteínas, resultando en un comportamiento no-Arrhenius. Por lo tanto, para establecer la fecha de caducidad, de los productos derivados de la Biotecnología, se requiere frecuentemente de estudios de estabilidad en condiciones reales de almacenamiento.

9.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA

La evaluación analítica de los productos derivados de la Biotecnología se apoya fundamentalmente en el uso de métodos analíticos sofisticados, que permiten demostrar la identidad estructural y la homogeneidad de las proteínas, además de ser útiles para evaluar el tiempo de vida de anaquel o la estabilidad de estos productos.

Es necesario contar con información sobre: la exactitud, precisión, y aplicabilidad general de los métodos más utilizados. Algunos métodos, tales como las pruebas de impurezas de la célula huésped y los procedimientos para la determinación de DNA residual, pueden ser procesos particulares para productos específicos por lo que deben ser incluidos en la monografía individual del producto.

9.3 CONSIDERACIONES SOBRE LOS ESTÁNDARES DE REFERENCIA

El uso de estándares de referencia y/o materiales de referencia adecuados es extremadamente importante en el análisis de los productos derivados de la Biotecnología. Estos estándares pueden ser de 2 tipos: materiales naturales o proteínas producidas por Ingeniería Genética. Muchos productos derivados de la Biotecnología requieren la disponibilidad de estándares de referencia exactamente caracterizados de fuentes internacionales reconocidas tales como: USP, OMS, NIH y FDA. Actualmente, están disponibles provenientes de estas fuentes, para algunos productos biológicos los estándares de referencia con unidades de actividad definida. Estos estándares son usados por los fabricantes para realizar las pruebas o para calibrar estándares secundarios que son utilizados en muchos de los ensayos descritos en la sección de análisis de la USP. El valor de la potencia de los estándares de referencia se obtiene directamente de estudios en colaboración cuando son evaluados estadísticamente, y estos datos son usados para determinar el último valor de potencia que se asigna al estándar de referencia. El estándar secundario puede ser usado para determinar la cantidad etiquetada del producto. Así, los estándares de referencia/material de referencia para los productos derivados de la Biotecnología que son usados para los propósitos analíticos descritos en la monografía específica de la USP deben ser aprobados por la USP y adquirirse de la USP. Idealmente, estos estándares de referencia deben ser de uso internacional y siempre deben ser calibrados contra los estándares USP que son depositados por los fabricantes en la FDA, para su uso en productos autorizados por la misma. Esto permite asegurar la exactitud y la consistencia en la determinación de la actividad (potencia) y pureza de estos productos. Debido al número de características únicas de los productos derivados de la Biotecnología, como son los procesos particulares de fabricación y la especificidad del producto, pueden requerirse estándares de referencias diferentes para productos similares. Además, el manejo adecuado

de la recalibración de los estándares de referencia y/o el reemplazo de estándares agotados o expirados realizados por la USP permiten asegurar que la cantidad etiquetada del producto no cambie. Una advertencia en la asignación de la potencia de un estándar primario, a través de estudios de colaboración, es que las unidades de actividad definidas solamente tienen sentido cuando se compara en la valoración que está descrita. En la comparación de valores de actividad, aún de ensayos subsiguientes diferentes, puede obtenerse una gran variación de resultados.

9.4 METODOLOGÍA TRADICIONAL

Existe un número de métodos analíticos específicos que se aplican a los productos derivados de la Biotecnología. Muchos de los ensayos y pruebas descritos pueden ser desarrollados en forma diferente, ya que algunos de éstos pueden ser para productos específicos, se deben establecer las guías sobre la aplicación de métodos específicos en situaciones particulares.

9.4.1 CONTENIDO DE PROTEÍNAS

Las pruebas de contenido de proteínas se utilizan para determinar cuantitativamente la cantidad de proteínas en un producto determinado derivado de la Biotecnología. La determinación del contenido de proteínas es a menudo una de las mediciones más difíciles y además requieren una confirmación independiente por métodos alternativos. Cuando es aplicable la determinación de la cantidad absoluta de proteína, independientemente del uso de estándares de referencia, se pueden emplear métodos como: la espectrofotometría UV con una absorptividad conocida y el análisis de nitrógeno por Kjeldahl. Por otro lado, otros métodos como: el método de Lowry para proteínas, el de Biuret y el análisis cuantitativo de aminoácidos, que requieren de estándares de referencia, también producen valores exactos. La valoración del contenido de proteínas está entre los métodos más importantes utilizados para estos productos, porque los resultados de otro tipo de valoraciones, tales como la potencia depende de ellos.

Hay varias pruebas, usadas comúnmente, para la determinación del contenido de proteínas. Estos ensayos pueden utilizarse en diferentes puntos del proceso de fabricación de los productos derivados de la Biotecnología. Para proteínas de alta pureza, el más sencillo de los métodos para determinar el contenido de proteínas está basado en la determinación espectrofotométrica de la absorbancia en el ultravioleta de una solución de proteínas. Se determina la absorbancia en el máximo de absorción y se calcula la concentración de proteínas, con el uso de una absorptividad determinada empíricamente. Esta técnica es aplicable a proteínas que contienen residuos de aminoácidos aromáticos como: triptofano, tirosina y/o fenilalanina. La longitud de onda de absorción utilizada a menudo es a 280 nm. El coeficiente de extinción o absorptividad molar, debe ser determinado en el mismo disolvente que es utilizado para la medición de las muestras. Si es necesario el producto puede ser diluido antes del análisis para obtener una solución con un valor de absorbancia en el rango lineal de la detección. Los agregados de alto peso molecular o partículas pueden elevar los efectos de la dispersión de la luz, lo que provoca valores de absorbancia artificialmente altos. Los componentes (excipientes) que tienen una absorbancia significativa en 280 nm también interferirán en esta prueba. La espectrofotometría UV es la única, entre la amplia variedad de métodos para determinar el contenido de proteínas, que es una medida absoluta de concentración de una proteína específica y que no requiere calibración con estándares.

Un método general comúnmente utilizado para la determinación del contenido de proteínas es el método de Lowry, que está basado en la reacción de biuret de las proteínas con cobre (II) en una solución alcalina y la reducción del ácido Folin-Ciocalteu fosfomolibdico-fosfotúngstico que se reduce a azul de hetero-polimolibdeno, por la oxidación catalizada con cobre de los aminoácidos aromáticos, tirosina, triptofano y fenilalanina, de la proteína. Los productos de la reacción son azules y se cuantifican espectrofotométricamente en la región visible entre 540 y 560 nm. Esta reacción es lineal en niveles de microgramos de proteínas. La prueba, no obstante, está propensa a interferencias de cierto número de sustancias tales como: alcoholes, azúcares y detergentes. En algunos casos, las sustancias o productos interferentes pueden ser eliminados antes del análisis por ejemplo por precipitación. También, se puede corregir la presencia de sustancias interferentes por la preparación de controles que contengan las sustancias interferentes que están en el producto, aún cuando generalmente se ha usado albúmina sérica bovina es conocido que diferentes proteínas reaccionan con diferente intensidad, por lo que el mismo producto debe usarse como material de referencia para la calibración. La prueba usando el ácido benciconínico (BCA) es una alternativa práctica para el método de Lowry porque es menos sensible a sustancias interferentes. El reactivo de trabajo es una solución BCA - cobre (II). El complejo cobre (II) es reducido a cobre (I) en presencia de la proteína y el color púrpura puede ser cuantificado por espectrofotometría aproximadamente a 560 nm.

También se han usado otros ensayos colorimétricos. El método de Bradford, por ejemplo, emplea el enlace del colorante azul brillante de Coomassie a la proteína en un medio ácido y se determina la concentración de la proteína en la solución por comparación de la absorbancia a 595 nm con una curva estándar de un material de referencia.

Los métodos de fluorescencia utilizados normalmente emplean fluorescamina u o-ftalaldehído (OPA). La principal ventaja de estas pruebas es que se incrementa la sensibilidad. Otra ventaja es su uso con proteínas hidrofóbicas. La fluorescamina y el OPA reaccionan ambas con aminas primarias en el nitrógeno terminal del polipéptido y con aminoácidos con cadenas laterales, como por ejemplo, lisina.

