

**Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Departamento de Desarrollo de Formulaciones y Envases
Sección de Líquidos y Liofilizados**

**Desarrollo de dos nuevas formulaciones líquidas de
interferón alfa 2b con gran estabilidad en condiciones
reales y aceleradas de almacenamiento**

**Tesis presentada en opción al grado
científico de Doctor en Ciencias
Farmacéuticas**

Llamil Ruiz González

**Ciudad de La Habana
2006**

**Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Departamento de Desarrollo de Formulaciones y Envases
Sección de Líquidos y Liofilizados**

**Desarrollo de dos nuevas formulaciones líquidas de
interferón alfa 2b con gran estabilidad en
condiciones reales y aceleradas de almacenamiento**

**Tesis presentada en opción al grado
científico de Doctor en Ciencias
Farmacéuticas**

**Autor: Lic. Llamil Ruiz González, MCs
Tutora: Dra. Vivian Morera Córdova**

**Ciudad de La Habana
2006**

Dedicatoria

*A mis grandes amigos,
a mi madre*

SÍNTESIS

SÍNTESIS

En este trabajo se obtuvieron dos formulaciones de IFN α 2b hum-rec, una proteína que de manera común se ha comercializado en forma liofilizada y con ASH como estabilizante. Las formulaciones que se diseñaron en este trabajo son líquidas y no contienen ASH. Previamente se realizó un estudio de preformulación en el que se evaluó la estabilidad de esta proteína bajo la influencia de diferentes factores como el contacto con el material de envase primario, la concentración del ingrediente activo, la presencia de excipientes por separado y en combinación y las altas temperaturas. Como resultado se demostró, según las técnicas de SDS/PAGE y RP-HPLC, que los principales productos de modificación consisten en dímeros, y en una especie más hidrofílica y otra más hidrofóbica que la especie nativa. Las formulaciones se diseñaron con el objetivo de evitar la ocurrencia de estas modificaciones. Se demostró que los bulbos 2R de borosilicato no inducen la adsorción rápida del IFN α 2b hum-rec en solución a las paredes de vidrio del envase desde 1 hasta 24 MUI/mL. Tampoco inducen otras vías de desestabilización en las interfases líquido/vial, en un corto periodo de tiempo (24 h). Por otra parte, el EDTA Na₂ x 2H₂O y el polisorbato 80 resultaron los excipientes más adecuados para mantener la estabilidad del IFN α 2b hum-rec. Una concentración media (10 MUI/mL) de esta citoquina contribuyó a su estabilidad física, química y biológica en las nuevas formulaciones. Las dos formulaciones que resultaron de este estudio se almacenaron en condiciones refrigeradas ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) y aceleradas ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para evaluar su estabilidad. Ambas son estables durante 30 meses en condiciones de vida de estante y durante 2 meses en condiciones aceleradas. El análisis económico se basó en la determinación del valor actual neto, la tasa interna de rendimiento y el plazo de recuperación. Los resultados del mismo corroboraron que este proyecto resulta sumamente atractivo desde el punto de vista económico. Por último, estas formulaciones se compararon con el producto líder del mercado (INTRON A). Se demostró que las nuevas formulaciones tienen una calidad similar al mismo aunque una estabilidad superior. Este trabajo constituye uno de los primeros reportes en el mundo acerca del desarrollo de formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec sin ASH.

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDO

GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	II
INTRODUCCIÓN.....	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
Las proteínas como agentes terapéuticos.....	8
Vías de inestabilización que afectan a las proteínas.....	11
<i>Inestabilidades físicas.....</i>	<i>12</i>
Desnaturalización.....	12
Agregación y precipitación.....	12
Adsorción a superficies.....	12
<i>Inestabilidades químicas.....</i>	<i>12</i>
Hidrólisis.....	13
Desamidación.....	14
Racemización.....	14
β -Eliminación.....	15
Intercambio tiol-disulfuro. Destrucción de cistina.....	15
Oxidación de residuos de cisteína.....	15
Oxidación de residuos de metionina.....	16
Estrategias para el desarrollo de formulaciones estables.....	17
<i>Liofilización 17</i>	
<i>Empleo de excipientes estabilizantes.....</i>	<i>18</i>
Sales, azúcares, aminoácidos, polímeros y alcoholes polihidroxicos.....	18
Detergentes.....	19
<i>Conjugación a polímeros biocompatibles.....</i>	<i>19</i>
<i>Ingeniería de proteínas.....</i>	<i>21</i>
Desarrollo de formulaciones mediante la evaluación de los factores extrínsecos a las proteínas.....	23
Estudios de preformulación.....	23
<i>Influencia del material de envase en la estabilidad de las proteínas.....</i>	<i>26</i>
<i>Análisis de las señales cromatográficas.....</i>	<i>28</i>
<i>Estudios cinéticos.....</i>	<i>31</i>
Estudios de estabilidad.....	33
Especificaciones de calidad de los productos terminados.....	36
Interferón α 2b.....	37
<i>Mecanismos de acción y efectos biológicos de los IFNs.....</i>	<i>38</i>
<i>Aplicaciones terapéuticas de los IFNs.....</i>	<i>38</i>
<i>Obtención de los IFNs α en Cuba.....</i>	<i>39</i>
Desarrollo de formulaciones de IFN α 2b hum-rec	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
Materiales.....	44
<i>Reactivos biológicos.....</i>	<i>44</i>
<i>Reactivos químicos.....</i>	<i>44</i>
<i>Otros materiales.....</i>	<i>44</i>
Métodos 46	
<i>Influencia del material de envase primario.....</i>	<i>48</i>
Compatibilidad del IFN α 2b hum-rec con los bulbos de borosilicato.....	48
Compatibilidad del IFN α 2b hum-rec en solución con los tapones de clorobutilo	49
<i>Influencia de diferentes excipientes en la estabilidad del IFNα2b hum-rec.....</i>	<i>49</i>
Efecto de diferentes excipientes en la agregación del IFN α 2b hum-rec.....	49
Efecto de diferentes excipientes en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec.....	50
<i>Influencia de la concentración de proteínas en la estabilidad del IFNα2b hum-rec en solución.....</i>	<i>50</i>
<i>Estudios de estabilidad.....</i>	<i>50</i>
Evaluación de la estabilidad de las nuevas formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec.....	51
<i>Establecimiento de las especificaciones de Calidad del producto terminado e introducción en el sistema productivo</i>	<i>51</i>
<i>Análisis económico</i>	<i>53</i>

<i>Análisis económico</i>	53
<i>Análisis de sensibilidad</i>	53
<i>Comparación de las nuevas formulaciones líquidas de IFNα2b hum-rec con productos comerciales</i>	53
<i>Métodos analíticos</i>	53
<i>Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa</i>	53
<i>Determinación de polisorbato 80</i>	54
<i>Determinación de alcohol bencílico</i>	54
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS</i>	54
<i>Determinación de pirógenos</i>	55
<i>Determinación de la Inocuidad</i>	55
<i>Determinación de la esterilidad</i>	55
<i>Determinación de la efectividad de preservo</i>	55
<i>Determinación del pH</i>	56
<i>Determinación de las características organolépticas</i>	56
<i>Determinación de la actividad biológica del IFNα2b hum-rec por el método de titulación antiviral</i>	56
<i>Determinación de la actividad biológica del IFNα2b hum-rec por el método de titulación antiproliferativa</i>	57
<i>Identificación y cuantificación del IFNα2b hum-rec por un ensayo inmunoenzimático</i>	57
<i>Análisis estadístico</i>	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
<i>Estudios de preformulación</i>	59
<i>El IFNα2b hum-rec no se absorbe a los bulbos 2R de borosilicato</i>	59
<i>Los tapones de clorobutilo afectan la estabilidad del IFNα2b hum-rec en solución</i>	60
<i>La concentración de proteínas afecta la influencia de los tapones de clorobutilo sobre la estabilidad del IFNα2b hum-rec en solución</i>	63
<i>La adición de polisorbato 80 y EDTA Na₂ x 2H₂O afecta la influencia de los tapones de clorobutilo sobre la estabilidad del IFNα2b hum-rec en solución</i>	66
<i>La agregación constituye una de las principales modificaciones del IFNα2b hum-rec</i>	69
TABLA 3.4. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA AGREGACIÓN DEL IFNα2B HUM-REC EN PRESENCIA DE DIFERENTES ESTABILIZANTES	71
<i>Polisorbato 20</i>	71
<i>La adición de polisorbatos, EDTA Na₂ x 2H₂O y SDS disminuye la velocidad de agregación del IFNα2b hum-rec en solución</i>	71
<i>La adición de Cu²⁺ y Zn²⁺, GSH y DTT aumenta la velocidad de agregación del IFNα2b hum-rec en solución</i>	74
<i>El empleo de diferentes excipientes afecta la pureza del IFNα2b hum-rec</i>	76
TABLA 4.8. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ESTABILIDAD DEL RHIFN-α2B HUM-REC, EN CONDICIONES DE ESTRÉS, A CUATRO CONCENTRACIONES DIFERENTES	86
<i>La concentración de proteínas afecta la estabilidad del IFNα2b hum-rec en solución</i>	86
<i>Definición de dos formulaciones líquidas de IFNα2b hum-rec</i>	89
<i>Estudios de estabilidad</i>	90
<i>Las nuevas formulaciones líquidas de IFNα2b hum-rec permanecen estables durante 2 meses en condiciones aceleradas de almacenamiento</i>	90
<i>Las nuevas formulaciones líquidas de IFNα2b hum-rec permanecen estables durante 30 meses en condiciones reales de almacenamiento</i>	94
<i>Establecimiento de las especificaciones de Control de la Calidad e introducción en el sistema productivo</i>	98
<i>Análisis económico</i>	99
<i>Análisis de sensibilidad</i>	100
<i>Las nuevas formulaciones líquidas de IFNα2b hum-rec son física-química y biológicamente equivalentes al INTRON A</i>	102
<i>Tabla 3.19. Indicadores de comparación de tres formulaciones líquidas de IFNα2b hum-rec, después de 18 meses de almacenamiento</i>	103
<i>Consideraciones finales</i>	105
CONCLUSIONES	106
RECOMENDACIONES	108

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
AUTOBIBLIOGRAFÍA.....	126

GLOSARIO DE TÉRMINOS

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AcM: Anticuerpo monoclonal

ADN: Ácido desoxirribonucleico

aFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos en su forma ácida

ARN: Ácido ribonucleico

ASB: Albúmina sérica bovina

ASH: Albúmina sérica humana

BIOCEN: Centro Nacional de Biopreparados

CECMED: Centro Nacional para el Control de la Calidad de los Medicamentos

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Da: Dalton

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ELISA: del inglés “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Ensayo de inmunodetección)

EPO: Eritropoyetina

EROS: Especies reactivas del oxígeno

FCE: Factor de crecimiento epidérmico

FDA: Del inglés “Food and Drug Administration” (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América)

G-CSF: del inglés “Granulocyte Colony Stimulating Factor” (Factor estimulador de colonias de granulocitos)

GM-CSF: Del inglés “Granulocyte Macrophage colony stimulating factor” (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos)

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

h: hora

hGH: Del inglés “human growth hormone” (hormona de crecimiento humano)

IFN: Interferón

IL-1b : Interleucina 1 b

IL-2: Interleuquina 2

k_{obs} : Constante de degradación observada

MHC : Del inglés “Major Histocompatibility System” (Sistema mayor de histocompatibilidad)

min : minutos

MTT : Bromuro de 3'-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NK: Del inglés "Natural Killers" (Células asesinas naturales)

p. ej.: Por ejemplo

PEG: Polietilenglicol

pI: Punto isoeléctrico

PM: Peso molecular

RP-HPLC: Del inglés "Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography" (Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa)

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: Del inglés "SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis" (Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS)

seg: Segundo

SE-HPLC: Del inglés "Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography" (Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Exclusión Molecular)

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SUMA: Sistema Ultramicroanalítico

TFA: Ácido trifluoroacético

tPA: Activador tisular del plasminógeno

TR: Tiempo de retención

USD: Del inglés "United States dollars" (Dólares estadounidenses)

USP: Del inglés "United States Pharmacopoeia" (Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica)

WHO: Del inglés "World Health Organization" (Organización Mundial de la Salud)

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El advenimiento de la tecnología del ADN recombinante contribuyó, de manera significativa, al desarrollo de productos farmacéuticos de origen proteico durante las últimas dos décadas. Es por ello que el desarrollo de formulaciones estables con estas biomoléculas como ingredientes farmacéuticos activos ocupa un lugar muy importante dentro las Ciencias Farmacéuticas.

En comparación con las moléculas químicas pequeñas, los productos biofarmacéuticos presentan actividad biológica y especificidad de acción a concentraciones relativamente bajas. Todo ello contribuye a disminuir los efectos colaterales y/o tóxicos conocidos y desconocidos que pueden presentar algunos fármacos para el uso humano (Bond y col., 1998). Sin embargo, debido a su mayor inestabilidad físico-química y biológica, los productos biofarmacéuticos que se basan en proteínas se almacenan en condiciones refrigeradas. Para mayor garantía, muchas proteínas se liofilizan en presencia de estabilizantes como la ASH para lograr un tiempo de vida de estante aceptable para su uso y comercialización (Gross y col., 1998).

Con el objetivo de entender y favorecer la estabilidad de los productos de origen biotecnológico como las proteínas, se han realizado numerosos estudios en los últimos veinte años. Los más significativos por su incidencia en este campo, han sido las investigaciones sobre los factores que propician su inestabilidad física y química (Manning y col., 1989), los mecanismos para prevenir estas inestabilidades (Cleland y col., 1993) y los medios para estabilizar estas biomoléculas mediante la congelación y la liofilización (Timasheff, 1993; Arakawa y col., 2001). Estos estudios han garantizado el desarrollo de formulaciones estables con un gran número de proteínas como ingredientes activos, las cuales han demostrado una estabilidad prolongada a bajas temperaturas.

Una de las proteínas de interés farmacéutico más exitosas para las compañías que la producen y comercializan, el interferón α 2b humano recombinante (IFN α 2b hum-rec), se produce en el CIGB con calidad comparable al producto comercializado por la compañía líder en el mercado (Schering Plough) (Beldarraín y col., 2001).

El IFN α 2b hum-rec es una proteína que se emplea para el tratamiento de múltiples enfermedades como las Hepatitis C y B (Buti y Esteban, 2005), el mieloma múltiple (Kirkwood, 2002), las leucemias (Franceschini y col., 2004) y otras (Pang y col., 2005). La vía de administración del IFN α 2b hum-rec más empleada es la parenteral y la mayoría de las formulaciones que existen son inyectables. La compañía líder de este producto es la

Schering Plough cuyas ganancias ascendieron a 1851 millones de USD en el año 2004 (Biobusiness: http://www.i-s-b.org/business/recombinant_f.htm).