Con el método de Kjeldahl, para la determinación de nitrógeno se obtienen resultados exactos y precisos de la concentración de proteínas, este dato es a menudo utilizado en la determinación de las absortividades de proteínas en UV. El ensayo se ha desarrollado en dos etapas: primero se descompone la muestra con ácido sulfúrico para producir sulfato de amonio, bióxido de carbono y agua. La descomposición completa se alcanza en el punto de ebullición del ácido sulfúrico (se realiza en un matraz de cuello largo en forma de pera). Este matraz, sirve para condensar el vapor de agua y prevenir la pérdida de material. Dependiendo de la eficiencia, en la descomposición, se pueden adicionar varias sales por ejemplo, Sulfato de potasio, para aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico. Algunos agentes oxidantes como, el ácido perclórico o permanganato de potasio han sido utilizados para mejorar la descomposición. La segunda etapa de la prueba involucra la determinación directa de amoniaco. En muchas macrodeterminaciones, el amoniaco es destilado, de la mezcla, con vapor después de alcalinizar con hidróxido de sodio. El amoniaco se destila cuantitativamente fuera de la mezcla, en 5 a 20 minutos y es absorbido cuantitativamente dentro de una solución ácida estandarizada de volumen y normalidad conocida. Este exceso de ácido es entonces titulado por retroceso con una base estandarizada. Para determinaciones de proteína cruda, el valor del amoniaco y por lo tanto el contenido de nitrógeno, es multiplicado por un factor de 6.25mg de proteína por miligramo de nitrógeno, el cual corresponde a un contenido de nitrógeno del 16%. El valor de la proteína así obtenido se ha validado para la mayoría de las proteínas. Si se requiere un

valor más exacto, para una determinación de absortividad, entonces, el factor de conversión debe ser calculado por el contenido de nitrógeno de la proteína pura individual a partir de la composición conocida de aminoácidos. Para glicoproteínas que contienen grupos de amino azúcares, el valor del cálculo es sesgado por lo que debe aplicarse una corrección.

Los análisis de aminoácidos se han usado en la determinación de la absortividad apropiada de la proteína y también pueden utilizarse para la determinación cuantitativa del contenido de proteínas. Este procedimiento sin embargo, es más complicado que los ya descritos, aunque también se obtienen resultados exactos y reproducibles.

9.4.2 ANALISIS DE AMINOÁCIDOS

El análisis de aminoácidos es un método químico clásico para la determinación de la composición de los aminoácidos de proteínas y péptidos. El método consiste en la hidrólisis completa de una proteína o péptido en sus componentes; aminoácidos, los cuales se separan cromatográficamente y se cuantifican. El análisis de aminoácidos, además, puede ser usado para determinar tanto la composición de aminoácidos de un producto (por ejemplo; pruebas de identidad) como para determinar la cantidad total de proteína presente. El método tiene algunas dificultades inherentes, tales como: la posible destrucción completa o parcial de algunos aminoácidos, que puede ser evitado al desarrollar la metodología analítica apropiada. El aminoácido triptofano es destruido por hidrólisis con ácido clorhídrico 6N y así, cuando esté presente este aminoácido deben emplearse condiciones alternas de hidrólisis. Los aminoácidos treonina y serina pueden ser parcialmente destruidos bajo estas mismas condiciones, mientras que los péptidos enlazados entre residuos hidrofóbicos voluminosos tales como valina e isoleucina pueden ser más resistentes a la hidrólisis, en ambos casos, se producen valores menores que los reales. Por consiguiente, debe establecerse el análisis de los tiempos adecuados de hidrólisis para compensar estos factores. La cisteína y la metionina pueden requerir pre-oxidación a ácido cístico y sulfona-metionina respectivamente, para su exacta cuantificación. Cada proteína específica puede requerir un procedimiento particular respecto a condiciones de hidrólisis, las cuales deben ser optimizadas para el análisis de sus aminoácidos para obtener resultados confiables.

El análisis de aminoácidos se desarrolla en dos etapas: la primera etapa involucra la hidrólisis de la proteína en sus componentes. Esta hidrólisis se realiza normalmente con ácido clorhídrico 6N a una temperatura de alrededor 110°C por 24 horas. Algunas proteínas pueden requerir condiciones de hidrólisis por mas tiempo o en condiciones más severas. La segunda etapa es la separación y cuantificación de los aminoácidos individuales por alguna forma de cromatografía que puede ser desarrollada con derivatización pre o post columna. Un gran número de procedimientos de derivatización de pre-columna están disponibles tales como: OPA, fenilisotiocianato (PITC) y fluorenilmetoxi-carbonil(FMOC). Estos derivados son entonces separados por HPLC en fase reversa y cuantificados por detección con UV o fluorescencia. Los métodos de derivatización post-columna involucran la separación de los aminoácidos componentes por cromatografía de intercambio iónico de alta eficiencia (HPIEC) seguida por reacción post-columna con un cromóforo tal como ninhidrina y la siguiente cuantificación por detección por UV/visible. Todos estos métodos son adecuados para desarrollar el análisis de los aminoácidos y cada uno tiene sus ventajas y desventajas inherentes. Los derivados OPA son muy simples de preparar y son sensibles, requiriendo solo una pequeña cantidad de muestra, pero ya que son inestables tienen que ser analizados por cromatografía inmediatamente después de la preparación. Por otro lado, los derivados feniltiocarbamil (PTC), son relativamente más estables. La derivatización

post-columna con ninhidrina se desarrolla, generalmente, sin necesidad de presión y tiene la ventaja de la estabilidad del hidrolizado de aminoácido. Sus desventajas son que es necesario una doble detección, en 440nm y 570 nm.

9.4.3 SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS

La secuenciación de proteínas es útil en el control de calidad de proteínas biológicas porque pueden proveer información de la estructura primaria, por ejemplo: estructura del amino terminal y/o carboxi terminal. Para derivados biológicos del DNA recombinante, esta metodología tiene el propósito adicional de confirmar, la predicción de la secuencia de aminoácidos del DNA complementario (cDNA), la homogeneidad de las proteínas y el potencial del corte proteolítico. Para anticuerpos monoclonales, esta técnica es usada para determinar la homogeneidad de la proteína. La secuenciación de proteínas tiene varias aplicaciones ya sea para procedimientos de secuenciación del amino terminal como para carboxi terminal.

SECUENCIACIÓN DEL AMINO TERMINAL. El análisis de secuenciación del amino terminal es una técnica química para proteínas que produce información significativa acerca de la estructura primaria (secuencia), la homogeneidad y sobre la presencia de rupturas conocidas y/o desconocidas en el polipéptido. Para el análisis de secuenciación del N-terminal se han desarrollado un gran número de secuenciadores de péptidos automáticos que están disponibles comercialmente. El método está basado en la reacción de acoplamiento del residuo amino terminal de una proteína o péptido con fenilisotiocianato (PITC). El derivado resultante PITC-aminoácido es separado de la proteína por un ácido orgánico perfluorinado (generalmente ácido trifluoroacético o ácido heptafluorobutírico) el cual deja expuesto el aminoácido adyacente. El siguiente aminoácido sirve como un nuevo N-terminal y es derivatizado en el subsecuente ciclo de acoplamiento y ruptura. Este proceso se repite hasta que es removido un número apropiado de aminoácidos normalmente de 8 a 10. El residuo de aminoácidos modificado resultante del ciclo de ruptura [anilinothiazolina (ATZ)], es generalmente convertido en presencia de ácido y calor al aminoácido feniltiohidantoína (PTH-AA). El PTH-AA puede ser determinado siguiendo el análisis de HPLC en fase reversa. Cualquier ruptura intracadena así como la heterogeneidad del N-terminal (ejemplo N-terminal de metionina) en los polipéptidos, podrán ser también secuenciados simultáneamente. Estos últimos producen picos más pequeños en el cromatograma y es posible la relativa cuantificación de la cantidad del N-terminal, así como la identificación de la localización del sitio de separación en el polipéptido. Este procedimiento para el análisis de secuenciación de proteínas puede también desarrollarse manualmente. Algunas limitaciones del método de secuenciación PITC son que el método es semicuantitativo (por ejemplo la cantidad del N-terminal solo puede ser estimada) y el PTH derivativo de serina y treonina pueden ser severamente degradados, haciendo difícil su determinación. Para determinar los residuos de cisteína éstos deben ser primero modificados por alquilación. Por otro lado, los aminoácidos glicina y prolina son lentos de rearreglar, de lo que resulta una menor dificultad en su determinación.

SECUENCIACIÓN DEL CARBOXI TERMINAL. La secuenciación de las proteínas desde el carboxi terminal también produce información de la estructura primaria, así como posibles rupturas del C-terminal. La degradación secuencial de una proteína en el C-terminal puede ser desarrollada por métodos químicos o enzimáticos. Pueden utilizarse las reacciones de la hidrazina, el tiocianato de amonio o el bromuro de cianógeno con las

proteínas para degradar secuencialmente la proteína en/o cerca del C-terminal. La reacción con tiocianato de amonio es ampliamente usada en proteínas acopladas a soportes sólidos. El C-terminal del aminoácido puede ser secuenciado por ruptura enzimática con exopeptidasas tales como carboxipeptidasas. Las limitaciones de uso de peptidasas son la contaminación potencial que pueden tener con endopeptidasas y la dificultad inherente e impredecible de la secuenciación. Se puede usar la espectrometría de masas directamente sobre digeridos de proteínas o en conjunción con mapeo de péptidos con HPLC para identificar el C-terminal de la proteína. Sin embargo, estos métodos son solo semicuantitativos.