Esta proteína es una molécula frágil, que requiere de condiciones especiales durante su purificación y formulación, para lograr un producto aceptable desde el punto de vista de su estabilidad (Yuen y Kline, 1998). Debido a esto, se ha comercializado históricamente en formas farmacéuticas liofilizadas, con ASH, lo que garantiza una gran estabilidad. Sin embargo, la liofilización es un proceso caro por concepto de equipamiento y sistemas auxiliares, limita la producción a la capacidad del equipamiento y puede generar rechazos considerables cuando las características organolépticas del producto terminado son deficientes (Wang, 1999). Además, el producto requiere de una mayor manipulación (reconstitución en agua para inyección) previo a la aplicación al paciente (Wang, 1999).

Por otra parte, la ASH es un producto derivado de la sangre y su uso como estabilizante de productos biofarmacéuticos implica riesgos potenciales como la transmisión de virus u otros patógenos provenientes de la sangre. Además, incrementa la probabilidad de formación de agregados ASH-fármaco que pueden aumentar la inmunogenicidad del principio activo, con la consiguiente generación de anticuerpos que disminuyen su efecto terapéutico (Gross y col., 1998).

Una alternativa para superar estas dificultades es el desarrollo de formulaciones líquidas sin ASH (Yuen y Kline, 1998, 1999). Con estas formas farmacéuticas se incrementa la capacidad de producción, se eliminan los rechazos debido a la calidad organoléptica del producto, disminuye la manipulación y con ello el riesgo de contaminación antes de la aplicación al paciente, y se garantiza un control de la calidad del 100 % del producto (Wang, 1999). Además, se excluye la ASH de la formulación con lo que disminuye la posibilidad de contaminación del producto con virus u otros patógenos que puedan infectar la sangre. También disminuye la posibilidad de que se formen agregados que incrementen la inmunogenicidad del ingrediente activo (Gross y col., 1998).

Si bien la compañía Schering Plough cuenta con una formulación líquida de IFN α 2b hum-rec (EDTA Na₂, m-cresol, NaCl, polisorbato 80, en tampón fosfato de sodio) ninguna otra empresa en el mundo posee esta forma farmacéutica con esta citoquina como ingrediente activo. En particular las formulaciones que ha patentado esta compañía presentan una estabilidad reportada de 24 meses cuando se almacenan a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, cuando se almacenan a una temperatura mayor (25 ó 30°C) el contenido de IFN α 2b hum-rec, determinado según la técnica de RP-HPLC, disminuye hasta menos del 90% antes de los

tres meses de almacenamiento (Yuen y Kline, 1999). Ello demuestra lo complicado que puede resultar la estabilización en solución de moléculas tan frágiles como el IFN α 2b hum-rec (Wang, 1999, 2000).

Hasta la década de los años 80, la ciencia de las formulaciones que contenían proteínas como ingrediente activo se basaba en principios empíricos (Middaugh, 1990). En la actualidad, y pese a los progresos en este campo, aún no existe una vía simple para el desarrollo de formulaciones de proteínas. Es por ello que para lograr una preparación estable de estas biomoléculas se deben tener en consideración un conjunto importante de factores que afectan este proceso (Wang, 1999).

La identificación de los factores intrínsecos y extrínsecos que contribuyen a la estabilización de algunas proteínas termófilas (proteínas que poseen gran estabilidad a temperaturas elevadas) ha brindado una información importante para lograr la estabilización de productos biofarmacéuticos (Jaenicke, 1996; Wang, 1999). Sin embargo, las diferencias estructurales entre las proteínas son tan significativas que la generalización de estrategias de estabilización resulta imposible. Por ello, las proteínas deben evaluarse de manera individual y estabilizarse sobre la base de la prueba y el error (Wang, 1999).

Teniendo en cuenta las premisas que existen en este campo de la investigación se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

Resulta posible la obtención de formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec con una composición diferente al producto líder del mercado y con una estabilidad similar o superior a éste.

A partir de esta hipótesis, y para lograr su demostración, se plantearon los siguientes objetivos generales:

- 1- Obtener al menos una formulación líquida de IFN α 2b hum-rec con estabilidad prolongada en condiciones de vida de estante.
- 2- Comparar la nueva formulación líquida con el producto líder del mercado: INTRON A.

Para la demostración de la hipótesis se trazaron además los siguientes objetivos específicos:

- 1- Realizar los estudios de preformulación, para evaluar la influencia del material de envase, la concentración de proteínas y los excipientes en la estabilidad de este ingrediente farmacéutico activo.
- 2- Definir la nueva formulación.

- 3- Evaluar la estabilidad de la formulación resultante en condiciones aceleradas de almacenamiento.
- 4- Evaluar la estabilidad de la formulación resultante en condiciones reales de almacenamiento.
- 5- Establecer las especificaciones de calidad del nuevo producto e introducirlo en el sistema productivo.
- 6- Realizar el análisis económico de la nueva formulación.
- 7- Comparar la formulación resultante con otros productos comerciales.

Este trabajo constituye uno de los primeros reportes en el mundo acerca del desarrollo de formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec sin ASH. De hecho, sólo una compañía en el mundo comercializa un producto similar, sin embargo, su estabilidad reportada es inferior a la estabilidad que se logró demostrar con las formulaciones que se obtuvieron en este trabajo. De ahí su **novedad científica**, que corrobora además la posibilidad de desarrollar formulaciones líquidas con el IFN α 2b hum-rec, opción muy poco utilizada dadas las bondades de la liofilización en cuanto a estabilidad del producto terminado. Sin embargo, esta opción tendrá que tenerse en cuenta con más frecuencia en el futuro si se pretende aumentar la capacidad productiva y disminuir los costos del producto.

Los resultados obtenidos aquí permiten contar con nuevos conocimientos sobre la estabilidad de una de las proteínas más empleadas clínicamente a nivel mundial y sobre la influencia de diferentes factores que pueden afectar o no sus propiedades físico-químicas y biológicas. Este conocimiento podrá emplearse en el desarrollo futuro de otras formulaciones que contengan estas citoquinas como ingredientes activos, por ejemplo, las formulaciones de liberación modificada. En esto radica la **importancia teórica** de este trabajo.

Los resultados de este trabajo contienen además una **importancia práctica** significativa. La máxima autoridad regulatoria nacional (CECMED) aprobó un estudio clínico de unos de los productos que se obtuvieron en este trabajo y el registro sanitario del mismo.

Otras implicaciones prácticas asociadas a la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec con alcohol bencílico como agente preservante son:

- 1-** Sirvió como base para la firma de una empresa mixta con la República Popular China.
- 2-** El registro sanitario del producto en la República Popular China y en la República Bolivariana de Venezuela.

- 3-** El empleo exitoso del medicamento en la última epidemia de conjuntivitis hemorrágica en el 2003.
- 4-** Se transfirió exitosamente la tecnología de producción de esta formulación al BIOCEN. Desde el 2004 este centro se mantiene produciendo este producto para la comercialización nacional e internacional.

La terapia con estos medicamentos resulta altamente costosa y su adquisición para el tratamiento de los enfermos cubanos resulta prácticamente imposible. De modo que contar con ellos, además de disminuir los costos de producción, ahorra numerosas erogaciones al país y constituye, mediante su comercialización internacional, una fuente para la obtención de divisas. En ello consiste su **aporte socio-económico**.

La tesis consta de: síntesis, lista de abreviaturas, Introducción, tres capítulos, conclusiones, recomendaciones y la relación de la bibliografía consultada. Para facilitar la lectura del documento se intercalan en el texto 23 figuras, 25 tablas y se utilizan seis anexos.

Los resultados obtenidos en este trabajo han sido incluidos en cuatro artículos científicos, todos en revistas arbitradas, tres informes técnicos aprobados por la Comisión adjunta al Consejo Científico del CIGB y un registro sanitario aprobado en Cuba, China y Venezuela. Varios de los resultados han sido reconocidos como logros institucionales del CIGB (2001-2005).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las proteínas como agentes terapéuticos

El empleo exitoso de una proteína como agente terapéutico se produjo por primera vez el 11 de enero de 1922. En esa fecha Frederick G. Banting y Charles Herbert Best, del Instituto de Fisiología de Toronto, inyectaron un extracto purificado de páncreas de cerdo a un paciente diabético. Este constituyó el inicio del uso de la insulina para el tratamiento de la *Diabetes mellitus* (Sasson, 1998).

En la década de los cincuenta, Isaacs y Lindenman descubrieron los IFNs en cultivos de membrana corioalantoidea de embrión de pollo, tratados con el virus de la influenza (Isaacs y Lindenman, 1957). Estas moléculas han mostrado una alta actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora, por lo que se han empleado en una gran variedad de enfermedades hasta la fecha (Pang y col., 2005).

Otro gran paso en este sentido lo dio Stanley Cohen, quien realizó importantes trabajos con relación al descubrimiento del FCE (Sasson, 1998). Este polipéptido se ha empleado en el tratamiento de quemaduras y otras lesiones de la piel (Chao y col., 2003; Grazul-Bilska y col., 2003). Más recientemente, se ha utilizado conjugado a la proteína P64K, de la bacteria *Neisseria meningitidis*, en el tratamiento de varios tipos de cáncer (González y col., 1998, 2003; Crombet y col., 2001) y por vía parenteral, para el tratamiento de quemados graves (Berlanga, 2002).

En 1976 se identificó otra citoquina humana, la IL-2 (Morgan y col., 1976). Esta molécula se proyectaba como una alternativa esperanzadora en la terapia contra el cáncer (Cheever y col., 1982; Eberlein y col., 1982). En los últimos años, esta proteína se ha utilizado de manera satisfactoria con el objetivo de aumentar el conteo de linfocitos T CD4 en pacientes con SIDA (Aboulafia, 2002).

En las dos últimas décadas se han aislado y purificado otro gran número de proteínas. Entre ellas tenemos el IFN β para el tratamiento de la esclerosis múltiple, la hGH para la deficiencia de esta hormona en niños y el enanismo pituitario, el tPA para el infarto agudo del miocardio y la embolia pulmonar aguda, la EPO para el tratamiento de la anemia crónica provocada por insuficiencia renal, el G-CSF para la neutropenia causada por quimioterapia y el GM-CSF contra las infecciones relacionadas con el trasplante autólogo de médula ósea (Sasson, 1998).

La producción de éstas y otras proteínas a partir de fuentes naturales presentó serias desventajas. Las más importantes, por su incidencia en la producción y el uso, eran el alto

costo, la baja pureza de los productos obtenidos y los contaminantes potenciales que podían provenir del material de partida (sangre, orina y otros fluidos y tejidos) (Sasson, 1998).

Estos problemas se solucionaron en gran medida con los logros alcanzados en la biología molecular. En 1973, Stanley Cohen y colaboradores idearon un método para transplantar un gen de un organismo a otro, sentando las bases de la tecnología del ADN recombinante (Cohen y col., 1973). Por otra parte Bolívar y colaboradores anunciaron en 1977 la construcción y caracterización de un nuevo vehículo de clonación, el plásmido pBR322. A diferencia de plásmidos anteriores, éste constituyó un vector sencillo, eficaz y potente para expresar un ADN extraño en bacterias (Bolívar y col., 1977).

Al principio de la década de los años ochenta, a través de la técnica del ADN recombinante, se comenzó a producir IL-2 humana y de ratón (Devos y col., 1983; Taniguchi y col., 1983; Fujita y col., 1983). Con esta técnica se obtuvieron grandes cantidades de estas citoquinas con alta pureza lo cual permitió su empleo en numerosos ensayos preclínicos y clínicos (Winkelhake y Gauny, 1990).

A partir del año 1982 comenzó una nueva era en la industria farmacéutica con la aprobación en los Estados Unidos de América y el Reino Unido, del primer fármaco obtenido mediante la tecnología del ADN recombinante: la insulina humana recombinante con la marca comercial Humulin[®], de la compañía Genentech Inc. (Eli Lilly & Co. EUA) (Sasson, 1998).

La Tabla 1.1 recopila las proteínas recombinantes más importantes en el campo biofarmacéutico, que están en el mercado (biobusiness: http://www.i-s-b.org/business/recombinant_f.htm).

Tabla 1.1. Proteínas recombinantes aprobadas para el uso en humanos.

Proteína	Principales indicaciones	Compañía	Fecha de aprobación
Insulina humana tipo 1	Diabetes Mellitus	Lilly Deutschland GmbH Lilly Industries Novo Nordisk	
Hoechst 12/1987 IL-2	Cáncer renal	Chiron GmbH Pharmacia GmbH Serono Pharma GmbH	12/1989
hGH	Enanismo	Lilly Deutschland GmbH	
Novo Nordisk 02/1991 Glucagón	Hipoglucemia	Novo Nordisk	03/1992
Epo β	Anemia renal	Boehringer Mannheim	05/1992
IFN γ 1b	Granulomatosis crónica	Dr. Kart Thomae	1992

Tabla 1.1. Proteínas recombinantes aprobadas para el uso en humanos (continuación).