9.4.4 MAPEO DE PÉPTIDOS POR HPLC

Para proteínas farmacéuticas, el mapeo de péptidos tiene dos propósitos primarios: como un método de identidad altamente específico y, en el caso de los productos derivados de la Biotecnología, pueden servir como una confirmación de la estabilidad genética. Este método es usado para comparar la estructura de la proteína de un lote específico de material con un material de referencia y/o estándar de referencia adecuado, o en lotes previos para confirmar la exactitud de la estructura primaria y confirmar la consistencia lote a lote (dentro de los límites de esta técnica). A menudo pueden ser separados e identificados los péptidos con grupos amino y carboxi terminales y péptidos conteniendo carbohidratos. Esta última aplicación es una herramienta valiosa en el mapeo de péptidos de proteínas glicosiladas como son los anticuerpos monoclonales. El mapeo de péptidos es un método que puede usarse para determinar la presencia de uno o múltiples aminoácidos incorrectos, que sean resultado de eventos tales como: una mutación de un solo punto o la fragmentación de la secuencia del DNA codificado.

El procedimiento involucra la fragmentación selectiva de la proteína en un número discreto de péptidos que son resueltos por algunas técnicas cromatográficas. La fragmentación se realiza con endoproteasas tales como: tripsina, quimotripsina, termolisina o proteasa V8 o por degradación química selectiva con bromuro de cianógeno que separa en sitios específicos de la molécula. La selección de la endoproteasa apropiada es dirigida por la secuencia primaria de la proteína. La tripsina rompe en lado C-terminal del residuo básico de lisina y arginina; la quimotripsina rompe después del residuo aromático del aminoácido fenilalanina, tirosina y triptofano; la termolisina rompe después de los residuos hidrofóbicos leucina, isoleucina y valina; proteasa V8 rompe después de residuos ácidos como ácido glutámico y ácido aspártico, y el bromuro de cianógeno rompe en residuos metionil. También pueden utilizarse otras enzimas como clostripaina (arginina) y endoproteinasas lis-C (lisina), y algunos métodos químicos, como ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico (cisteína). Cada uno de estos métodos tiene sus propias ventajas y desventajas establecidas. Una desventaja común de todas estas técnicas es el grado de corte no específico. Es importante que los péptidos generados de la digestión sean lo suficientemente grandes para proveer información estructural acerca de la proteína, y suficientemente pequeños para permitir su análisis y separación por una técnica como RP-HPLC. Por esta razón, y el hecho de que la ruptura con estas enzimas es casi cuantitativa, la tripsina es la enzima con la aplicabilidad más general para la mayoría de las proteínas. Para proteínas de pesos mayores que 60,000 daltons (alrededor de 520 aminoácidos), la ruptura con tripsina puede resultar en muchos fragmentos que dificultan el análisis, por lo que deben escogerse otras endoproteasas. Se utiliza la tripsina tratada con L-TPCK (tosil-L-fenilalanina-clorometil-cetona) ya que la TPCK inhibe la acción de la quimotripsina, un contaminante presente en muchas preparaciones de tripsina. Por otro lado, la reacción con

bromuro de cianógeno rompe en residuos metionil a las proteínas que no contienen muchos de estos residuos; se obtienen, relativamente, pocos péptidos y éstos son generalmente demasiado largos o hidrofóbicos para la separación por HPLC.

Una vez que la digestión está completa, los péptidos son generalmente separados por RP-HPLC y/o HPIEC. La selección de la columna apropiada es empírica y variará para diferentes proteínas. Para RP-HPLC, los soportes de tamaño de poro de 100Å y de 300Å funcionan bien y la selección del soporte de sílica puede ser un criterio importante para lograr una óptima separación. Para péptidos más pequeños generados por estas digestiones, se ha encontrado que generalmente las fases estacionarias C8 y C18 son más eficientes que soportes de C4. Los disolventes comúnmente más utilizados para las separaciones en fase reversa son agua y acetonitrilo conteniendo una cantidad importante de ácido trifluoroacético (~0.1%). El buffer de la fase móvil contiene fosfato y ofrece excelente selectividad dependiendo del pH. La selección por efecto del pH en el rango 3.0 y 5.0 causa una alteración de péptidos que contienen residuo ácido, por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico. Se cuenta con menos información, para separaciones de intercambio iónico, sin embargo se informa que se han utilizado con éxito soportes con sílica y soportes poliméricos como soportes estacionarios de intercambio iónico débiles o fuertes. Ya que muchos de los péptidos son poco hidrofóbicos, puede ser necesaria la adición de pocas cantidades de solventes orgánicos en la fase móvil, por ejemplo metanol o acetonitrilo del 5 al 10%. Una desventaja potencial del análisis HPIEC de mezcla de péptidos es que algunos péptidos neutros o péptidos que tienen la misma carga que el soporte no pueden ser retenidos en la columna y así no pueden ser separados o identificados por este método.⁽⁹⁾

Es importante mencionar que ya se encuentran a la venta equipos que realizan el mapeo de péptidos de manera rápida y eficaz.⁽⁷²⁾

9.4.5 INMUNOENSAYOS

Los inmunoensayos son usados tanto como métodos para identificar y cuantificar la proteína de interés o como método para detectar el perfil de impurezas y cuantificar como impurezas las proteínas de la célula huésped. Ya que estas impurezas de proteínas pueden representar un gran número de impurezas potenciales, los inmunoensayos deben ser sensibles y selectivos para detectar tantas impurezas como sea posible.

El inmunoensayo desarrollado para proteínas de *E. coli* (Ecp) y para proteínas de ovario de hámster chino (CHO) pueden medir estas impurezas a muy bajos niveles. Los inmunoensayos adicionalmente pueden servir como ensayos de potencia para anticuerpos monoclonales, utilizando un antígeno apropiado.

Los inmunoensayos consisten de un grupo de pruebas que dependen de la gran afinidad específica de interacciones antígeno-anticuerpo. Estas pruebas incluyen análisis de radioinmunoensayos (RIAs) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los RIAs son realizados en fase líquida o sólida usando un anticuerpo directo no marcado contra la proteína de interés radiomarcada. El principio del RIA es que la inhibición del enlace del antígeno marcado con el anticuerpo no marcado, se compara con la inhibición por estándares conocidos, permitiendo así la cuantificación de la proteína de interés.

El ensayo inmunoradiométrico (IRMAs) o RIA sandwich emplea 2 preparaciones de anticuerpos que son usados para intercalar la proteína de interés. El primer anticuerpo no está marcado y es específico para la proteína de interés, y el segundo anticuerpo está radiomarcado y puede ser específico para la proteína o para el primer anticuerpo. El complejo antígeno-anticuerpo es aislado y se determina la cantidad de radioactividad y por

lo tanto de la proteína de interés. El desarrollo de un RIA o IRMA para un producto derivado de la Biotecnología requiere atención cuidadosa para la preparación del antisuero, para la preparación del anticuerpo marcado y la preparación de un estándar de referencia adecuado y métodos para la separación del antígeno libre del antígeno combinado (unido).

El formato ELISA comúnmente usado para el análisis de trazas de impurezas es el sándwich que usa 2 preparaciones de anticuerpos como el IRMA, pero sin radiomarcajes. El primer anticuerpo no está marcado y el segundo anticuerpo tiene conjugada una enzima peroxidasa (HRP) o fosfatasa alcalina. Básicamente, el método ELISA consiste en la aplicación de una capa de anticuerpos purificados contra la proteína de la célula huésped en una placa de microtitulación seguido por la proteína (producto). Se adiciona el conjugado enzima anticuerpo y se permite que se ligue el anticuerpo enlazado a proteínas de la célula huésped. Se adiciona un sustrato apropiado para desarrollar color, que es analizado en una placa espectrofotométrica. Las pruebas ELISA como un multiantígeno requieren de preparaciones del estándar de referencia que sea representativo de las impurezas apropiadas de la célula huésped, para servir como inmunógenos para la preparación de los anticuerpos usados en las pruebas. Esta preparación de los estándares de referencia es usualmente elaborada en el proceso de producción, considerando las proteínas de la célula huésped de toda la corrida productiva excepto las del producto.

Es necesaria la total ausencia del producto (proteína de interés) en esta preparación para evitar la producción de anticuerpos para el producto en sí mismo cuando se pesa el estándar de referencia como inmunógeno. Debido a las afinidades variables de los anticuerpos policlonales, no se puede garantizar la exactitud absoluta de los métodos multiantígenos ni la habilidad del método para detectar cada antígeno potencial.

9.4.6 ELECTROFORESIS

Las pruebas electroforéticas, están entre las más comunes y poderosas de las pruebas usadas para evaluar la pureza y homogeneidad de la proteína. Son valiosas no solamente para la evaluación inicial y liberación de los productos derivados de la Biotecnología, sino también como métodos indicadores de estabilidad para detectar cambios moleculares o químicos en las moléculas como resultado de desnaturalización, agregación, oxidación, deaminación, etc. El uso de estos métodos se facilita por su simplicidad y sus requerimientos, de pequeñas cantidades de la muestra (microgramos). Los 2 tipos de ensayos electroforéticos usado a menudo para productos derivados de la Biotecnología son la electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y enfoque electroforético isoelectrico (IEF).^(9,73)

El método SDS-PAGE separa proteínas primero por su peso molecular porque en la presencia del detergente aniónico SDS se forma un complejo proteína-SDS cargado negativamente. La muestra es primero desnaturalizada en el detergente que rompe los enlaces no covalentes e intermoleculares que mantienen a las proteínas juntas y entonces es directamente electroforizado en el soporte de gel de poli(acrilamida). La migración de las proteínas a través del gel es proporcional a su tamaño, así que las proteínas pequeñas migrarán más rápido que las más grandes. Las muestras son a menudo electroforizadas bajo condiciones reducidas y no reducidas para determinar si están presentes impurezas del mismo peso molecular o si hay rupturas proteolíticas intramoleculares de la proteína de interés. Aún cuando el SDS-PAGE no reducido es usado comúnmente para estimar el estado de agregación y/o oligomerización de la proteína de interés, este método solo permitirá la observación de agregados u oligómeros que son estables en la presencia de

SDS y las condiciones usadas para la preparación de la muestra y la electroforesis. En proteínas que contienen múltiples cadenas unidas por enlaces disulfuros, éstos son rotos y separados en sus cadenas individuales de polipéptidos. La detección de la muestra después de la electroforesis puede ser cualitativa o cuantitativa con la aplicación de análisis densitométricos con el colorante azul brillante de Coomassie, y la sensibilidad se ve incrementada en el rango de nanogramos. El SDS-PAGE acoplado con el colorante azul brillante de Coomassie es usado para determinar cuantitativamente la pureza de la muestra con respecto a dímeros y grandes agregados covalentes y fragmentos. Cuando el método se combina con la técnica del colorante de plata se puede asegurar la presencia de bajos niveles o trazas de una nueva impureza, esto se realiza por la comparación directa de la muestra electroforizada con el material de referencia y/o estándar de referencia electroforizado bajo condiciones reducidas y no reducidas. Generalmente el método del colorante de plata, se usa cualitativamente porque es relativamente inconsistente el potencial de variación del enlace de la plata proteína a proteína.

Se puede obtener una estimación de la cantidad de una impureza por electroforesis de una cantidad conocida de un estándar interno, como la albúmina de suero de bovino o diluciones menores de las proteínas de interés aplicados en otros carriles del mismo gel. La separación SDS-PAGE de una proteína puede combinarse con un método inmunológico, por ejemplo: *immunoblotting*. El resultante *western blot* es usado para determinar la identidad de una banda electroforética (por ejemplo, productos relacionados o proteínas de la célula huésped como impurezas). Después de la electroforesis, las proteínas separadas son transferidas dentro de una membrana de nitrocelulosa o PVDF (polivinilideno difluoruro) y se someten a reacción con el anticuerpo de interés. La visualización del complejo se hace con anticuerpos enzimáticamente marcados o radiomarcados.

El método IEF separa las proteínas basándose en sus cargas en un campo eléctrico. Las cargas en una proteína se originan de varias fuentes, debido a su composición de aminoácidos, como aminos protonados, grupos carboxilos o residuos de tirosina, residuos de cisteína oxidados y residuos deamidados. Sin embargo, para cada proteína hay un pH en el cual la proteína es isoelectrónica y unas cargas cancelan a otras, siendo la carga neta efectiva cero. El IEF se ejecuta generalmente en un soporte de poro suelto de poli(acrilamida) o gel de agarosa conteniendo anfólitos (iones de bajo peso molecular anfotéricos) que proporcionan un gradiente de pH y su migración dentro de la matriz cuando se aplica un campo eléctrico. Simultáneamente, en la presencia de un campo eléctrico, las proteínas cargadas positivamente migrarán hacia el cátodo y las proteínas cargadas negativamente migrarán hacia el ánodo. La migración se detiene cuando cada proteína alcanza el valor de pH en el gradiente del soporte, donde su carga neta es cero. Esto es el punto aparente o punto isoelectrónico (PI) de la proteína. Ya que la migración de una proteína es dependiente de su composición de aminoácidos, las formas alteradas de esta proteína y otras proteínas como impurezas migrarán en diferentes puntos del soporte. Los gels de IEF pueden ser coloreados con azul brillante de Coomassie o colorante de plata para visualizar la proteína. La IEF es empleada como una herramienta para determinar la identidad o asegurar la homogeneidad de una proteína (por ejemplo anticuerpos monoclonales) con un patrón de bandas con el rango correcto del punto isoelectrónico. El método también puede ser usado para evaluar la estabilidad de un producto biológico. La deaminación de proteínas (por ejemplo; residuos de la deaminación de glutamina o asparagina) durante los inicios de la producción darán un nuevo grupo ácido carboxílico y resultarán moléculas con un PI más ácido. El IEF puede proveer información sobre el estado de glicosilación de glicoproteínas como los anticuerpos monoclonales, los cuales pueden aparecer en muchas bandas por los cambios en la carga aparente en la molécula de

la proteína como resultado del residuo del ácido siálico. Los patrones de gel de IEF son usualmente más complicados de interpretar que los de SDS-PAGE y pueden requerir muchas suposiciones o juicios subjetivos para interpretarlos.

Los avances recientes de la tecnología han permitido el desarrollo de la electroforesis capilar de alta resolución (HPCE), que ofrece las ventajas potenciales de una muy alta resolución de proteínas.

9.4.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Los métodos cromatográficos han sido ampliamente estudiados para la determinación de la pureza de moléculas orgánicas y proteínas como por ejemplo, insulina y en la determinación de la concentración del ingrediente activo y/o concentración de excipientes de los productos farmacéuticos. Los métodos cromatográficos son también muy efectivos en la determinación de la pureza de productos farmacéuticos obtenidos por técnicas recombinantes. Sin embargo, la cromatografía de proteínas es mucho más difícil debido a las múltiples interacciones de tamaño, forma, carga e hidrofobicidad de las mismas. Los métodos cromatográficos comúnmente utilizados para el perfil de proteínas recombinantes son: cromatografía de líquidos en fase reversa RP-HPLC, cromatografía de exclusión de tamaño (HPSEC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HPC). Estos métodos involucran la separación de proteínas y son usados para determinar la pureza de las sustancias (fármacos) así como los niveles de impurezas conocidas o productos de degradación. Una complicación que se presenta en todos los métodos cromatográficos de columna, es la determinación del balance de masas entre la columna de carga y la columna elutora. Sin embargo, las técnicas HPLC son valiosas para determinar la pureza y la potencia de las proteínas farmacéuticas. Los análisis más comunes RP-HPLC son ejecutados sobre columnas conteniendo como fase estacionaria soporte de sílica gel C4 y un C8. Las fases estacionarias C18 también se han usado pero más a menudo, se han utilizado para péptidos más pequeños, como una aplicación en el mapeo de péptidos. Los soportes con tamaño de poro de al menos 300Å se recomiendan para proteínas de gran peso molecular, alrededor de 10,000 daltons. Para la mayoría de los análisis por RP-HPLC, las proteínas son eluidas con gradientes acuosos de acetonitrilo y de ácido trifluoroacético que se mantiene a concentración constante en 0.1%. Se han usado otros buffers tales como fosfato o Tris [tris (hidroximetil)aminometano], en los cuales se puede ajustar el pH para aumentar la selectividad y llevar a cabo una óptima separación.