Proteína	Principales indicaciones	Compañía	Fecha de aprobación
IFN α 2b	Leucemia de células peludas, carcinomas, verrugas por papiloma	Essex Pharma GmbH	03/1993
Epo α	Anemia renal	Janssen-Cilag	04/1993
GM-CSF	Neutropenia	Essex Pharma GmbH	04/1993
IFN α 2a	Leucemia de células peludas, carcinomas, verrugas por papiloma	Hoffmann-La Roche AG	04/1993
Factor VIII	Hemofilia A	Bayer AG	04/1993
G-CSF glicosilado	Neutropenia	Rhône-Poulenc Rorer GmbH	07/1993
tPAT	Trombosis	Dr. Karl Thomae GmbH	10/1993
G-CSF	Neutropenia	Hoffmann-La Roche AG	04/1994
IFN β 1b	Esclerosis múltiple	Schering AG	11/1995
Factor VII	Sangramientos por hemofilia A y B	Novo Nordisk	02/1996
Factor IX	Hemofilia B	Genetics Institute of Europe B.V.	08/1997
IFN β 1a	Esclerosis múltiple	Biogen France S.A.	08/1997
Calcitonina	Osteoporosis	Unigene UK Ltd.	01/1999
PEG-IFN α 2b	Hepatitis C	Schering-Plough Europe	05/2000
Tenecteplasa	Trombosis	Boehringer Ingelheim	02/2001
Coriogonadotropina α	Estimulación de ovarios	Ares Serono	02/2001
Galactosidasa α	Enfermedad de Fabry	TKT Europe-5S AB	08/2001
Agonista del receptor de la IL-1	Artritis reumatoide	Amgen GmbH	03/2002
PEG-G-CSF	Neutropenia	Amgen Europe	08/2002
Proteína morfogenética de los huesos	Tratamiento de fracturas de tibia en adultos	Genetics Institute Europe B.V.	09/2002
Laronidasa	Mucopolisacaridosis I	Genzyme Europe B.V.	06/2003

Vías de inestabilización que afectan a las proteínas

Gracias a la tecnología del ADN recombinante, la producción comercial de proteínas biológicamente activas aumentó en los últimos años (Biobusiness: http://www.i-s-b.org/business/recombinant_f.htm). Sin embargo, a pesar de que muchos de estos nuevos fármacos entraron al campo farmacéutico sin dificultad, otros mostraron serios problemas de estabilidad (Wong y Parasrampur, 1997). Esto atentó, en gran medida, en contra de su mantenimiento en el mercado. Esta situación estaba dada, fundamentalmente, porque la estabilidad de las proteínas está estrechamente relacionada con su actividad biológica, y ésta depende a su vez, de manera crítica, de la estructura tridimensional que la proteína puede alcanzar en un ambiente determinado (Wong y Parasrampur, 1997). En la Tabla 1.2 se relacionan algunos ejemplos de productos de los cuales se han retirado varios lotes del mercado debido a su inestabilidad.

Tabla 1.2. Ejemplos de productos comerciales que han presentado problemas de estabilidad. Los lotes con baja estabilidad han sido retirados del mercado en la fecha señalada (FDA: <http://www.fda.gov/>).

Nombre comercial	Compañía	Características de la molécula	Uso	Fecha de remoción	Causa
Denileukin diftiox	Seragen, Inc	Toxina diftérica (Met 1 a Thr 385)	IL-2 (Ala 1 a Thr 133)	24/02/03	Baja actividad biológica
AlphaNine®	Alpha Therapeutic Corporation	Factor IX Hemofilia B		19/02/03	Baja estabilidad a 30°C por tres meses
Menomune®	Aventis Pasteur	Vacuna antimeningocócica (grupos A, C, Y, W-135)		18/10/02	Baja potencia durante los estudios de estabilidad a los 12 meses
Kogenate®	Bayer Corporation	Factor VIII Hemofilia A		28/03/02	Baja actividad biológica
NTRON AS	Schering Plough	IFNα2b	Hepatitis C, Leucemias, etc	22/10/01	Baja estabilidad después de 30 días de reconstituidos
VAQTA®	Merck & Co., Inc	Vacuna antihepatitis A		4/12/01	Baja potencia
Roferon-A	Hoffman-La Roche	IFNα2a	Hepatitis C, Leucemias, etc	14/6/00	Presencia de IFNα2a degradado
Tripedia®	Connaught Laboratorios, Inc.	Vacuna DPT libre de preservos		27/01/99	Baja potencia del componente Difteria

Inestabilidades físicas

Existen varios ejemplos de transformaciones físicas que conducen a la modificación de las proteínas. Entre éstos se incluyen la desnaturalización, la agregación, la precipitación y la adsorción a superficies (Wong y Parasrampurua, 1997).

Desnaturalización

La desnaturalización se refiere a cambios en el estado nativo de una proteína, los cuales afectan su estructura secundaria y terciaria (Wong y Parasrampurua, 1997). Es decir, cuando se produce un desbalance en las distintas fuerzas: puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, iónicas y dipolo-dipolo, que estabilizan la conformación tridimensional de una proteína (Voet y Voet, 1990).

Agregación y precipitación

La agregación y la precipitación dependen del grado de asociación de las moléculas de proteínas. Estas pueden formar dímeros, trímeros o polímeros y la formación de agregados depende de factores como el pH, la composición del solvente, las interacciones iónicas, la concentración de la proteína y la temperatura. La precipitación es un fenómeno similar que se puede observar a escala macroscópica (Wong y Parasrampurua, 1997).

Adsorción a superficies

La adsorción a superficies puede ser un problema serio para la formulación de proteínas. Las proteínas pueden adsorberse a la pared del envase; con esto disminuye la cantidad de proteínas en el seno de la formulación lo que puede provocar variaciones en la concentración y en la dosis que se entrega (Norde y Anusiem, 1992; Wong y Parasrampurua, 1997). Los materiales más comunes que se asocian con la adsorción a superficies son el polietileno, el plástico y el cristal, entre otros (Wang, 1999).

Inestabilidades químicas

La interacción de los grupos funcionales de las cadenas laterales de varios aminoácidos, puede conducir a la formación o ruptura de enlaces covalentes, para dar lugar a una nueva estructura química. Estas interacciones provocan la inestabilidad química de las proteínas (Wong y Parasrampurua, 1997; Wang, 1999, 2000).

Las modificaciones covalentes *in vivo* de las proteínas constituyen un mecanismo natural de señalización para su recambio. Estas modificaciones pueden ocurrir por vías enzimáticas y no enzimáticas. Las reacciones no enzimáticas (espontáneas) incluyen la desamidación de residuos de asparagina, la racemización de residuos de ácido aspártico, la isomerización de residuos de prolina, la glicosidación de grupos aminos y la oxidación catalizada por metales

en sitios específicos (interacción de H_2O_2 y Fe (II) en el sitio de enlace del metal en la proteína). Las enzimas *in vivo* interactúan específicamente con proteínas que se han modificado covalentemente. Por ejemplo, la proteasa alcalina degrada las proteínas que han sido oxidadas (Volkin y col., 1995).

Las modificaciones químicas *in vitro* de las proteínas pueden ocurrir durante su purificación, manipulación y almacenamiento. En estos procesos, las proteínas se exponen a condiciones no fisiológicas, como altas temperaturas y valores extremos de pH, lo que constituye un estrés para su integridad química y estructural. Ésto puede conducir a alteraciones covalentes y no covalentes (Volkin y col., 1995).

Las transformaciones químicas más frecuentes son la hidrólisis, la desamidación, la racemización, la β -eliminación, el intercambio de puentes disulfuro, la oxidación y la proteólisis (Wong y Parasrampurua, 1997).

Hidrólisis

La hidrólisis de péptidos o proteínas ocurre cuando se rompe un enlace peptídico. También puede ocurrir cuando se desamidan la asparagina o la glutamina. La mayoría de los enlaces peptídicos o amidas (RNH-CO-R) son más resistentes a la hidrólisis que un enlace éster (R-O-CO-R) (Wong y Parasrampurua, 1997). La velocidad de hidrólisis de los enlaces amida o peptídicos está determinada por el tipo de aminoácido que lo conforme, ya que algunos de ellos participan como estabilizadores en esta reacción debido al efecto estérico o de repulsión de cargas (Wong y Parasrampurua, 1997).

Los enlaces peptídicos más susceptibles a la hidrólisis son aquellos que están formados por aminoácidos cuyas cadenas laterales son pequeñas y no polares (p. ej. glicina, alanina, y prolina) (Hill, 1965) y polares no cargadas (p. ej. serina, treonina, asparagina y glutamina) (Tsuda y col., 1990). Sin embargo, residuos con cadenas laterales no polares y voluminosas (p. ej. valina y leucina) estabilizan el enlace peptídico adyacente e impiden el ataque del ión hidrógeno a dicho enlace (Hill, 1965). Un grupo cargado positivamente de uno de los residuos que conforman el enlace, lo fortalece por la repulsión que se establece entre este grupo y los iones de hidrógeno (Hill, 1965; Wang y Hanson, 1988). No obstante, el efecto contrario se produce cuando el grupo lateral está cargado negativamente (p. ej. el grupo carboxilo del ácido aspártico) pues atrae iones de hidrógeno lo que contribuye a la ruptura del enlace peptídico (Oliyai y Borchardt, 1993). Desde 1985, Marcus comprobó que el enlace entre el ácido aspártico y la prolina era sensible a la hidrólisis a elevadas temperaturas y en condiciones ácidas (Marcus, 1985).

Desamidación

La desamidación es la hidrólisis del grupo amida de las cadenas laterales de los residuos de asparagina y glutamina (Manning y col., 1989; Patel y Borchardt, 1990; Darrington y Anderson, 1994). Este proceso puede ocurrir bajo condiciones ácidas, neutras o alcalinas, aunque el mecanismo químico de hidrólisis es fuertemente dependiente del pH (Volkin y col., 1995).

Bajo condiciones neutras o básicas la reacción procede por un mecanismo intramolecular (Geiger y Clarke, 1987) en el cual el nitrógeno del enlace peptídico ataca al grupo carbonilo lateral de la asparagina y causa la formación de un anillo de succinimida de cinco miembros, con la liberación de amoníaco. El ciclo de succinimida que se forma es inestable y susceptible a la hidrólisis, tras lo cual se forma una mezcla de α y β residuos de ácido aspártico (Manning y col., 1989; Volkin y Klibanov, 1992). Bajo condiciones ácidas, la desamidación procede por hidrólisis directa, con la sola formación del residuo α del ácido aspártico (Volkin y col., 1995).

La secuencia aminoacídica parece tener una influencia notable en la velocidad de desamidación. Patel y Borchardt en 1990 analizaron esta dependencia en una serie de hexapéptidos que contenían asparagina. Las secuencias asparagina-glicina y asparagina-serina resultaron ser particularmente lábiles a causa de la disminución del impedimento estérico frente a la formación del anillo de succinimida por el C-terminal del residuo aminoacídico (Patel y Borchardt, 1990). Se analizó, además, si esta dependencia era aplicable a proteínas con alta complejidad estructural, y se comprobó que las estructuras secundaria y terciaria jugaban un papel fundamental en la velocidad de desamidación, ya que la flexibilidad de la cadena polipeptídica en la región cercana a la cadena lateral de la asparagina susceptible, podía favorecer o inhibir la formación del ciclo de succinimida (Volkin y col., 1995).

La formación de un intermediario cíclico de succinimida, además de favorecer la desamidación y la isomerización, también facilita la racemización (Geiger y Clarke, 1987; Manning y col., 1989).

Racemización

La racemización es la inversión de la configuración en un centro asimétrico. La mayoría de los aminoácidos que conforman las proteínas presentan este centro asimétrico o quiral en el carbono- α . Esta reacción comienza cuando el hidrógeno- α se separa como un protón con lo que se forma un carbanión plano aquiral (ópticamente inactivo). Al retornar el protón al

carbanión puede hacerlo por las dos caras del plano, de modo que se obtiene una mezcla de enantiómeros: el isómero original L y el isómero invertido D (Wong y Parasrampurua, 1997). El aminoácido más susceptible a la racemización es el ácido aspártico, ya que forma el intermediario cíclico de succinimida que cataliza esta reacción (Friedman y Masters, 1979).

β-Eliminación

La ionización de un protón- α puede producir un intermediario para la β -eliminación (Volkin y col., 1995). Un grupo funcional o un sustituyente unido al carbono- β del mismo aminoácido actúan como grupo de salida. El primer paso es la formación del α -carbanión. La velocidad de esta reacción se incrementa a pH alcalino. El siguiente paso que influye en la velocidad es la capacidad del β -sustituyente de actuar como grupo saliente. La reacción es además dependiente de la temperatura. A pH neutro o ácido y temperatura ambiente o menor, la reacción es poco frecuente (Volkin y col., 1995).

Intercambio tiol-disulfuro. Destrucción de cistina

Los residuos de cistina (disulfuros) aparecen naturalmente por la unión covalente de las cadenas polipeptídicas, ya sea intra o intermoleculares. Los enlaces disulfuros se forman por oxidación del grupo tiol del residuo de cisteína, por intercambio tiol-disulfuro o por oxidación directa. La formación de un enlace disulfuro dependerá de la conformación de la proteína y de la estabilidad intrínseca del potencial de residuos de cistina, en comparación con las cisteínas libres (Volkin y col., 1995).

Las proteínas intracelulares usualmente carecen de enlaces cruzados tipo disulfuro, y su presencia atípica está relacionada con el mecanismo catalítico de una enzima o con la regulación de su actividad (Volkin y col., 1995). En contraste, las proteínas extracelulares contienen frecuentemente enlaces disulfuro debido a la necesidad de incrementar su estabilidad. Los residuos de cistina estabilizan directamente la forma plegada de una proteína y reducen la entropía conformacional del estado desplegado. Sin embargo, el enlace disulfuro es lábil bajo ciertas condiciones, en especial cuando se expone a la acción de agentes reductores, calor y pH alcalino (Volkin y col., 1995).

Oxidación de residuos de cisteína

La estabilidad relativa de una cisteína reducida y su contraparte oxidada, el enlace disulfuro, depende del potencial redox del ambiente que rodea a la proteína. *In vivo*, los donores y aceptores de electrones que interactúan con grupos tioles y disulfuros de las proteínas, son principalmente otros grupos tioles y disulfuros (p. ej. GSSG y GSH). Estudios *in vitro* de plegamiento de proteínas, requieren una solución tampón que contenga potenciales redox o

mezclas de grupos tioles oxidados y reducidos para catalizar la oxidación de residuos de cisteína, con la formación de enlaces disulfuros que conduzcan a la formación de la proteína nativa. También pueden utilizarse agentes reductores como el DTT para mantener residuos de cisteína en su forma reducida activa (Volkin y col., 1995).

Los grupos tioles libres también reaccionan espontáneamente con el oxígeno disuelto para formar enlaces disulfuros intra e intermoleculares, y productos monomoleculares como el ácido sulfénico. Esta reacción de auto-oxidación es catalizada por cationes divalentes como el cobre y el hierro, y se incrementa a elevados valores de pH. La disminución del pH a valores ácidos disminuye la reactividad oxidativa de los grupos tioles. Por otra parte, la congelación de soluciones de proteínas concentradas que pueden tener elevados niveles de oxígeno disuelto conduce a la formación irreversible de ácido cistéico (Volkin y col., 1995).

La formación de puentes disulfuro durante la purificación o almacenamiento de proteínas que contienen residuos de cisteína reducidos, a menudo produce la disminución de la actividad biológica (Volkin y col., 1995). En algunas proteínas como el aFGF que presentan dos o más cisteínas libres y no puentes disulfuros, se ha logrado reducir la susceptibilidad a la oxidación con polianiones. Aparentemente esto se debe al impedimento estérico que proporcionan las cargas negativas a los grupos tioles sensibles. Otras técnicas como la mutagénesis dirigida han permitido sustituir residuos de cisteína por residuos de treonina, valina o alanina (Volkin y col., 1995). Esta técnica se empleó en nuestro país, en el CIGB, para obtener la IL-2 humana recombinante (IL-2 hum-rec) mutada en la posición 125 (cisteína por alanina) (Vispo y col., 1997). Con esta mutación se eliminó la posibilidad de que la cisteína libre interactuara con la de otras moléculas de IL-2 hum-rec o se formaran enlaces incorrectos entre esta cisteína y las otras dos que presenta la proteína.

Oxidación de residuos de metionina

La oxidación de la metionina se ha asociado con la pérdida de la actividad biológica en numerosos péptidos y proteínas (Wang, 1999). Sin embargo, la IL-2 hum-rec por ejemplo, conserva completamente su actividad biológica con la forma oxidada de este residuo en la posición 104 (Hora y col., 1992). El IFN α 2b tampoco pierde su actividad biológica tras la oxidación de la metionina en la posición 101 (Bordens y col., 1997).

Esta reacción consiste en la conversión reversible de un tioéter en su sulfóxido correspondiente, ya que la metionina se puede regenerar enzimáticamente o por agentes reductores. Las condiciones de oxidación drástica conducen a la formación irreversible de la metionina sulfona (Wang, 1999, 2000).

In vivo, las EROs como superóxido, hidroxilo y H₂O₂ se producen en varias células (p. ej., neutrófilos). Estas especies pueden ocasionar la oxidación de varios aminoácidos como la metionina (Volkin y col., 1995).

In vitro, las EROs pueden ser generadas por compuestos que se usan en estudios de plegamiento-desplegamiento de las proteínas. Por ejemplo, pequeñas cantidades de cobre en presencia de glucosa, pueden oxidar la metionina. Además la oxidación del DTT puede conducir a la generación de H₂O₂ y a la subsecuente oxidación de proteínas (Volkin y col., 1995).

La oxidación de la metionina puede ocurrir también durante la purificación y el almacenamiento de las proteínas (Volkin y col., 1995).

Estrategias para el desarrollo de formulaciones estables

El desarrollo de formulaciones que incrementen la estabilidad del ingrediente activo, especialmente cuando éste es una molécula de origen proteico, constituye un punto neurálgico en el campo biofarmacéutico. Las estrategias para acometer esta finalidad han involucrado la afectación de varios factores intrínsecos y/o extrínsecos a la proteína objeto de estudio. Entre las estrategias más importantes están el uso de la liofilización, el empleo de excipientes estabilizadores, la conjugación a polímeros y la ingeniería de proteínas (Wang, 1999, 2000).

Liofilización

La liofilización es un proceso relativamente simple, mediante el cual se elimina el agua de un producto a bajas temperaturas y presiones (Carpenter y col., 1998).

En la actualidad se emplea para eliminar el agua de determinados productos, sin manipularlo de forma excesiva, o para incrementar la estabilidad de un producto antes y durante su almacenamiento. Los principales productos en los que actualmente se usa este procedimiento son los medicamentos parenterales, juegos de reactivos para el diagnóstico, suero y plasma sanguíneos, antibióticos y vacunas (Carpenter y col., 1998; Wang, 2000).

El proceso de liofilización consta de tres etapas: congelación del producto, secado primario o sublimación, y secado secundario (Carpenter y col., 1998; Wang, 2000). Éstas se interrelacionan funcionalmente, por lo que un fallo en una de ellas implica un fallo en el proceso completo. En general, varios factores en el proceso influyen de manera significativa en la estabilidad física, química y biológica del producto final, por lo que se deben estudiar y estandarizar cuidadosamente. Entre ellos están la velocidad y la temperatura de

congelación, la presión, el tiempo y las temperaturas de sublimación y secado secundario (Carpenter y col., 1998; Wang, 2000).

Empleo de excipientes estabilizantes

Los principales excipientes que se han empleado para estabilizar proteínas, tanto en estado líquido como sólido, son los azúcares, aminoácidos, detergentes no iónicos, polímeros, sales y alcoholes polihidroxílicos (Arakawa y col., 2001; Timasheff, 1993; Wang, 1999, 2000).

La inestabilidad de una proteína en solución se expresa por lo general como un equilibrio simple de dos estados: nativo y desnaturalizado. La adición de estabilizantes desplaza el equilibrio hacia el estado nativo. Anteriormente se pensaba que el efecto estabilizante de un aditivo se debía a su unión con las proteínas. Sin embargo, mediante experimentos de equilibrio de diálisis se ha determinado que estabilizantes como la sacarosa, la glucosa y el cloruro de sodio se excluyen preferencialmente de las proteínas. Estos experimentos indican que existe una zona de exclusión de los estabilizantes alrededor de las moléculas de la proteína (Arakawa y col., 1991).

Durante la desnaturalización de una proteína se incrementa la zona de exclusión de los estabilizantes. De esa forma, la superficie de contacto entre las proteínas y los excipientes también se incrementa. Como la unión entre los estabilizantes y la proteína resulta desfavorable termodinámicamente, el equilibrio se desplaza hacia el estado nativo lo cual minimiza la interacción entre la proteína y los excipientes (Timasheff y Arakawa, 1989).

Sales, azúcares, aminoácidos, polímeros y alcoholes polihidroxílicos

Cualquier sustancia que incremente la tensión en la interfase entre la molécula proteica y el solvente es excluida preferencialmente. Una vez que los excipientes se excluyen de la superficie de la proteína, esta se hidrata y se estabiliza. Estabilizantes como los azúcares, aminoácidos, PEGs y algunas sales, estabilizan la estructura proteica y minimizan esa tensión en la superficie de la proteína (Wong y Paraspampuria, 1997; Wang, 1999, 2000).

En el caso de las sales, su efecto en la estabilidad de una proteína depende de su concentración y de su afinidad para unirse a la misma. Esos dos factores afectan directamente el grado de hidratación preferencial de la molécula proteica (Arakawa y col., 1991).

Las proteínas se estabilizan cuando se hidratan preferencialmente, en cambio, cuando los excipientes se unen a ellas desestabilizan su estructura tridimensional. Ello ocurre fundamentalmente a concentraciones altas de estos excipientes, aunque existen sales que desestabilizan las proteínas mediante su unión a éstas a cualquier concentración. Entre

estas últimas están el tiocianato de potasio, el cloruro de calcio, el cloruro de magnesio y el tiocianato de sodio (Wong y Paraspampurua, 1997). A pesar de que la unión específica entre una proteína y la sal tiende a desestabilizar a la primera, hay casos en los cuales esta interacción puede estabilizarla (Wong y Paraspampurua, 1997).

El PEG es otro agente capaz de estabilizar las proteínas. Sin embargo, también puede provocar su precipitación mediante el efecto de precipitación salina. Su efecto estabilizante se basa en su exclusión de la superficie de la proteína por impedimentos estéricos. Esta hipótesis se sustenta por el hecho de que el grado de hidratación se incrementa con el aumento del PM del polímero (Wong y Paraspampurua, 1997; Wang, 1999, 2000).

Detergentes

Los detergentes contribuyen al replegamiento de las proteínas que se han desnaturalizado por medios químicos, mediante la formación de una asociación transiente entre la proteína desnaturalizada y las micelas del surfactante. Este proceso, mediante el cual las micelas previenen la formación de agregados debido al bloqueo de los grupos hidrofóbicos que se exponen en la proteína desnaturalizada, se nombra repleglamiento asistido por micelas. Sin embargo, los detergentes también pueden prevenir las asociaciones intermoleculares de las proteínas y de éstas con las superficies hidrofóbicas (Wong y Paraspampurua, 1997; Bam y col., 1998; Wang, 1999).

Se han descrito dos mecanismos fundamentales de estabilización de proteínas por medio de detergentes. El primero se basa en la competencia con las moléculas de la proteína, por las interfaces solución-aire y solución-material de envase, en las cuales se propician muchas de las reacciones de desestabilización que se describen para estas biomoléculas. El segundo de los mecanismos se basa en la interacción con la biomolécula mediante el recubrimiento de los grupos hidrofóbicos de éstas a través de los cuales la agregación puede ocurrir, o actuando como “chaperonas” para conducir a las proteínas parcialmente desnaturalizadas a su estado nativo (Bam y col., 1998).

Conjugación a polímeros biocompatibles

La conjugación a polímeros es otra alternativa para incrementar la estabilidad de las proteínas. Esta estrategia no sólo puede aumentar la estabilidad de moléculas de origen proteico, incluso en medios altamente hidrofóbicos (Wang, 1999), sino además, garantiza un índice farmacocinético mejor, disminuye la velocidad de aclaramiento y aumenta el tiempo de vida media en la sangre (Wang, 1999).

Una gran variedad de polímeros se ha usado para la conjugación a proteínas de importancia terapéutica. Los requerimientos generales de cualquier polímero que se vaya a usar con estos propósitos son: (i) alta solubilidad en agua, (ii) biocompatibilidad, (iii) poca o ninguna inmunogenicidad y (iv) no afectar la función biológica de la proteína de interés. Por ello, la conjugación debe mejorar las propiedades de las proteínas (estabilidad y farmacocinética), sin incrementar su toxicidad o reducir su actividad biológica (Katre, 1993).

El PEG ha sido, generalmente, el polímero de elección para estos fines (Katre, 1993). Esta molécula se basa en la unidad $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ repetida n veces, en dependencia del PM del polímero. Carpenter y colaboradores estudiaron la biocompatibilidad del PEG en perros, luego de inyecciones intravenosas de este polímero, y demostraron que carece absolutamente de toxicidad y/o bio-acumulación en estos organismos (Carpenter, 1971). Sin embargo, cuando se han utilizado PEGs de muy bajo PM como el de 200 Da, se ha comprobado que puede ocurrir la lisis de los eritrocitos por un fenómeno de ósmosis (Rowe y col., 2003).

Las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se recuperan usualmente como cuerpos de inclusión con baja solubilidad en solventes acuosos, lo que se favorece en el caso de proteínas no glicosiladas. El empleo de la conjugación ha logrado incrementar la solubilidad de estas proteínas a pH fisiológico, y permitido el diseño de formulaciones estables para su uso clínico. Entre ellas tenemos la IL-2, el IFN β , IFN α , la hGH, la insulina y otras (Katre, 1993; Reddy, 2004; Yang y col., 2004). Otras proteínas como enzimas y anticuerpos también se han modificado de forma covalente mediante la unión al PEG. Para la inmunoglobulina G modificada de esta manera se observó un incremento en la estabilidad térmica y la solubilidad; en el caso de la enzima gluconolactona oxidasa se observó un incremento en la estabilidad térmica, y para la cadena A de la toxina de plantas denominada ricina, se observó un aumento significativo en la solubilidad (Katre, 1993).

Otros polímeros también se han evaluado para estos fines. Abuchowski y colaboradores revisaron una gran cantidad de estos compuestos capaces de mejorar las propiedades de las enzimas. Entre éstos estaban la polivinilpirrolidona, el ácido polimaleico, la polialanina, la ASH, varios oligosacáridos, el ácido poliacrílico, el alcohol polivinílico, la carboximetilcelulosa y la dextrana. Sin embargo, a pesar de que el tiempo de vida media en el plasma sanguíneo se incrementó en todos los casos, la inmunogenicidad con algunos de estos polímeros no se redujo lo suficiente como para permitir esquemas de tratamiento prolongados y de dosis repetidas (Abuchowski y col., 1981).

No obstante, varios investigadores han enfocado sus estudios a estos polímeros para demostrar sus posibilidades en cuanto a estabilización térmica y disminución de la inmunogenicidad. Alpin y Wriston encontraron que la unión de la catalasa a la dextrana de alto PM puede incrementar el tiempo de circulación sistémica, la resistencia a la proteólisis y la estabilidad térmica, al tiempo que disminuye su inmunogenicidad (Alpin y Wriston, 1981). A pesar de las bondades encontradas en el empleo de estos métodos, se ha visto que escoger un polímero y/o método de modificación debe ser estudiado de manera intensiva e independiente para cada proteína, pues en algunos casos se ha demostrado la disminución de la función biológica de algunas de estas macromoléculas, después de este tipo de unión covalente (Katre, 1993).

Ingeniería de proteínas

Otra estrategia para el mejoramiento de la estabilidad de las proteínas ha sido la manipulación de los factores intrínsecos que están codificados generalmente por la secuencia aminoacídica de dichas moléculas. Entre estos factores están:

- 1- Incremento del contenido de pares iónicos;
- 2- Reducción del número y volumen de las cavidades;
- 3- Reducción de la flexibilidad a temperatura ambiente y de la longitud de los lazos superficiales, en particular aquellos que conectan elementos de estructura secundaria;
- 4- Optimización de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas;
- 5- Intercambio de aminoácidos para incrementar la hidrofobicidad interna;
- 6- Intercambio de aminoácidos susceptibles a la degradación como la cisteína, la asparagina, la glutamina, la metionina, y otros.

Argos y colaboradores propusieron ciertas reglas para el tránsito de secuencias aminoacídicas mesófilas (estables a temperaturas medias), a secuencias termófilas (estables a temperaturas altas). Sus estudios sugirieron que el incremento en las estructuras helicoidales (mediante cambios de serina y valina por alanina), el aumento en la hidrofobicidad (mediante cambios de glicina y serina por alanina, serina por treonina y ácido aspártico por asparagina o glutamina) así como el cambio de lisina por arginina, pueden favorecer la capacidad termófila de las proteínas (Argos y col., 1979; Menéndez-Arias y Argos, 1989).

En la actualidad se sugiere que una disminución de la flexibilidad y un incremento de la hidrofobicidad, ambos preferiblemente en regiones de hélices α , constituyen el principio de estabilización fundamental a altas temperaturas (Menéndez-Arias y Argos, 1989).

Un análisis aminoacídico de proteínas provenientes de organismos mesófilos y termófilos indicó que los cinco cambios de aminoácidos más frecuente de enzimas mesófilas a termófilas son lisina por arginina, serina y glicina por alanina, serina por treonina e isoleucina por valina (Menéndez-Arias y Argos, 1989). Ello ha dado origen a mutaciones dirigidas para lograr el incremento de la estabilidad de varias proteínas (Menéndez-Arias y Argos, 1989).