El HPIEC, es un método importante para la determinación de la pureza del producto. Estas separaciones están basadas en cambios en las cargas de las moléculas y son útiles tanto para la identificación como la cuantificación de impurezas comunes en proteínas farmacéuticas, ya sea por oxidación (metionina oxidada) o por formas deaminadas (glutamina y asparagina) y/o formas fragmentadas. Pueden utilizarse las fases estacionarias de intercambio iónico (fuertes o débiles) sobre cualquiera de los siguientes soportes: soporte de sílica o soporte polimérico. La cromatografía de intercambio catiónico puede ser realizada sobre resinas tipo sulfopropilo y son efectivas para distinguir productos de oxidación y deamidación. Las proteínas están típicamente cargadas dentro de una columna equilibrada con agua o un buffer débil y eluye con un gradiente de sal, por ejemplo NaCl de 0 a 1M.

El HPSEC es una técnica que puede proveer información sobre los niveles de agregación y fragmentación de una proteína farmacéutica. Dependiendo de la información que se necesite, la fase móvil puede ser común conteniendo un buffer acuoso tal como fosfato 100 mM, pH = 7 o puede estar desnaturalizado conteniendo un bajo nivel de un

detergente tal como SDS al 0.1%. Los análisis se realizan isocráticamente con detección generalmente entre 210nm y 220nm dependiendo del buffer utilizado. Puede hacerse la detección a 280 nm pero con menor sensibilidad. La cromatografía clásica de exclusión de tamaño se ha realizado sobre soportes poliméricos blandos como dextranas entrecruzadas, poli(acrilamida) o agarosa. Estos, sin embargo, son más adecuados para aplicaciones a baja presión. Debido a esto, se ha desarrollado un gran número de soportes con fuerza mecánica incrementada, que están disponibles comercialmente. La HPSEC es también útil para la determinación de formas fragmentadas de proteínas. Las cadenas fragmentadas a menudo permanecen ligadas directamente a los enlaces disulfuros de los residuos de cisteína. El tratamiento de la muestra con un agente reductor como el ditiotreitolo o mercaptoetanol pueden romper los enlaces disulfuro y separar las cadenas. Las cadenas fragmentadas pueden entonces ser resueltas de las formas no fragmentadas por HPSEC.

El HIC, provee separación de proteínas basado en diferencias de hidrofobicidades bajo condiciones suaves de absorción y elución que generalmente previene la desnaturalización y subsecuente pérdida de actividad biológica. Se usa una fase estacionaria que es débilmente hidrofóbica con un buffer acuoso en la fase móvil y una concentración de sal inicialmente alta para absorber la proteína, que entonces es selectivamente eluida usando un gradiente decreciente de sal. Las interacciones ocurren entre los residuos de aminoácidos no polares que están expuestos en la superficie de la proteína y los grupos hidrofóbicos que están presentes en la matriz cromatográfica. Se han desarrollado un número de soportes basados en sílica y soportes poliméricos combinados con ligandos débiles hidrofóbicos tales como; poliéteres, feniléteres o cadenas de alquillos cortas para usar en HIC. Esta técnica puede ser usada en el análisis, purificación y caracterización de muchas proteínas hidrofóbicas lábiles. La retención de proteínas y la selectividad pueden ser modificadas por el control de variables tales como: el tipo y la concentración de las sales, pH, y efectos del ion selectivo, temperatura y diseño del gradiente así como por la selección cuidadosa de la fase estacionaria.

9.4.8 PRUEBAS CUANTITATIVAS

Ensayos biomiméticos (ensayos que imitan el efecto biológico de los productos), son de principal importancia en la discusión de ensayos para los productos derivados de la Biotecnología. Estas pruebas miden la actividad de los productos y aseguran que sean eficaces. Esencialmente, existen 3 principales tipos de ensayos cuantitativos: ensayos en modelos de animales, ensayos basados en cultivo de células y pruebas in vitro (físicoquímicas). Cada uno de estos ensayos tiene su aplicación en el control de productos biológicos. Independientemente del tipo de ensayo cuantitativo empleado, es deseable y en algunos casos, necesario el uso de un ensayo biomimético.

ENSAYOS EN MODELOS DE ANIMALES: El ensayo biomimético en modelos de animales ha sido desarrollado para uso de rutina. A pesar de que estos ensayos tienen una relativa larga historia de uso, que presentan varias desventajas importantes como el gran número de animales y la destreza en el manejo apropiado de los mismos que se requiere, el alto costo de análisis, el tiempo de análisis (por varios días o semanas) y la pobre reproducibilidad de los resultados. Sin embargo, sigue siendo el método de elección en los casos en que los ensayos basados en cultivos celulares in vitro no han sido desarrollados y/o no han demostrado que son de igual o mayor valor. Un ejemplo de esto es el ensayo que se usó para evaluar la actividad de la Hormona Humana de Crecimiento (somatrem y somatropina). La Hormona Humana de Crecimiento es determinada con un bioensayo

basado en la ganancia de peso en ratas. Las ratas hembras hipofisectomizadas son monitoreadas por la ganancia de peso durante un periodo de 11 días después de inyecciones diarias con la Hormona Humana de Crecimiento. La potencia relativa de la muestra en prueba es obtenida por comparación estadística de la actividad de la muestra con un estándar de referencia o material de referencia. Los modelos de animales pueden ser usados como pruebas de bioidentidad siempre y cuando se cuenten con ensayos biológicos desarrollados in vitro y/o fisicoquímicos para medir la potencia del producto.

ENSAYOS BASADOS EN CULTIVOS CELULARES: Este grupo de ensayos es comparativamente más fácil de realizar, da resultados más rápidos (1 a 3 días) y es considerablemente menos caro y necesita menos recursos que el ensayo con modelos de animales. Los bioensayos basados en cultivos celulares proveen información sobre el efecto de un producto biológico en un sistema vivo, son imprecisos como una consecuencia de las variables características de las células vivas, sin embargo pueden ser menos imprecisos que los ensayos en modelos animales. Estas pruebas pueden ser automatizadas y por lo tanto pueden ser repetidas suficientemente para proveer una relativa reproducibilidad y resultados exactos. Un ejemplo de este tipo de ensayos es la medición de la actividad antiviral del Interferon- α -Humano, en una línea celular humana de carcinoma pulmonar. (A549). Este ensayo es realizado en placas de microtitulación por incubación de células con Interferon- α y el subsecuente reto con virus de la encefalomiocarditis. Las células que sobreviven son detectadas por su enlace a un colorante y se calcula la dilución del Interferon- α donde ocurre una protección al 50% de la monocapa.

ENSAYOS IN VITRO (FISICOQUÍMICOS): Este grupo de pruebas no depende de un modelo vivo, pero está usualmente basado en la acción química de un producto biológico. Estos métodos son comparativamente simples, rápidos, precisos y exactos. La actividad del Plasminógeno Activador de Tejidos (Alteplase), por ejemplo, puede ser determinada con un ensayo in vitro de la lisis del coágulo que puede ser automatizado y puede proveer los resultados requeridos en unas horas. Un coágulo sintético de fibrina es formado en la presencia de plasminógeno como resultado de la acción de la enzima trombina sobre fibrinógeno. Cuando se añade el Alteplase, el plasminógeno se convierte en la enzima activa plasmina, que entonces lisa al coágulo sintético. El punto final del ensayo es seguido espectrofotométricamente o visualmente por observación de la liberación de burbujas de aire atrapado, otra ventaja de este tipo de ensayos, debido a su precisión y exactitud, es que pueden ser usados para proveer estimaciones confiables de la estabilidad del producto. Se han desarrollado ejemplos in vitro basados en Anticuerpos: antígeno y proteína; ligando (receptor) para aplicaciones específicas. Este tipo de ensayos ofrece muchas ventajas en sus aplicaciones para determinar la potencia de anticuerpos monoclonales u otras proteínas con ligandos altamente específicos cuya reactividad incluye un paso de enlazamiento.

9.4.9 DETERMINACIÓN DE ADN

El ADN residual de la célula huésped es una impureza potencial del proceso de manufactura de los productos derivados de la biotecnología. El ADN residual es único para cada producto porque es dependiente del organismo huésped y del procedimiento de recuperación usado en fabricación del producto. Aún cuando no han sido reportados los efectos adversos en la salud debido al contenido de ADN en biológicos, las agencias

regulatorias han pedido a los fabricantes asegurar que los niveles de ADN en los productos derivados de la Biotecnología se reduzcan a bajos niveles.

La técnica de hibridación del ADN es la más sensible de las pruebas de rutina disponibles para determinar el contenido de ADN en el producto. Es necesario realizar un ensayo del proceso de purificación para demostrar que se han alcanzado bajos niveles de ADN desde las etapas tempranas en los procesos de fabricación. El método depende de la hibridación del ADN celular de la muestra con cualquier marcador específico, por ejemplo ^{32}P o químicamente modificado.