La compactación de las moléculas de proteína resulta otro de los factores importantes para incrementar su estabilidad, y de hecho explica en parte la estabilidad de las moléculas termófilas. Un incremento en la compactación de la estructura proteica induce un incremento en las interacciones de van der Waals, lo que a su vez incrementa la estabilidad de las proteínas.

Se ha comprobado además que la estabilidad térmica de las enzimas se incrementa con la disminución del volumen de sus cavidades (Chan y col., 1995; Spassov y col., 1995). En la enzima glutamato deshidrogenasa, por ejemplo, se encontró un incremento significativo de residuos de isoleucina. Este aminoácido puede adoptar numerosas conformaciones rotámeras y por ende puede “rellenar” varias cavidades en el núcleo de la proteína (Spassov y col., 1995).

Otros estudios estructurales indican que las conformaciones todo- α , todo- β o α/β tienden a un máximo de termoestabilidad (Tomizawa y col., 1995). Todos estos factores han impulsado a numerosos investigadores a determinar la influencia que pueden causar algunos cambios de aminoácidos en varias proteínas. Tomizawa y colaboradores evaluaron el efecto de cambios aminoacídicos en la estabilización de la lisozima de huevo. En sus estudios, prepararon mutantes de las secuencias ácido aspártico-glicina en las posiciones 48-49, 66-67 y 101-102, y asparagina-glicina en la posición 103-104, mediante el cambio de la glicina por la alanina. Las mutaciones sitio-dirigidas se basaron en la tendencia que tienen estas secuencias para favorecer algunas reacciones de modificación como la isomerización del ácido aspártico y la desamidación de la asparagina. Con estas modificaciones lograron un incremento en la resistencia a la inactivación irreversible a pH 4 y 100°C (Tomizawa y col., 1995).

Otros experimentos en este sentido fueron realizados por Kosky y colaboradores (1999). Estos investigadores evaluaron el efecto de la hélice α en la estabilidad de los residuos de asparagina, y determinaron la velocidad de desamidación en péptidos con diferentes grados de estructura helicoidal. Para ello, sustituyeron residuos de alanina por glicina en las posiciones 6 y 16 de un octadecapéptido con un alto contenido de alanina. Con ello,

disminuyeron el contenido helicoidal de un 42 a un 9 %, y demostraron que la velocidad de desamidación en este péptido fue inversamente proporcional al contenido de hélice α (Kosky y col., 1999).

A pesar de que la ingeniería de proteínas ha ofrecido un gran número de herramientas para el mejoramiento de la estabilidad de las proteínas mediante la incidencia en los factores intrínsecos a estas biomoléculas, los estudios elementales para el diseño de formulaciones estables incluyen, principalmente, el estudio de los factores extrínsecos a éstas (Wang, 1999).

Desarrollo de formulaciones mediante la evaluación de los factores extrínsecos a las proteínas

Hasta el momento no existe un vehículo farmacéutico universal capaz de garantizar la estabilidad de cualquier proteína. Se han descrito vehículos muy diferentes para un gran número de proteínas; por ejemplo, acetato de sodio-polisorbato 80-sorbitol para el G-CSF (Herman y col., 1996), fosfato de sodio-polisorbato 80-EDTA-m-cresol para el IFN α -2b (Yuen y Kline, 1999), acetato de sodio-alcohol bencílico-polisorbato 80 para el IFN α -2a (Gross y col., 1998) y fosfato de sodio-ASH-polisorbato 20 para la EPO (Naughton y col., 2003), entre otros. Sin embargo, el establecimiento de las mejores condiciones para lograr la estabilidad de una proteína puede convertirse en un proceso extremadamente extenso y difícil, sobre todo cuando se trata de una proteína nueva y los métodos de análisis presentan poca capacidad de procesamiento. Ello se debe a que en esos casos resulta necesario evaluar una serie de variables, entre las que se incluyen las especies tampones, molalidad, pH, excipientes estabilizantes, material de envase, interacción entre los excipientes, interacción de los excipientes con el ingrediente activo, proceso de liofilización, temperaturas y agitación. Ello hace necesario la realización de estudios multifactoriales que por lo general hacen engorroso y extremadamente caro cualquier estudio de preformulación.

Estudios de preformulación

Según Volkin y colaboradores la preformulación se refiere al proceso mediante el cual el ingrediente activo se caracteriza lo suficiente como para poder convertirlo en una sustancia farmacéuticamente aceptable (Volkin y col., 2002).

En el caso de las moléculas convencionales pequeñas, este proceso se puede simplificar debido a su estructura más sencilla. Por ejemplo, la estructura atómica de estos compuestos se puede determinar a partir de la combinación de técnicas como la cristalografía, la

difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (Volkin y col., 2002).

En cambio, la gran complejidad de las proteínas, debido a la combinación de su gran tamaño y sus niveles estructurales (secundaria, terciaria y cuaternaria), no permite la aplicación simple de las técnicas analíticas que se utilizan para moléculas químicas pequeñas. Por ello, los estudios de preformulación para el análisis de la estructura de proteínas consisten en el uso de un gran número de métodos para evaluar varios aspectos de la estructura de la proteína. Por ejemplo, la estructura secundaria se puede determinar por dicroísmo circular y espectroscopía infrarroja con la transformada de Fourier. Por su parte, la estructura terciaria se puede comprobar por cristalografía y estudios de fluorescencia intrínseca (Volkin y col., 2002). Además, el estado oligomérico de una proteína así como los fenómenos de agregación potenciales que pueden afectar su estabilidad, se pueden estudiar por cromatografía, ultracentrifugación diferencial y difusión dinámica de la luz. Otras técnicas para este fin son la PAGE tradicional, el isoelectroenfoque y la PAGE capilar. Cuando se combinan estas técnicas analíticas, se puede obtener un cuadro de la proteína lo más cercano a la realidad, de modo que cualquier alteración en la estructura de ésta puede detectarse con exactitud (Volkin y col., 2002).

Por otra parte, Wang señaló que para desarrollar una formulación de manera exitosa, se deben conocer las propiedades básicas de una proteína. Esto incluye la pureza de la proteína, *pI* y solubilidad a diferentes *pHs* (Wang, 1999).

Otros aspectos críticos que se pueden revisar durante la preformulación son los sistemas tamponeadores, el *pH*, los modificadores de la tonicidad, los estabilizantes, los ciclos de congelación-descongelación y la adsorción a las interfases (Wang, 1999). Sin embargo, en la literatura no existe un "protocolo" de preformulación definido que se pueda llevar a la práctica para obtener una formulación estable. Ello lo demuestra la abundancia en cuanto a estudios de preformulación diferentes que se han publicado hasta la fecha.

Fatouros y colaboradores investigaron la influencia de disacáridos no reductores y alcoholes polihidroxílicos en la cinética de inactivación del factor VIII obtenido por vía recombinante, en solución acuosa. La estabilidad de esta biomolécula se determinó mediante SE-HPLC a diferentes temperaturas. Además, se evaluó su estabilidad térmica mediante la calorimetría diferencial de barrido (Fatouros y col., 1997).

Jain y colaboradores evaluaron diferentes variables de formulación en el desarrollo de un novedoso sistema de liberación de drogas. Entre estas variables se encontraban la

concentración de PEG 400, el excipiente hidrofílico, el tipo de droga encapsulada (micromoléculas ó macromoléculas como proteínas) y el vehículo para la formación del sistema de liberación. Además, evaluaron el efecto de la formulación, del proceso y de las condiciones de almacenamiento (Jain y col., 2000).

También en el año 2000, Fatouros y Sjostrom investigaron la influencia de la temperatura, el pH y las interacciones iónicas, en la estabilidad estructural y la adsorción a superficies del factor VIII del plasma sanguíneo, obtenido por la vía recombinante. En este estudio también estudiaron la interacción del ingrediente activo con las interfases solución/vial y solución/aire. La estabilidad de la biomolécula se evaluó mediante la determinación de la actividad biológica, la estructura secundaria (dicroísmo circular) y la tensión superficial (Fatouros y Sjostrom, 2000).

Algo diferente acometieron Bedu-Addo y colaboradores en el año 2002. Su objetivo fundamental fue realizar un estudio de preformulación de la estafiloquinasa unida covalentemente al PEG. Para ello utilizaron diseños multifactoriales en los que evaluaron el efecto de la fuerza iónica de las soluciones tampones, la concentración de cloruro de sodio y el pH, en la conformación y la estabilidad de esta proteína. En este estudio emplearon el dicroísmo circular y la calorimetría diferencial de barrido para evaluar la estructura secundaria y la estabilidad térmica de la proteína, respectivamente. Además, analizaron las modificaciones en esta molécula como la ruptura de la unión con el PEG y la agregación, mediante la SE-HPLC (Bedu-Addo y col., 2002).

En el año 2004, Kikwai y colaboradores evaluaron el efecto del pH, la temperatura, la concentración de sales y la concentración del ingrediente activo en una solución acuosa de un péptido de 1668 Da, que se une específicamente al receptor de neurokinina-1 y que posee importantes propiedades antiinflamatorias. Para el análisis de este péptido desarrollaron un ensayo de RP-HPLC. La estabilidad de este ingrediente activo también se evaluó mediante el dicroísmo circular y la espectrometría de masas (Kikwai y col., 2004).

En el año 2005, Na y colaboradores investigaron el potencial del KSL, un decapeptido antimicrobiano, en un estudio de preformulación. En este caso se desarrolló un método analítico de RP-HPLC para la determinación del ingrediente activo y se analizó la estabilidad química del péptido a varios valores de pH y temperatura así como la interacción del KSL con la hidroxiapatita (Na y col., 2005).

En este mismo año, Passot y colaboradores estudiaron el efecto de varios excipientes en la caracterización física y la estabilidad física y química de dos proteínas. Con ese objetivo

analizaron 13 formulaciones desde el punto de vista termo-físico mediante la calorimetría diferencial de barrido y la microscopía, analizando las temperaturas de transición y de colapso así como la actividad inmunogénica (Passot y col., 2005).

También en el año 2005, Reyes y colaboradores publicaron un estudio de preformulación de la IL-2 hum-rec en el que evaluaron la influencia de diferentes excipientes (detergentes, antioxidantes y aminoácidos) en la estabilidad de esta citoquina cuando se encontraba en solución. La estabilidad de esta proteína se evaluó por SDS-PAGE y RP-HPLC, determinación de la actividad biológica, la concentración de proteínas por el método de Lowry (Reyes y col., 2005).

Influencia del material de envase en la estabilidad de las proteínas

Una parte importante de los estudios de preformulación está relacionada con la compatibilidad de la proteína con el material de envase.

Según la farmacopea británica, los tapones de goma para preparaciones parenterales se fabrican de materiales obtenidos por vulcanización de sustancias orgánicas macromoleculares (elastómeros), en presencia de excipientes apropiados. Los elastómeros se producen a partir de sustancias naturales o sintéticas por polimerización, poli-adición o poli-condensación. La naturaleza de los principales componentes (elastómeros, catalizadores, estabilizadores y pigmentos), depende de las propiedades que se requieran en el producto terminado (British Pharmacopoeia, 1998). Los principales extractables de los tapones que recomienda cuantificar esta farmacopea son: amonio, metales pesados, zinc soluble, sulfuros volátiles y sustancias reductoras (British Pharmacopoeia, 1998).

En 1992, Danielson identificó y cuantificó diferentes componentes de los tapones, en soluciones parenterales (Danielson, 1992). También determinó su toxicidad potencial mediante la comparación del tipo y concentración de estos componentes con lo reportado en la literatura. Este autor detectó y cuantificó niveles considerables de algunos de estos agentes como el benzaldehído, el 2-butoxietanol, la ciclohexanona, el etilbenceno y el tetracloroetileno los cuales pueden provocar toxicidad o afectar la estabilidad de los ingredientes activos de las soluciones parenterales (Danielson, 1992).

Algunos estudios apuntan a que los tapones siliconados pueden constituir una fuente de contaminación por partículas cuando se utilizan para productos parenterales (Li y col., 1993). En un estudio, Li y colaboradores evaluaron cinco variables (pH de la solución, composición de la solución tampón, teflón como recubrimiento de los tapones, ciclo de esterilización por calor y variaciones en el proceso de siliconización de lote a lote) en los niveles de

contaminación por partículas debido a los tapones siliconados (Li y col., 1993). Sus resultados mostraron que el pH de la solución puede afectar de manera significativa el nivel de contaminación por partículas. De esta manera, un pH alcalino (pH 8) produce una mayor carga de partículas que un pH ácido (pH 4) (Li y col., 1993).

Fatouros y Sjostrom estudiaron la adsorción del factor VIII obtenido por vía recombinante a las superficies del material de envase primario (viales de vidrio y tapones de goma). Los autores encontraron que esta proteína podía adsorberse al material de envase de manera directamente proporcional a la velocidad de agitación. Ello se debió a que la agitación incrementó el área que estaba en contacto con el material de envase. Sin embargo, el uso de detergentes no iónicos como el polisorbato 20 y el polisorbato 80, inhibió este efecto (Fatouros y Sjostrom, 2000).

Bohrer y colaboradores investigaron la interacción de diferentes soluciones comerciales para la nutrición parenteral, con el material de envase después de la esterilización por calor a 121°C durante 30 min. La solución resultante se analizó por espectroscopía de absorción atómica para la posible detección de metales. Este estudio reveló una liberación de aluminio a partir del cristal, el plástico y la goma (Bohrer y col., 2003). Los resultados de la esterilización indicaron que aún el agua pura fue capaz de extraer aluminio del cristal y la goma (Bohrer y col., 2003). Estos investigadores explicaron sus resultados por las propiedades intercambiadoras de algunas sustancias presentes en las soluciones parenterales como la lisina, la ornitina, el ácido glutámico, el ácido aspártico, la cisteína, los iones fosfato y los iones bicarbonato. Sin embargo, concluyeron que solamente la afinidad de los componentes de las soluciones por el aluminio presente en los diferentes materiales de envase, podía explicar la alta concentración de aluminio extraído. Otros experimentos con agentes acomplejantes del aluminio permitieron concluir que mientras mayor es la constante de estabilidad del complejo que se forma entre la sustancia presente en la solución, y el aluminio, mayor es la liberación de este metal a la solución (Bohrer y col., 2003).

Antes de la aplicación al paciente, los productos farmacéuticos se mantienen en contacto con diferentes superficies como jeringas y tapones (Jones y col., 2005). Estos materiales se tratan con agentes protectores para inhibir la posible adsorción de las proteínas a estas superficies. En diferentes estudios se ha observado que uno de estos agentes protectores, el aceite de silicona, induce la agregación de las proteínas (Jones y col., 2005).