El análisis es desarrollado en primer lugar por el aislamiento de cualquier ADN residual en la muestra por una técnica que puede incluir hidrólisis de la proteína, cromatografía, extracciones orgánicas y precipitaciones alcohólicas. El ADN aislado es desnaturado y es entonces aplicado a lo largo de una membrana de nitrocelulosa o nylon con un set de estándares diluidos del ADN huésped. Los controles del ADN positivos y negativos son también aplicados a la membrana puede ser secada a aproximadamente 80 grados o colocada bajo luz UV para asegurar el enlace del ADN a la membrana.

El ADN de prueba se prepara por traslación, primero por síntesis al azar o por modificación química de un extracto de ADN de la célula huésped. El ADN de prueba es purificado y finalmente desnaturado térmicamente a 95 grados. Se añade a la membrana tratada por secado o luz UV y se permite la hibridación con el ADN de la muestra a aproximadamente 42 grados en presencia de formamida por 24 a 48 horas. La membrana es colocada sucesivamente entre 2 películas de rayos X y expuesta para producir una autorradiografía o es desarrollada por medios inmunológicos utilizando un sistema de enzimas conjugadas/substrato similar a ELISA y/o Western/blot.

El ADN de la muestra es estimado por comparación visual de la intensidad del punto de la muestra con los estándares de ADN diluidos. El autorradiograma puede ser también escaneado por densitometría óptica.

La sensibilidad de los ensayos por ejemplo de 10 a 250 picogramos es determinada por el límite de detección visual por arriba del origen de los estándares de ADN en serie.

Se han desarrollado otros métodos para determinación de ADN usando la tecnología de biosensores. Esta metodología comúnmente determina las impurezas totales de los ácidos nucleicos/ADN, más bien que del ADN específico de la célula huésped. Esta tecnología puede llegar a ser totalmente valiosa en el futuro, especialmente cuando se desarrollen más métodos de enlace de ADN específicos. Finalmente, el desarrollo reciente de la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que involucra la amplificación del ADN, puede proveer información útil para la detección e identificación del ADN contaminante. Sin embargo, el uso cuantitativo de esta tecnología requerirá de mayor desarrollo.

9.4.10 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Una de las posibles modificaciones postranslacionales que ocurren en las proteínas es el ataque a las cadenas covalentes de oligosacáridos. La glicosilación es una característica de proteínas recombinantes que son expresadas de líneas celulares eucarióticas. Sin embargo, la cadena de polipéptidos de una glicoproteína es sintetizada bajo el control directo del código genético, los oligosacáridos que no son productos genéticos primarios, son sintetizados por enzimas conocidas como glicosiltransferasas. Esta síntesis resulta en una microheterogeneidad de la cadena de carbohidratos. También la glicosilación es dependiente de la línea celular, así las glicoproteínas con cadenas idénticas de péptidos hechas en diferentes líneas celulares pueden tener considerables diferencias en

la estructura de los carbohidratos. Los azúcares comúnmente encontrados en las glicoproteínas incluye azúcares neutros (D-galactosa, D-manosa y D-fucosa), aminoazúcares (N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina) y azúcares ácidos (ácido siálico).

Hay dos principales posibilidades para determinar el azúcar covalentemente unido a la glicoproteína, que puede ser desarrollada por varios métodos. La primera es que los azúcares neutros y el ácido siálico pueden ser determinados por simples pruebas colorimétricas. El total de azúcares neutros puede determinarse siguiendo reacciones con fenol y ácido sulfúrico y midiendo la absorbancia de la solución a aproximadamente 550 nm y puede compararse con una curva estándar. Los azúcares neutros individuales se pueden determinar a través de una hidrólisis ácida por varios métodos. No derivatizados, se pueden separar por HPIEC a pH alto y cuantificarlos por detección de pulso amperimétrico. También pueden ser convertidos a peracetatos de aditol, con anhídrido acético, con acetatos de aldonitrilos, con clorhidrato de hidroxilamina y piridina, previa a la peracetilación el derivado se separa por cromatografía de gases.

La segunda posibilidad para la determinación de la composición de carbohidratos es la liberación y separación de estructuras individuales de oligosacáridos unidos covalentemente a la glicoproteína. Esto requiere una comprensión de las estructuras atacadas. El ataque de los azúcares de las proteínas puede ocurrir en dos rutas principales: a través de un enlace O-glicosídico que involucra el grupo hidroxilo de la serina, treonina o aminoácidos modificados, tales como hidroxilisina o hidroxiprolina a través del enlace N-glicosídico de asparagina. El enlazado o-oligosacárido puede ser liberado químicamente por hidrazinólisis o enzimáticamente por una variedad de glucosidasas específicas, por ejemplo: endo H, endo F o péptido N-glicanasa. Los oligosacáridos pueden ser separados por HPIEC a pH alto y cuantificarlos con detección de pulso amperimétrico. Esto resulta en un mapa análogo al de oligosacáridos o carbohidratos de péptidos para la proteína.

9.4.11 DETECCIÓN DE AGENTES ADVENTICIOS Y ENDÓGENOS

Los ensayos específicos de la Biotecnología se enfocan sobre la detección de bacterias, hongos, micoplasmas y virus. Esto refleja la posible contaminación que pueda ocurrir en ambas, la fermentación bacteriana y el cultivo de células de mamíferos. El control es ejercido en una variedad de rutas incluyendo la caracterización del banco maestro de semillas y el banco de células de trabajo, para asegurar que están libres de estos contaminantes, la evaluación de las materias primas, el diseño y la operación de los sistemas de manufacturas cerrados, las pruebas de lotes de producción y validación de procesos específicos de manufactura para asegurar que los contaminantes son inactivados o la ausencia de bacterias y hongos es evaluada por la prueba de esterilidad. Las pruebas de micoplasma son desarrolladas por métodos de cultivo estándar empleando incubación aeróbica y anaeróbica en placas sólidas y semisólidas, caldo en tubos y debe cumplir con lo que establece el Código Federal de Regulaciones (21 CFR 610.12). Adicionalmente, los micoplasmas no cultivados son detectados microscópicamente usando el método de tinción de Hoechs bis-benzimida.

Entre los métodos que se usan para la detección de contaminación de virus adventicios en líneas celulares se incluyen: la inoculación de indicadores de líneas celulares seleccionadas por su habilidad para soportar la replicación de un extenso rango de virus y posterior monitoreo con marcadores para infecciones de virus, tales como citopatología, hemoadsorción, hemoaglutinación e inmunofluorescencia. La inoculación de animales

intactos y el monitoreo por enfermedad y muerte; la inoculación de animales y después de 4 semanas, colección y evaluación del suero para anticuerpos a virus específicos de interés y ensayos inmunológicos específicos o pruebas de exploración genética para algunos virus de interés que no pueden ser detectados por los otros métodos enlistados.

La expresión de genes de retrovirus endógenos es altamente variable entre diferentes células de mamíferos y líneas celulares. La naturaleza no predecible de su expresión y la diversidad de sus propiedades bioquímicas y biológicas impide el uso de una sola prueba y en su lugar requiere una estrategia de pruebas integradas. Los métodos de prueba, generalmente usados incluyen microscopía de transmisión electrónica de células obtenidas del banco de células maestro y pellets ultracentrifugados libres de células y cosecha de cultivo de células; varios ensayos por infecciones por retrovirus que usan indicadores susceptibles de retrovirus en líneas celulares, la actividad de la transcriptasa reversa; y la inducción de retrovirus en células del banco maestro de células con reactivos químicos conocidos por inducir los retrovirus. En adición a los métodos clásicos virológicos, se han comenzado a utilizar nuevas técnicas, tales como exploración molecular de hibridación para realizar estas evaluaciones.⁽⁹⁾

10. DISCUSIÓN

La Biotecnología representa una nueva oportunidad en el desarrollo tecnológico para la resolución de problemas tales como la cura, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, ecología, alimentación, etc. mediante el uso de estrategias científico tecnológicas.

En general la Biotecnología puede:

- ✓ Producir proteínas humanas de reemplazo a gran escala.
- ✓ Desarrollar nuevos fármacos que no pueden obtenerse de otra manera.
- ✓ Contribuir al desarrollo de medicamentos más específicos, eficaces y con menores efectos colaterales.
- ✓ En los medicamentos que tradicionalmente se han obtenido de animales, al utilizar las técnicas biotecnológicas se elimina el riesgo de la contaminación con patógenos.

Debido que la salud pública es y seguirá siendo una gran preocupación social y política, es evidente que el desarrollo futuro del país enfrentará importantes retos que tendrá que superar si quiere mantener un crecimiento sano de la población como parte de una política de desarrollo y de respeto a la naturaleza y al medio ambiente. El uso de la Biotecnología apoyará para la solución de estos problemas.

En México, prácticamente toda la investigación en el campo de la Biotecnología para la generación de vacunas, métodos de diagnóstico, terapia génica, evaluación de enfermedades en humanos utilizando animales transgénicos, en la producción de proteínas recombinantes para el tratamiento del cáncer, hemofilia, SIDA, etc. se desarrolla en centros e institutos gubernamentales o dependientes de las universidades, para que no se limite el desarrollo de la Biotecnología es necesario que se involucre al sector privado.

Por lo que se requiere que la investigación nacional contribuya a la instrumentación y generación de nuevas tecnologías en esta área, con el propósito de iniciar y consolidar la producción de insumos que sustituyan a los que actualmente importamos.

Actualmente la tendencia en esta área está dirigida fundamentalmente a terapias con tres segmentos de mercado:

- ✓ Enfermedades infecciosas (terapias de inmunoglobulinas, choque séptico y SIDA).
- ✓ Cáncer (de colon, células sanguíneas, de ovario, pulmón, mama y mieloma).
- ✓ Problemas de adhesión celular (enfermedades autoinmunes, trasplantes alergias y coágulos sanguíneos).

Es muy importante ampliar el esquema regulatorio para el acceso y aprovechamiento de recursos biológicos y genéticos, y evaluar el costo beneficio de su utilización en la práctica médica.

El impacto de la Biotecnología moderna en las áreas estratégicas no es sólo tecnológico, sino que contribuye a mejorar de manera sustancial muchos de los medicamentos o procedimientos establecidos, lo cual aportará soluciones a problemas complejos como los asociados al desarrollo de algún tipo de cáncer.

Así mismo, debemos estar conscientes de las desventajas que puedan presentarse al usar la Biotecnología como son: las patentes de organismos vivos que afectará a los países con menor desarrollo científico y tecnológico, la posible pérdida de la autonomía académica en los centros de investigación por intromisión de la industria, los conflictos éticos que puede generar el mal uso de esta nueva tecnología, problemas ambientales y el costo ecológico y económico por una falta de compromiso con el medio ambiente.

11. CONCLUSIONES

La Biotecnología es una actividad multidisciplinaria que se sustenta en las técnicas y conocimientos de otras disciplinas y ofrece enormes posibilidades para influir positivamente en la salud y por ende en la calidad de vida de las personas, al ofrecer nuevas y mejores oportunidades de intervención en el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades, así como la rehabilitación de los enfermos.

El control y aseguramiento de calidad son herramientas necesarias para asegurar la pureza, potencia, inocuidad y seguridad de los fármacos y medicamentos biotecnológico.

Los profesionales de la Química en sus diferentes ramas (Q.F.B., Q., I.Q. y Q.A.) tienen un gran campo de trabajo si se preparan para abordar los diferentes aspectos que engloba la Biotecnología, fundamentalmente las áreas de producción y análisis de medicamentos biotecnológicos, representan un reto para el Q.F.B., que deberá desempeñarse con conocimiento, capacidad, competencia y calidad.

Las instituciones de educación superior deben incluir dentro de sus planes de estudios la formación en esta área, para que los egresados estén capacitados para poder desempeñarse adecuadamente en la misma.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Galindo F. Enrique. *Biotecnología: Oportunidades y Amenazas*. Ciencia y Desarrollo. N^o 80, Vol. XIV, 1988. Pp. 21-40.
2. Secretaría de Salud. *Reglamentos de Insumos para la Salud*. Feb-1998. Pp. 65-66
3. Mordejai Morris Strauch Miller. *Historia de la Biotecnología*. Ciencia y Desarrollo. N^o 84. Vol XIV, 1989. Pp. 19-32.
4. Farrés Amelia, Sánchez Sergio. *Evolución y perspectivas de los sistemas de Ingeniería Genética destinados a la producción de proteínas de interés industrial*. Boletín de Educación Bioquímica. Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Volumen 5, N^o 1, 1986. Pp. 24-30.
5. Prince Claus. *Perspective of Biotechnology*. H.R.H.. Proc. 4th European Congress on Biotechnology. V.4, 1987. Pp. 3-12.
6. Godown, D. *Biotechnology in U.S.A.*. Proc. 4th European Congress on Biotechnology. Vol.4, 1987. Pp. 277-287.
7. M.F.Cantley, L. H. Grimme and cols. *Social impacts and educacional aspects of Biotechnology*. Proc. 4th European Congress on Biotechnology. Vol. 4 1987. Pp. 637-942.
8. Bolívar Zapata, Francisco. *Biocnología Moderna. Retos y Oportunidades*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, 2001. Pp. 86-106.
9. United State Pharmacopaea 24, National Formulary 19, 2000. Pp. 67-70
10. Walker, J.M. and Gingolg, E.B. *Molecular Biology and Biotechnology*. Society of Chemistry. Edit. Royal. London, 1994. Pp. 23-27, 357
11. Gardnel, E. John, Simmons, J. Michael. *Principios de Genética*. Edit. Limusa. México, 1998. Pp. 206-207, 350, 367 – 373.
12. Smith and Wood. *Molecular Biology and Biotechnology*. Edit. Chapman and Hall. USA, 1995. Pp. 183, 185-231.
13. Gavilondo C. Jorge. *Anticuerpos Monoclonales*. Edit. Elfos. La Habana, 1995. Pp.9, 28-35,39,52-58.
14. Lin G. Wang X and cols. *Production of recombinant goldfish growth hormone I in a baculovirus expression system.. Chinese Journal of Biotechnology*. 1997, 13 (2): 91-107.
15. Uchida H. Naito N. Asada N. and Cols. *Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in Escherichia coli and properties of the purified product*. *Journal of Biotechnology*. 1997, Jun 13. 55 (2): 101 – 112.
16. Alam, K. S., Marimoto M. Yoshizato and H. Fujikawa. *Expression and purification of a mutant human growth hormone that is resistant to proteolytic cleavage by thrombin, plasmin and human plasma in vitro*. *Journal of Biotechnology* 1998 Oct 27. 65 (2-3): 183-190.
17. Kajino T., Saito Y., and cols. *Extracellular production of an intact and biologically active human growth hormone by the *Bacillus brevis* system*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 1997. 19(4): 227-31.
18. Ellegard L., Bosaeus I, and cols. *Low-doses recombinant human growth hormone increases body weight and lean body mass in patients with short bowel syndrome*. *Annals of Surgery*. 1997 Jan. 225 (1): 88-96.
19. Hogeveen, M. Noordam C. Otten B. *Growth before and during growth hormone treatment in children operated for craniopharyngioma*. *Hormone Research* 1997. 48