En el año 2005, Nassar y colaboradores investigaron el posible papel de los tapones elastoméricos en la formación de dos productos de degradación en la formulación liofilizada

del BMS-204352, una molécula química compleja que actúa sobre los canales de potasio (Nassar y col., 2005). Una de estas degradaciones se identificó como un derivado hidroximetilo, formado por la reacción de esta molécula con el formaldehído. De acuerdo a estos resultados, los autores sugirieron que el formaldehído podría originarse en los tapones y migrar hacia el producto. De esta forma podría reaccionar con el ingrediente activo dando lugar al producto de degradación (Nassar y col., 2005). Aunque el formaldehído no es un ingrediente de los tapones, algunas informaciones de los productores de tapones indican que uno de los agentes utilizados en la formulación de este material de envase primario (el agente de reforzamiento) puede constituir una fuente de formaldehído (Nassar y col., 2005). Por su parte, Jenke y colaboradores identificaron varios de los extractables asociados con la poliolefina, un plástico utilizado para la elaboración de contenedores para soluciones en la industria médico-farmacéutica. Además, documentaron los niveles a los cuales estos extractables se acumulaban en las soluciones de prueba en varios regímenes de almacenamiento. Entre los extractables que encontraron estaban el ácido octanoico, el ácido hexanoico, la p-toluenosulfonamida, la 2-oxohexametileneimina, la cis-13-docosenoamida, el ácido propanoico y antioxidantes (Jenke y col., 2005). Un paso importante para la mayor comprensión de este fenómeno sería el estudio de la influencia de estos extractables en la estabilidad de diferentes ingredientes activos.

Todos estos reportes indican que uno de los factores más importantes durante el desarrollo de una formulación es la evaluación de la influencia del material de envase primario en la estabilidad del ingrediente activo en cuestión.

Análisis de las señales cromatográficas

Una de las técnicas más empleadas en los estudios de estabilidad es la cromatografía líquida (Wang y col., 1999). Esta técnica proporciona importantes indicadores sobre la estabilidad de las proteínas como la pureza y el área bajo la señal de interés (Reyes y col., 2005). El primero de estos indicadores relaciona el área bajo la señal de interés con el área bajo el resto de las señales en el cromatograma. El segundo de estos parámetros es un indicador del contenido proteico que existe en la muestra de análisis (Reyes y col., 2005).

En la técnica de HPLC existe una serie de parámetros que se deben tener en cuenta para llegar a resultados confiables. Entre ellos están la resolución, el factor de capacidad, la eficiencia y el número de platos teóricos.

La resolución es una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. La resolución de cada columna queda definida como:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 - W_1}$$

donde:

R es la resolución;

t_1 es el tiempo de retención del analito 1;

t_2 es el tiempo de retención del analito 2;

W_1 es la anchura del pico correspondiente al analito 1 a la mitad de su altura; y

W_2 es la anchura del pico correspondiente al analito 2 a la mitad de su altura.

Se puede mejorar la resolución para una fase estacionaria determinada alargando la columna, lo que incrementa a su vez el número de platos. Sin embargo, una consecuencia adversa de añadir platos es un incremento en el tiempo necesario para la separación de los componentes.

El factor de capacidad se conoce actualmente como factor de retención (k). Éste es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en columnas. Para el soluto 1, el factor de retención, k_1 se define como:

$$k_1 = \frac{K_1 \cdot V_s}{V_m}$$

donde K_1 es la constante de distribución del soluto 1, V_s es el volumen del soluto en la fase estacionaria y V_m el volumen del soluto en la fase móvil (USP 26, 2003).

La eficiencia de una columna cromatográfica depende del ensanchamiento de banda que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna. Para las mediciones cuantitativas de la eficiencia de las columnas cromatográficas se emplean dos términos: (1) *altura del plato* (H) y (2) *cantidad de platos o número de platos teóricos* (N). Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = \frac{L}{H}$$

donde L es la longitud del empaque de la columna (en cm).

Cuando se usan integradores electrónicos la ecuación que se aplica es:

$$N = 5,56 \left(\frac{t}{W_{h/2}} \right)^2$$

donde t es el tiempo de retención y $W_{h/2}$ es la anchura del pico a la mitad de su altura.

La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos N y la altura H es menor. Se observan grandes diferencias en la eficiencia de las

columnas como resultado de las diferencias en el tipo de columna y de las fases móvil y estacionaria. En términos de número de platos teóricos, la eficiencia puede variar desde unos centímetros hasta varios cientos de miles; la altura de los platos varía desde unas décimas hasta milésimas de centímetro y son comunes incluso mas pequeñas (USP 26, 2003).

Las pruebas de pureza por cromatografía se basan algunas veces en la determinación de señales de impurezas, y se expresan como el porciento de area la señal nativa (sin modificaciones). Sin embargo, para las pruebas de este tipo la USP 26 recomienda comparar estos cromatogramas con un cromatograma a igual concentración de manera que se normalicen las áreas bajo las señales de interés (USP 26, 2003).

Existen dos vías generales para la integración de las señales cromatográficas: la vía manual y la vía automática (Quattrocchi y col., 1992).

La integración manual puede llevarse a cabo mediante cuatro métodos diferentes:

- a) Determinación de la altura del pico: Consisten en determinar la distancia desde la línea base al máximo del pico es, posiblemente, el método de integración más sencillo. Se ha reportado que las cuantificaciones por altura de pico suelen dar resultados más exactos que por área. En condiciones muy estables, también puede dar resultados más reproducibles.
- b) Triangulación: Consiste en trazar las tangentes a los puntos de inflexión en ambos lados del pico, de manera tal de formar un triángulo con la línea base. El área del pico se obtiene multiplicando el valor de la base por la mitad de la altura. Si bien este método es que mejor se aproxima al valor real de la muestra es poco reproducible debido a las imprecisiones que resultan de la medición del ancho del pico, y muy dependiente de la pericia del operador.
- c) Determinación del producto de la altura por el anchjo a media altura: Es uno de los métodos más empleados para medir el área manualmente. El área que se obtiene por este método no resulta una medida tan exacta del área real como la que ofrece la triangulación pero es un método bastante preciso y sencillo de operar.
- d) Corte y pesada: Es posiblemente el método más complejo y laborioso. Con él puede obtenerse el área edl pico y es el único método que ofrece resultados exactos cuando los picos presentan cierto grado de asimetría. Su precisión depende de la homogeneidad del papel, y en gran medida de la habilidad del operador.

La integración automática, por su parte, se realiza actualmente con el uso de los modernos integradores electrónicos o con computadoras, aunque existen otros dispositivos como los planíferos y los integradores de disco (Quattrocchi y col., 1992).

Los integradores digitales procesan la señal proveniente de los detectores de manera tan que se obtiene tanto el dibujo del cromatograma como las áreas y las alturas de los picos (Quattrocchi y col., 1992).

Quattrocchi y colaboradores consideran que el método más más correcto para determinar el área de una señal cromatográfica es a partir de la línea base (Quattrocchi y col., 1992). Sin embargo, otras variantes incluyen la deconvolución de las señales, el método valle a valle y el método de división vertical, que se pueden emplear indistintamente cuando el programa de integración lo permite (UNICORN 4.12. User Reference Manual).

Allen y colaboradores utilizaron la cromatografía líquida para la evaluación de la estabilidad de una forma híbrida de IFN α (Allen y col., 1999). En este estudio analizaron la estabilidad de esta proteína mediante la determinación de la pureza y del área bajo la señal correspondiente al ingrediente activo sin modificar. Estos datos fueron utilizados luego para la determinación de la velocidad de desestabilización y de disminución de la concentración (Allen y col., 1999).

Tan y colaboradores también utilizaron esta técnica para el análisis de la estabilidad de una formulación extemporánea de saquinavir (Tan y col., 2003). Mediante la RP-HPLC determinaron la concentración de este ingrediente activo. Para ello, el área bajo la señal de interés se comparó con el área de un estándar externo con una concentración conocida (Tan y col., 2003).

Reyes y colaboradores utilizaron esta técnica para determinar la pureza de la IL-2 en un estudio de estabilidad acelerado. En el mismo se evaluó la influencia de diferentes excipientes en la estabilidad de esta proteína (Reyes y col., 2005).

Estudios cinéticos

La etapa de preformulación de proteínas para el desarrollo de formulaciones estables se basa, en muchos casos, en estudios cinéticos que describen la influencia de determinados factores en la estabilidad de estos ingredientes farmacéuticos activos.

En 1988, Yu y colaboradores estudiaron la estabilidad física de la antitripsina α -1 recombinante mediante estudios cinéticos a 25, 35, 45, 60, 80 y 90°C (Yu y col., 1988). En este trabajo ajustaron los resultados de concentración de proteínas totales por el método de

Biuret, a una cinética de primer orden. Con ello predijeron la estabilidad de esta molécula en condiciones de vida de estante ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) (Yu y col., 1988).

La estabilidad de la IL-1 β en solución acuosa también se ha estudiado desde el punto de vista cinético (Gu y col., 1991). Esta evaluación se desarrolló en función de la temperatura (5-60°C), el pH (2-9), las soluciones tampones (acetato, citrato, tris y fosfato), y los estabilizantes (azúcares y ASH). La degradación e inactivación de esta proteína a una temperatura de 39°C o mayor, se atribuyó a la autoxidación de dos residuos de cisteína en la proteína desnaturalizada, seguido por la agregación por interacciones covalentes e hidrofóbicas y por la precipitación. A una temperatura de 30°C o menor, los resultados de este estudio sugirieron la posible desamidación de la molécula. Con estos resultados, sin embargo, no se pudo predecir la estabilidad en condiciones de vida de estante debido a las diferencias en los mecanismos de degradación en función de la temperatura (Gu y col., 1991).

En 1994, Chen y col., reportaron un estudio similar con el factor de crecimiento de queratinocitos (Chen y col., 1994). Mediante este estudio evaluaron la influencia de diferentes soluciones tampones y excipientes farmacéuticos en la agregación de este ingrediente activo. Con ello determinaron que los citratos a 0,5 mol/L, la heparina al 0,5 % y el sulfato de dextrana de alto PM al 0,5 % disminuyeron la velocidad de agregación de esta proteína (Chen y col., 1994).

En 1999, Allen y colaboradores publicaron un estudio de preformulación de una forma híbrida de IFN α (Allen y col., 1999). En este estudio se evaluó la influencia del pH, las soluciones tampones y la presencia de algunos excipientes en la velocidad de desestabilización de esta molécula, de acuerdo a una cinética de pseudo-primer orden (Allen y col., 1999). Los resultados de este estudio propiciaron la definición de una formulación líquida de esta proteína con la cual se realizaron estudios de estabilidad (Allen y col., 1999).

Oliva y colaboradores publicaron un estudio cinético similar (Oliva y col., 2003). Éste se basó en el efecto de la agitación en la estabilidad de la β lactoglobulina bovina, la ASH y la ASB (Oliva y col., 2003). Los principales resultados de este trabajo indicaron que la cinética de degradación de estas proteínas dependió de la molécula en cuestión y de la velocidad de agitación. Además, determinaron que la β lactoglobulina bovina mostró una cinética de degradación de pseudo-primer orden mientras que la ASH y la ASB mostraron una transición de monómero a dímero de manera independiente a la velocidad de agitación (Oliva y col., 2003).

Reyes y colaboradores reportaron un estudio parecido en el año 2005 (Reyes y col., 2005). Este estudio se basó en la evaluación de diferentes excipientes en la estabilidad de la IL-2 humana recombinante. Con ello se determinó el efecto estabilizante o desestabilizante de algunos excipientes farmacéuticos mediante la determinación de la velocidad de desestabilización de la molécula de acuerdo a una cinética de reacción de primer orden (Reyes y col., 2005).

Aunque en algunos casos los estudios cinéticos no permiten predecir la estabilidad de una proteína en condiciones reales de almacenamiento (Gu y col., 1991; Wang, 1999), constituyen una herramienta muy importante para definir la composición de la formulación (Allen y col., 1999; Reyes y col., 2005).

Estudios de estabilidad

Para acelerar el diseño de una formulación los estudios de estabilidad se llevan a cabo en condiciones aceleradas o estresantes. Estas condiciones pueden incluir altas temperaturas, alta humedad, luz intensa, valores extremos de pH, incremento de las interfases por agitación y ciclos consecutivos de congelación-descongelación. Por lo general, estos estudios son cortos pero muy útiles para la evaluación de múltiples formulaciones a la vez (Wang, 1999).

Según las regulaciones de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos, los estudios de estabilidad acelerados para productos que requieran refrigeración como las proteínas se deben realizar a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad del $60 \pm 5\%$ (EMA, 2002). Sin embargo, la temperatura ambiente está incrementándose a nivel global y de manera bastante usual se mantiene en valores superiores a 25°C . De modo que esta regulación deberá revisarse en los próximos años.

Los parámetros que se determinan en los estudios de estabilidad incluyen: actividad biológica, velocidad de desestabilización, formación de nuevos productos, agregación, precipitación, color de la solución, pH, viscosidad, esterilidad y presencia de pirógenos (Wang, 1999).

Los estudios de estabilidad en condiciones aceleradas se realizan, por lo general, a altas temperaturas. La clave principal de estos estudios radica en cómo estos resultados se pueden extrapolar a condiciones reales de almacenamiento mediante la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-(E_a / RT)}$$

donde k representa la velocidad de la reacción, A es una constante, E_a es la energía de activación, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura en grados Kelvin. Desde el punto de vista cualitativo se observa que al aumentar la energía calorífica sobre el sistema ésta produce un aumento de la energía cinética de las moléculas del mismo y por lo tanto aumentará el número de choques totales. Con ello se propicia la obtención del valor mínimo de energía necesario para que la reacción se lleve a cabo. Esta energía se denomina energía de activación.

Desde el punto de vista cuantitativo la velocidad, k , varía con la temperatura en la forma descrita por la ecuación de Arrhenius.

Una derivación de la ecuación de Arrhenius proporciona una relación lineal entre el logaritmo neperiano de la velocidad de la reacción, y la temperatura.

$$\ln(k) = \ln(A) - E_a / RT$$

donde $\ln(k)$ y T son las variables.

Con esta expresión se puede predecir la estabilidad a temperaturas inferiores o superiores a las estudiadas, mediante la respectiva extrapolación en la pendiente de la recta resultante (Kirkwood, 1977).

La extrapolación de los datos que se obtienen a altas temperaturas (p. ej., $> 25^\circ\text{C}$) casi siempre está limitada a un rango de temperatura en que la cinética de desestabilización es la misma. De manera muy común, los resultados de estabilidad a altas temperaturas (p. ej., $> 25^\circ\text{C}$) no reflejan o predicen lo que ocurre en condiciones reales de almacenamiento (p. ej., 4°C). Esto se debe a la enorme cantidad de vías de modificación que afectan las proteínas.

Un ejemplo de esto lo tenemos en la IL-1b y la hGH. Para estas proteínas se ha determinado que los mecanismos de degradación dependen de la temperatura (Gu y col., 1991; Pikal y col., 1991).

La relación no lineal de Arrhenius se observó también para la relaxina cuando su estabilidad se estudió entre 5 y 30°C (Nguyen y Shire, 1996).

La ausencia de linealidad puede sugerir al menos dos rutas de modificación importantes en estas proteínas. Sin embargo, la predicción de la estabilidad de las proteínas sobre la base de los estudios de estabilidad acelerada puede resultar satisfactoria si los procesos de modificación se describen por separado, o las etapas de estas modificaciones no cambian con la temperatura (Yoshioka y col., 1994).

A pesar de que la ecuación de Arrhenius no se ha podido aplicar a muchas proteínas para predecir su estabilidad, existen reportes que indican que otras variantes como la ecuación de Eyring, pueden resultar funcionales en algunos casos (Kirkwood, 1977).

Eyring desarrolló la ecuación de Arrhenius poniéndola sobre una base teórica más rigurosa. De esta manera obtuvo la siguiente ecuación:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{(\Delta S/R - \Delta H/RT)}$$

donde k es la velocidad de reacción, k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck, ΔS es la entropía, ΔH es la entalpía, R es la constante de los gases y T es la temperatura en grados Kelvin (Kirkwood, 1977).

Yoshioka y colaboradores estudiaron en el año 1994 la cinética de desnaturalización y agregación de la enzima β galactosidasa del microorganismo *Aspergillus oryzae*, con el objetivo de determinar si la estabilidad de algunas proteínas podía predecirse. La desnaturalización de la enzima se evaluó mediante la determinación de su actividad enzimática y demostró una cinética de primer orden. Por otra parte, la agregación de las formas desnaturalizadas se evaluó por SE-HPLC y mostró una cinética de reacción superior al primer orden. De manera general este estudio sugirió que la desnaturalización de las proteínas podía analizarse mediante la ecuación de Eyring de la misma forma que un producto químico simple (Yoshioka y col., 1994).

Por otra parte, Roberts y colaboradores estudiaron en el año 2003 la agregación del G-CSF bovino en función de la temperatura, el pH y la concentración de esta proteína, tomando como base una modificación de la ecuación de Eyring. Sus resultados demostraron que la cinética de agregación de las proteínas puede predecirse cuantitativamente a partir de los datos de estabilidad acelerada (Roberts y col., 2003).

A pesar de la utilidad de los estudios de estabilidad acelerados, las agencias regulatorias generalmente exigen la demostración de la estabilidad de cualquier producto en condiciones reales de almacenamiento (condiciones de estante o de anaquel) (EMEA, 2002). En estas condiciones se deben evaluar la actividad biológica, las propiedades físico-químicas, las propiedades inmunoquímicas, la pureza y la concentración del ingrediente activo dentro de la formulación (ICH, 1999).

En la literatura existen numerosos reportes sobre la evaluación de la estabilidad de las proteínas en estas condiciones.

En el año 2001, Phillips y colaboradores reportaron los resultados del control de la calidad de lotes representativos de la producción de un anticuerpo monoclonal que se utiliza para abortar las células T en los casos de transplante de células madres. Estos resultados demostraron que el

anticuerpo era estable al menos 6 años a -70°C. Sin embargo, los autores discuten que aunque los principios de manufactura permanecen iguales, el nivel de documentación, validación y control de la calidad se ha incrementado considerablemente en los últimos 20 años lo que incrementa enormemente las exigencias en los estudios de estabilidad en condiciones reales (Phillips y col., 2001).

Vorauer-Uhl y colaboradores estudiaron en el año 2002 la estabilidad prolongada de suspensiones liposomales de la enzima superóxido dismutasa, en condiciones de anaquel. Estos estudios se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la ICH. De esta manera analizaron las alteraciones en el tamaño de las vesículas y la liberación y la actividad biológica de la enzima. Durante este estudio no se detectó alteración en la morfología de los liposomas ni degradación de la proteína (Vorauer-Uhl y col., 2002).

En el año 2004, Golovanov y colaboradores demostraron que la adición de aminoácidos cargados como la arginina y el ácido glutámico a una concentración de 50 mmol/L a formulaciones con proteínas, incrementaba la concentración máxima de proteínas solubles que se podía alcanzar en estas preparaciones. Estos aminoácidos eran también efectivos en la inhibición de la agregación y la precipitación de las proteínas, protegían las proteínas de la degradación proteolítica e incrementaban la estabilidad real de las mismas. Estos autores concluyeron que ambos aminoácidos eran particularmente apropiados cuando en la formulación se requerían altas concentraciones del ingrediente activo y estabilidad prolongada (Golovanov y col., 2004).

En el mismo año, López y colaboradores evaluaron la estabilidad prolongada de una formulación liofilizada de estreptoquinasa. Las principales propiedades de esta proteína que se evaluaron en este trabajo fueron la actividad biológica, la pureza, la inmunoidentificación, la seguridad general, la presencia de pirógenos, la esterilidad así como otros parámetros físico-químicos como el pH, la humedad residual y las características organolépticas. Además, demostraron la homogeneidad de contenido de esta formulación comparando estadísticamente los resultados que se obtuvieron a partir de su evaluación. Los resultados demostraron una estabilidad real de 30 meses a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ y su comparación con otras preparaciones liofilizadas mostró resultados organolépticamente superiores (López y col., 2004).

Especificaciones de calidad de los productos terminados

El establecimiento de las especificaciones de calidad de un producto determinado es una de las etapas más importantes de su desarrollo pues determina la calidad final que se le va a exigir, y por consiguiente, la seguridad del mismo.

Según la Organización Mundial de la Salud los principales parámetros que se deben evaluar en un producto terminado son la esterilidad, la identidad, la potencia (actividad biológica), la

inocuidad, la presencia de pirógenos, los preservos, los excipientes, la humedad, el pH y las características organolépticas (WHO, 1988, 1992).

La Agencia Europea para la Evaluación de los Medicamentos y la Conferencia Internacional de Armonización coinciden con estos parámetros, aunque incluyen además la determinación de la pureza del ingrediente activo (ICH, 1999; EMEA, 2002).

Las especificaciones de varios productos recombinantes están descritas en las diferentes farmacopeas. Por ejemplo, las especificaciones de la Epo se pueden encontrar en la Farmacopea Europea (European Pharmacopoeia, 2002). Sin embargo, en la mayoría de los casos las Farmacopeas indican que las especificaciones deben ser aprobadas por las agencias nacionales competentes (British Pharmacopoeia, 1998). En todo caso, las especificaciones de calidad de un producto deben ser muy rigurosas teniendo en cuenta que deben garantizar la seguridad del producto que se aplicará finalmente al paciente (WHO, 1988, 1992; British Pharmacopoeia, 1998; ICH, 1999; EMEA, 2002).

Interferón α 2b

Los IFNs son glicoproteínas, producidas por diferentes tejidos en respuesta a un agente inductor (Finter, 1973). Según sus propiedades se dividen en tres grupos: IFN α leucocitario y linfoblastoide, IFN β fibroblastoide e IFN gamma inmune (Cantell, 1984) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Tipos y subtipos de IFNs que se han comercializado hasta la fecha (Sasson, 1998).

Tipo	Subtipo (nomenclatura)	Fuente	Pureza (%)
α	Leucocitario (IFN- α [LE])	Leucocitos de sangre normal	< 1
	Linfoblastoide (IFN- α -N1)	Células linfoblastoides en cultivo	< 1
	Recombinante α 2a (IFN α 2a)	Transformado en <i>Escherichia coli</i> .	≥ 95
	Recombinante α 2b (IFN α 2b)	Transformado en <i>Escherichia coli</i> .	≥ 95
	Recombinante α 2arg (IFN α 2c)	Transformado en <i>Escherichia coli</i> .	≥ 95
β	Fibroblastoide	Fibroblastos de prepucio fetal, en cultivo	< 1
	Recombinante β Cys (rIFN- β Cys)	Transformado en <i>Escherichia coli</i> .	≥ 95
	Recombinante β Ser (rIFN- β ser)	Transformado en <i>Escherichia coli</i> .	≥ 95
γ	Inmune (IFN- γ)	Linfocitos T de la sangre normal	< 1
	Recombinante γ (rIFN- γ)	Transformado en <i>Escherichia coli</i> .	≥ 95

El papel biológico de estas moléculas se basa, en lo fundamental, en la actividad antiviral y antiproliferativa de los IFNs α y β así como en el efecto inmunomodulador del IFN γ (Stewart, 1980). El PM de estas biomoléculas oscila entre 16000 y 27600 Da, aunque cada uno de ellos está formado por 165 ó 166 aminoácidos. Esta diferencia de PM está determinada por los diversos patrones de glicosilación u otras modificaciones post-transduccionales que

presentan (Labdon y col., 1984). Los IFNs α tienen fundamentalmente función antiviral y antiproliferativa, que difieren de acuerdo al subtipo (Stewart, 1980; Zoon y col., 1986).

Mecanismos de acción y efectos biológicos de los IFNs

Los eventos que median entre la unión de cada uno de los IFNs a su receptor y la activación de los genes que caracterizan cada una de las respuestas, se han dilucidado en los últimos años. La señal desde la membrana citoplasmática al núcleo se transmite a través de proteínas citosólicas que al fosforilarse se asocian y se convierten en factores de transcripción que activan determinados conjuntos de genes, capaces de responder a los distintos tipos de IFNs (Darnell y col., 1995).

La actividad antiviral se debe a la inducción de genes, entre los que se encuentra el que codifica para la enzima 2'-5'oligoadenilato sintetasa, que cataliza la formación de oligómeros de adenilato capaces de activar una endorribonucleasa que escinde el ARN mensajero (Pestka y col., 1987). Otro de los genes que se inducen es el que codifica para la proteína quinasa P68 que se autofosforila en presencia de ARN de doble cadena y fosforila el factor de iniciación de la transcripción en eucariontes *eIF-2 α* . Esto provoca la inhibición de la síntesis de proteínas (Pestka y col., 1987).

En cuanto a su actividad antiproliferativa, no está aún bien dilucidado el mecanismo por el cual los IFNs ejecutan esta acción. No obstante, se conoce que inhiben la producción de elementos necesarios para el proceso de división celular y de algunos aminoácidos esenciales para la subsistencia de las células (Yoshida y col., 1981; Sekar y col., 1983). Además, modulan la expresión de proto-oncogenes a nivel celular (Einat y col., 1985).

Debido a estas propiedades, los IFNs han tenido un gran uso en la terapéutica, por lo que constituyen uno de los principales materiales biotecnológicos que se producen en el ámbito mundial (Borden y col., 1997).

Aplicaciones terapéuticas de los IFNs

Los IFNs α , tanto naturales como recombinantes, han demostrado ser eficaces en el tratamiento de enfermedades virales, oncológicas y hematológicas, sin que existan diferencias muy notables entre ellos. Particularmente se ha comprobado su efectividad en el tratamiento de enfermedades virales como las Hepatitis C y B (Buti y Esteban, 2005).

Debido a la eficacia de los IFNs en el tratamiento de enfermedades virales, tumorales e inmunológicas se ha estimulado su empleo en el tratamiento de pacientes con SIDA. Hasta la actualidad, los ensayos clínicos han demostrado la efectividad de estas moléculas en la

terapia de las llamadas infecciones oportunistas, como el Sarcoma de Kaposi, más que en la propia infección (Rivero y col., 1990).

Los IFNs α pueden además ofrecer ventajas en cuanto a terapias menos tóxicas y más específicas, que los medicamentos quimioterapéuticos tradicionales. Por ello se han empleado en el tratamiento de las leucemias crónicas (Franceschini y col., 2004).

También se ha investigado su uso como agentes citostáticos con relativo éxito en la aplicación del IFN α leucocitario en el tratamiento de la neoplasia de pulmón (Selman y col., 1989), cáncer de recto y tracto anal (Villasana y Selman, 1989), cáncer de esófago (Suárez y col., 1989) y otros, fundamentalmente como terapia colateral a otros tratamientos como los quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos, combinaciones que muestran actualmente los mejores resultados.

Aunque los IFNs (especialmente los del tipo α) están prescritos principalmente para patologías virales y neoplásicas, su acción inmunomoduladora y el origen desconocido de muchas enfermedades donde los virus o, al menos, el sistema inmune está involucrado, ha facilitado su uso en otras condiciones patológicas. El más interesante de estos, debido a los resultados que se han obtenido y su originalidad, es su aplicación en casos de esquizofrenia. Estos estudios se han basado en la hipótesis del origen viral de esta enfermedad (López-Saura, 1992).

Obtención de los IFNs α en Cuba

En nuestro país, existían dos producciones definidas de IFN α : la del IFN leucocitario a partir de donaciones de sangre, y la del IFN α 2b hum-rec, a partir de cultivos de bacterias transformadas con la información genética que codifica para dicha proteína. Sin embargo, desde hace algunos años se abandonó la primera de estas producciones por su alto costo e irrentabilidad (Comunicación personal, Fernando Porrero, CIGB, 21 de Julio del 2000).

El IFN leucocitario que se obtenía a partir de donaciones de sangre, enfrentaba desventajas como la disponibilidad limitada de materia prima, la necesidad de utilizar la sangre antes de las 48 h de extraída, y como todo hemoderivado, los rigurosos requisitos durante la producción y comercialización (Cantell y col., 1991). Los inconvenientes que implicaba la producción de este tipo de IFN fueron superados con el empleo de las técnicas del ADN recombinante, que garantizan la producción de grandes cantidades de proteína a un menor costo, sin necesidad de sangre. Además se obtienen con una alta pureza (más del 95 %) y presentan similar potencia, comportamiento farmacocinético y efectos secundarios que los que los IFNs derivados de leucocitos (López-Saura, 1992).

Desarrollo de formulaciones de IFN α 2b hum-rec

Para el desarrollo adecuado de una formulación estable se deben estudiar las características físico-químicas y biológicas de la proteína.