- (6): 258 - 262.
20. Fazio S. Cittadini QA. Sabatini D. Growth hormone and heart performance. A novel mechanism of cardiac wallstress regulation in human. *European Heart Journal*, 1997 Feb. 18(2): 340 - 347.
 21. Guyton, C. Arthur. *Tratado de Fisiología Médica*. 9ª Ed, Edit. Interamericana-McGraw-Hill. México, 1998. Pp. 513, 751.
 22. Fisher JW. Erythropoietin: Physiologic and Pharmacologic aspects. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*. 1997 Dec. 216 (3): 358-369.
 23. P. R. Vademeccum. Edit. Dinfor. México, 2001. Pp. I-IX.
 24. Mittleman, M. Zeidman A. & cols. Recombinant human erythropoietin in the treatment of multiple myeloma-associated anemia. *Acta Haematologica*. 1997. 98(4): 204-210.
 25. Courter S. & cols. A multicenter study of recombinant factor VIII (Recombine) in previously treated patients with hemophilia A. The Recombinate Previously Treated Patients Study Group. *White GC 2nd. Thrombosis & Haemostasis*. 1997 Abr, 77 (4): 660 - 667.
 26. Ryffel B. Safety of human recombinant proteins. *Biomedical & Environmental Sciences*. 1997 Mar.10(1) 65 - 72.
 27. Physicians GenRx. *The Completed Drug Reference*. U.S.A. 1994. Pp.11- 63, 11-136, 11-937, 11-1980.
 28. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 7ª edición. Año 2000. Pp.1825, 2193
 29. Fijnvandraat K. Berntorp E. and cols. Recombinant, B-domain deleted factor VIII (r-VIII SQ): pharmacokinetics and initial safety aspects in hemophilia A patients. *Thrombosis; Haemostasis*. 1997 Feb.77 (2) 298 - 302.
 30. Courter S. & Cols. A multicenter study of recombinant factor VIII (recombine) in Patients Study Group. *White GC 2nd. Thrombosis & Haemostasis*. 1997, Abr. 77 (4): 660 - 667.
 31. Roddie PH.& Ludlam CA. Recombinant coagulations factors. *Blood Reviews*. 1997 Dic. 11(4): 169 - 177.
 32. Kelly KM. Butler RB. Farace L. Superior in vivo response of recombinant factor VIII concentrate in children with hemophilia A. *Journal of Pediatrics*. 1997 Abr. 130 (4): 537 - 540.
 33. Stites, P. Daniel. *Inmunología Básica y Clínica*. 7ª ed. Edit. El Manual Moderno. México, 1997. Pp. 100-107, 927-930.
 34. Woll PJ. Pettengell R. Interferons in Oncology. *British Journal of Clinical Practice*. 1997 Mar. 51(2): 111-115.
 35. Dunster C.A. Cheeseman K.H. Maddix SP. The effect of oxidative stress on the ovary production of the recombinant protein, interferon gamma, produced by Chinese hamster cells in stirred-batch culture. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 1997. 48 (2): 198-203.
 36. Keefe EB. Hollinger FB. Therapy of hepatitis C: consensus interferon trials. *Consensus Interferon Study Group. Hepatology*. 1997 Sep. 26 (3 Suppl 1): 101S - 107S.
 37. Chung, DR. Yang WS. & cols. Treatment of hepatitis B virus associated glomerulonephritis with recombinant human alfa interferon. *American Journal of Nephrology*. 1997. 17(2): 112 - 117.
 38. Vey N., Fossat C. & cols. Clinical and biological effects of gamma interferon and the combination of gamma interferon and interleukin-2 after autologous bone marrow. *European Cytokine Network*. 1997. 8(4): 389-394.
 39. Onishi T., Onishi Y. & cols. Study of the effects of treatment with interferon for the

- advanced renal cell carcinoma based upon the survival rate. Japanese Journal of Urology. 1997, Apr. 88(4): 463-472.
40. Raffa, S. Albiani A. & cols. Treatment of chronic viral hepatitis with recombinant alpha-2 interferon: meta analysis and clinical contribution. Clinica Terapéutica. 1997 Oct. 148(10): 421-435.
 41. Maini A, Morse, PD. New developments in the use of citokines for cancer therapy. Anticancer Research. 1997 Sep-Oct. 17(5B): 3803 – 3808.
 42. Koltermann A, boidol W, Daum J. Production of human interleukin –8 expressed in *Escherichia coli*: from a laboratory scale for in vitro tests via a technical scale for animal studies to a process scale for a GMP-compatible production. Journal of Biotechnology. 1997 Apr, 4. 51(1): 29 – 42.
 43. Zanete D, Dundon W. & cols. Human IL-1 receptor antagonist from *Escherichia coli*: large scale microbial growth and protein purification. Journal of Biotechnology. 1998 Oct 8. 64(2-3): 187 – 196.
 44. Cha H.J, Dalal N.G, Vakharia V.N, Bentley W.E. Expression and purification of human interleukin-2 simplified as a fusion with green fluorescent protein in suspended Sf-9 insect cells. Journal of Biotechnology: 1999 Mar 26. 69(1): 9 –17.
 45. Valdez, H, Lederman M.M. Cytokines and cytokines therapies in HIV infection. AIDS Clinical Review: 1997 – 1998. 187 – 228.
 46. Tissue Type Plasminogen Activator, Recombinant. 2000 Feb. <http://www.ozemail.com.au/~jamesbc/pages/drugs/10.htm>
 47. Larrue V; von Kummer R R; Muller A; Bluhmki E. Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator. Stroke. 2001 Feb. 32(2): 438 – 441.
 48. Chapman KM, Woollendeng AR, & cols. Intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. Stroke. 2000 Dec.31 (12): 2920 – 2924.
 49. Serpi M; Schmidt KG; Kreis W. Z Thrombolysis of prosthetic heart valve thrombosis using recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) in infancy and childhood. Kardiol. 2001 Mar. 90(3): 191 – 196.
 50. Mehta JS; Adams GG. Recombinant tissue plasminogen activator following paediatric cataract surgery. British Journal of Ophthalmology. 2000, Sep. 84(9): 983 – 986.
 51. Weidermann FJ; Mittermayr M; Hoffmann G; Schobersberger W. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor (g-CSF) in infectious diseases: still a debate. Wien Klin Wochenschr, 2001 Feb. 113(3-4): 90 – 96.
 52. Rutella S; Rumi C; Sica S; Leone G. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rHuG-CSF): effects on lymphocyte phenotype and function. Journal of Interferon Cytokine. 1999 Sep. 19(9): 989 – 994.
 53. Altunbas H; Yazicioglu G; Balci MK; Karayalcin U; Uldar L. The use of recombinant human G-CSF in the treatment of propylthiouracyl-induced agranulocytosis. International Journal of Clinical Practice. 1999 Jul-Aug. 53(5): 396 – 397.
 54. Hartung T. Granulocyte colony-stimulating factor: its potencial role in infectious disease. AIDS; 1999. 13 Suppl 2: S3 – S9.
 55. Mezquita P; Luna V; Muñoz-Torres M. Methimazole-induced aplastic anemia in third exposure: successful treatment with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Thyroid. 1998 Sep. 8(9): 791 – 794.
 56. Ventura A; Dragovich D; Luxardo P; Zanazzo G: Human granulocyte colony-stimulating factor (rHuG-CSF) for treatment of neutropenia in Shwachman syndrome. Haematologica. 1995 May-Jun. 80(3): 227- 229.
 57. Scagni P; Saracco P, & cols. Use of recombinant granulocyte colony-stimulating factor

- in Fanconi's anemia. *Haematologica*. 83(5): 432 – 437.
58. De Lalla F; Nicolin R; Lazzarini L. Safety and efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor as an adjunctive therapy for *Streptococcus pneumoniae* meningitis in non-neutropenic adult patients: a pilot study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000 Nov. 46(5): 843 – 846.
59. Carulli G. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on neutrophil phenotype and functions. *Haematologica*. 1997 Sep-Oct 82(5): 606-616.
60. Kruger M; Van de Winkel JG; De Wit TP. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor down-regulates CD14 expression on monocytes. *Immunology*. 1996 Sep. 89(1): 89 – 95.
61. Sato T; Omura M. & cols. Neutrophilia associated with anaplastic carcinoma of the thyroid: production of macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6. *Thyroid*. 2000 Dec. 10(12): 1113 – 1118.
62. Saarinen-Pihkala UM; Lanning M; Perkkio M; & cols. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor support in therapy of high-risk acute lymphoblastic leukemia in children. *Medical Pediatric Oncology*. 2000 May. 34 (5): 319 – 327.
63. Vadhan-Raj S; Broxmeyer HE; Andreeff M; Bandres JC. In vivo biologic effects of PIXY321, a synthetic hybrid protein of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 in cancer patients with normal hematopoiesis: a phase I study. *Blood*. 1995 Sep. 86(6): 2098 – 2105.
64. Spagnoli GC; Juretic A; Rosso R; & cols. Expression of HLA-DR in granulocytes of polytraumatized patients treated with recombinant human granulocyte macrophage – colony-stimulating factor. *Human Immunology*. 1995 May. 43(1): 45 – 50.
65. Alteplase, Tissue-Type Plasminogen Activator, Recombinant. 2001 May. <http://ozemail.com.au/~jamesbs/pages/drugs/10.htm>
66. ReoPro (abciximab). 2001 May. <http://ccfa.org>.
67. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Edición 46, Año: 200. Editorial PLM. Pp. 1753-1758.
68. General News. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* Vol. 30, No. 2 Abr-Jun 1999. Pp. 7.
69. FDA Approves Ontak For Cutaneous T-Cell Lymphoma. 2000. <http://www.pslgroup.com/dg/E1E1E.htm>.
70. Otto Doblhoff-Dier and Rudolf Bliem. Quality Control and assurance from the Development to the production of Biopharmaceuticals. *Triends in Biotechnology*. Vol. 17 # 7, 1999. Pp. 266-270.
71. *British Pharmacopeia*. 1999. Pp 580-584, 794-797.
72. Heigher N. David, Herold, Marzell y Grimm Rudolf. *Applications of the HP^{3D} Capillary Electrophoresis System*. Vol I. First Edition. Germany, 1994. Hewlett-Packard Company.
73. Heigher N. David. *High Performance Capillary Electrophoresis-An Introduction*. 3rd edition. France, 1992, 1997. Hewlett-Packard Company.