En el año 2001, Beldarrain y colaboradores publicaron un estudio sobre las propiedades conformacionales del IFN α 2b hum-rec producido en el CIGB. En el mismo se determinó la actividad específica de la molécula (mayor de 10^8 UI/mg de proteína) y su estabilidad conformacional en función del pH y la temperatura, empleando la calorimetría diferencial de barrido y el dicroísmo circular. En este trabajo se encontró que el pH 7 y las altas fuerzas iónicas constituían las condiciones más favorables para la estabilidad de la molécula (Beldarraín y col., 2001).

Sobre este tipo de conocimientos se ha basado el desarrollo de formulaciones estables con IFN α 2b hum-rec como ingrediente activo.

En 1976, se encontró que esta citoquina puede ser estabilizada con una combinación de tres reactivos: a) un agente para romper los enlaces no covalentes, como la urea o el cloruro de guanidinio, b) un agente reductor de enlaces disulfuros como β mercaptoetanol, y c) un agente superficialmente activo, como el SDS o la dodecilamina de sodio. Después del tratamiento con los tres reactivos, los IFNs humanos y de ratón se mantuvieron completamente estables frente al calentamiento a 56°C y 100°C (Stewart y col., 1976). A pesar de la propiedad estabilizadora del SDS contra la inactivación térmica del IFN, este compuesto se enlaza fuertemente a las proteínas y resulta casi imposible eliminarlo, lo cual disminuye su utilidad clínica.

En 1981, Grossberg y Sedmak propusieron un nuevo método para aumentar la estabilidad del IFN mediante el uso de sales de calcio y lantánidos. Con este sistema se logró la estabilidad térmica del IFN a 37, 50 y 56°C, durante 4 días, así como la estabilidad mecánica por agitación a 4°C durante 30 seg. Este método además incrementó la actividad biológica de los IFNs (Grossberg y Sedmak, 1981). Para asegurar la reproducibilidad de los efectos terapéuticos deseados, es necesario emplear el IFN α con alta actividad específica. Sin embargo, las soluciones de IFN α con alta actividad específica manifestaron inestabilidad biológica, lo que impidió proporcionar formulaciones biológicamente estables para el uso clínico. Debido a esto se propuso que el IFN α se envasara en forma liofilizada para reconstituir con agua para inyección en el momento de su uso (Grossberg y Sedmak, 1981).

En 1985, se obtuvo una formulación liofilizada de IFN α , la cual retenía la actividad biológica de esta citoquina durante el almacenamiento. Esta formulación podía emplearse en la preparación de ungüentos y soluciones inyectables, oftálmicas o nasales. Tal formulación contenía ASH como estabilizante. Sin embargo, aún utilizando este aditivo, los IFNs con alta actividad específica tenían una actividad biológica limitada (Kwan, 1985). Se encontró que la adición de glicina o alanina a las soluciones de IFN α mejoraba el mantenimiento de la actividad biológica del principio activo (Kwan, 1985). El uso de la glicina o la alanina mejoraba además, la velocidad de reconstitución de la formulación liofilizada, y permitía liofilizar a mayores temperaturas. Con esta nueva formulación, el IFN α retuvo completamente su actividad biológica después del almacenamiento a 20 °C, durante seis meses.

Sin embargo, el uso de la ASH como estabilizador implica riesgos potenciales como la transmisión de virus u otros patógenos provenientes de la sangre. Además, incrementa la probabilidad de formación de agregados ASH-fármaco que pueden aumentar la inmunogenicidad del principio activo, con la consiguiente generación de anticuerpos que disminuyen su efecto terapéutico (Gross y col., 1998). En consecuencia es aconsejable sustituir la ASH por otras sustancias auxiliares, como los detergentes no iónicos, para mantener la estabilidad del IFN en estas formulaciones. Por ello se hizo necesario reformular esta citoquina con el objetivo de obtener una formulación libre de hemoderivados que mantuviera la actividad biológica, química y física de la proteína.

En 1998 y 1999, la compañía Schering Plough patentó una formulación de IFN α 2b hum-rec estable en solución, la cual preservaba la estabilidad del ingrediente activo y se encontraba libre de ASH. Esta formulación contenía IFN α 2b hum-rec, un sistema tampón que mantenía el pH en el rango de 4,5-7,1, un agente quelante (EDTA), un surfactante (polisorbato 80) para estabilizar el IFN α contra la pérdida de actividad, un agente isotonzante (NaCl), un agente preservante antimicrobiano (m-cresol, fenol, parabenos o mezclas de estos) para mantener la esterilidad del producto, y agua para inyección. En ella, el IFN α 2b mantenía del 85 al 100 % de su integridad química, del 75 al 100 % de su actividad biológica y permanecía sin precipitados o partículas visibles durante el almacenamiento de 2 a 8 °C, por 24 meses (Yuen y Kline, 1998; 1999). En particular, las formulaciones que ha patentado esta compañía presentan una estabilidad reportada de 24 meses cuando se almacenan a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Sin embargo, cuando se almacenan a una temperatura mayor (25 ó 30°C) el contenido de

IFN α 2b hum-rec, determinado según la técnica de RP-HPLC, disminuye hasta menos del 90% antes de los tres meses de almacenamiento (Yuen y Kline, 1999). Ello demuestra lo complicado que puede resultar la estabilización en solución de moléculas tan frágiles como el IFN α 2b hum-rec (Wang, 1999 y 2000).

Recientemente la compañía Schering Plough patentó el IFN α 2b hum-rec unido covalentemente al PEG de 12 000 Da. Esta nueva forma incrementa el tiempo de circulación sistémica, la resistencia a la proteólisis y la estabilidad térmica, al tiempo que disminuye la inmunogenicidad del ingrediente activo. Por ello la frecuencia de inyección disminuye sustancialmente (Menkes, 2005).

Actualmente las ventas del IFN α 2b hum-rec unido covalentemente al PEG de 12 000 Da están aumentando a gran velocidad y se prevee que rápidamente desplacen las ventas de las formulaciones que contienen el IFN α 2b hum-rec convencional (Biobusiness: http://www.i-s-b.org/business/recombinant_f.htm).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos biológicos

El IFN α 2b hum-rec se obtuvo en el CIGB (Ciudad de La Habana, Cuba), con las especificaciones de calidad que se describen en el Anexo I.

Reactivos químicos

Los reactivos químicos que se utilizaron se resumen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Reactivos químicos utilizados en los diferentes estudios.

Reactivos	Casa Comercial
Acetonitrilo	Caledon, Georgetown, Ont., Canada
Ácido acético	Merck, Darmstadt, Alemania
Ácido cítrico	Merck, Darmstadt, Alemania
Ácido trifluoroacético	PIERCE, Rockford, Illinois, EUA
Alcohol bencílico	Merck, Darmstadt, Alemania
Azul brillante de Comassie G 250	Merck, Darmstadt, Alemania
Benzaldehído	Merck, Darmstadt, Alemania
Citrato de sodio monohidratado	Merck, Darmstadt, Alemania
Cloruro de sodio	Merck, Darmstadt, Alemania
DTT	Sigma, St Louis, Mo, EUA
EDTA Na ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt, Alemania
Fosfato de sodio dibásico anhidro	Merck, Darmstadt, Alemania
Fosfato de sodio monobásico di-hidratado	Merck, Darmstadt, Alemania
GSH	Sigma, St Louis, Mo, EUA
Metanol	Merck, Darmstadt, Alemania
Metil parabeno	Merck, Darmstadt, Alemania
PEG 400	Merck, Darmstadt, Alemania
Peróxido de hidrógeno	Merck, Darmstadt, Alemania
Polisorbato 20	Merck, Darmstadt, Alemania
Polisorbato 80	Merck, Darmstadt, Alemania
Propil parabeno	Merck, Darmstadt, Alemania
SDS	Merck, Darmstadt, Alemania
Sulfato de cobre pentahidratado	Merck, Darmstadt, Alemania
Sulfato de zinc	Merck, Darmstadt, Alemania

Otros reactivos específicos se describen en los acápites relacionados con las técnicas analíticas que requirieron de su uso.

Otros materiales

Otros materiales que se utilizaron se resumen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Materiales empleados en los diferentes estudios.

Material
Casa comercial
Filtros minisart de un tamaño promedio de poro de 0,2 μm Sartorius, Goettingen, Alemania. Bulbos 2R de borosilicato, de calidad hidrolítica clase INuova OMPI, Piombino Dese, Italia. Tapones de clorobutilo Helvoet Pharma, Alken, Bélgica. Casquillos de aluminio Helvoet Pharma, Alken, Bélgica. Columna, con cadena carbonada octil (C8), de tamaño de poro de 5 μm y dimensiones de 250 x 4,6 mm Vydac, Hesperia, EUA. Columna, con cadena carbonada octadecil (C18), de tamaño de poro de 5 μm y dimensiones de 250 x 4,6 mm Vydac, Hesperia, EUA.

Métodos

En este trabajo se siguió la metodología experimental general que se describe a continuación:



Figura
formul:

Cada uno de los pasos de esta metodología general se describe más adelante en este capítulo.

En los diferentes estudios de este trabajo se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

1) En los estudios de estabilidad en condiciones de estrés, se compararon cuantitativamente las diferencias en cuanto a la estabilidad de las diferentes variantes, ajustando la inactivación térmica de la citoquina a una cinética de primer orden, según la siguiente ecuación:

$$\ln [A] = -kt + \ln [A]_0$$

Donde:

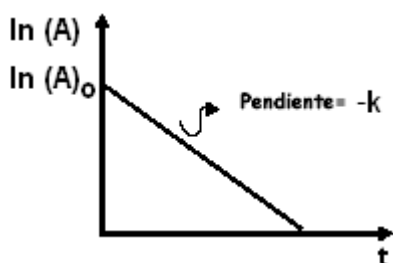
$\ln A$ es el logaritmo neperiano de la variable dependiente que puede ser la pureza, la actividad biológica o el área la señal de interés;

$\ln A_0$ es el logaritmo neperiano del intercepto de la recta (logaritmo neperiano del valor inicial de la variable dependiente que puede ser la pureza, la actividad biológica o el área bajo la señal de interés);

k es la constante de velocidad de la reacción (velocidad de desestabilización en nuestro caso); y

t es el tiempo.

Esta ecuación describe el siguiente gráfico:



De esta manera, la constante de degradación cinética (k_{obs}) se calculó a partir de la relación lineal entre el logaritmo de los parámetros que se evaluaron (variables dependientes), y el tiempo.

2) En el estudio de adsorción a las paredes del bulbo de borosilicato, se escogió el tiempo de 24 h para evaluar la adsorción de la proteína a las paredes de vidrio teniendo en

cuenta que este fenómeno transcurre de manera muy rápida; por lo general, en cuestión de horas (Johnston, 1996; Tzannis y col., 1996; Roach y col., 2005).

3) Los tiempos relativamente cortos (p. ej. 30 ó 72 días) para evaluar la estabilidad de la citoquina en los estudios de preformulación se designaron teniendo en cuenta que la desestabilización de las proteínas que no son termófilas, como es el caso del IFN α 2b hum-rec, transcurre de manera muy rápida; por lo general, en cuestión de días, cuando se almacenan a temperaturas altas como $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (Allen y col., 1999; Bedu-Addo y col., 2002; Reyes y col., 2005).

4) En uno de los experimentos se utilizó la solución tampón de citrato de sodio teniendo en cuenta que varios autores han reportado que los citratos pueden incrementar la estabilidad de algunas proteínas (Chen y col., 1994; Chang y col., 1996; Bottomley y Tew, 2000; Keowmaneechai y McClements, 2002). De este modo se pretendió contraponer el posible efecto estabilizante de la solución citrato de sodio al posible efecto desestabilizante de los excipientes utilizados.

5) En la mayoría de los experimentos se utilizó el IFN α 2b hum-rec a una concentración de 3 ó 10 MUI/mL debido a que son esas las dosis más empleadas en la clínica y las de mayor distribución comercial.

6) Si bien no resulta común que el IFN α 2b hum-rec se use a 0,5 mg/ml en formulaciones inyectables, en algunos experimentos se decidió usar esta concentración para favorecer la ocurrencia de la agregación, y su análisis por SDS/PAGE.

7) En algunos experimentos se utilizaron condiciones poco favorables para la estabilidad del IFN α 2b hum-rec (p. ej., pH 6 y fuerza iónica de la solución tampón de 50 mmol/L) para incrementar las posibles modificaciones de la molécula.

Influencia del material de envase primario

Compatibilidad del IFN α 2b hum-rec con los bulbos de borosilicato

El IFN α 2b hum-rec se diluyó a 1, 3, 6, 12, 18 ó 24 millones de unidades internacionales por mililitro (MUI/mL) en la solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 7,4. La solución se dispensó a razón de 1 mL por vial en bulbos 2R de borosilicato y se almacenó a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 h. La compatibilidad se determinó mediante la determinación de la concentración del IFN α 2b hum-rec presente en la solución a las 24 h, en relación con el resultado que se obtuvo en el tiempo inicial, mediante un ensayo inmunoenzimático desarrollado por Santana y colaboradores, 1999a.

Compatibilidad del IFN α 2b hum-rec en solución con los tapones de clorobutilo

La influencia de los tapones de clorobutilo en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec se evaluó en función de la concentración del ingrediente activo y la presencia de excipientes individuales.

Para evaluar el efecto de los tapones de clorobutilo en función de la concentración del ingrediente activo, el IFN α 2b hum-rec se diluyó a 3 ó 10 MUI/mL en tampón fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 6. Las muestras se dispensaron a razón de 1 mL por vial en bulbos 2R, se almacenaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ con y sin contacto con los tapones de clorobutilo y se analizaron por RP-HPLC en el tiempo inicial y a los 3, 6, 9, 15, 21 y 30 días de almacenamiento.

Para evaluar la influencia de los excipientes en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec en contacto con los tapones de clorobutilo, se diluyó el ingrediente activo a 3 MUI/mL en solución tampón de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 6, tras lo cual se adicionó polisorbato 80 ó EDTA Na₂ x 2H₂O, a 5 mmol/L en ambos casos. Las muestras se dispensaron a razón de 1 mL por vial, se almacenaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ con y sin contacto con los tapones de clorobutilo y se analizaron en el tiempo inicial y después de 3, 6, 9, 15, 21 y 30 días por RP-HPLC.

Influencia de diferentes excipientes en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec

Efecto de diferentes excipientes en la agregación del IFN α 2b hum-rec

El IFN α 2b hum-rec se diluyó hasta 0,5 mg/mL en solución tampón de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 6, y luego se añadieron los siguientes excipientes a la solución: polisorbato 20, polisorbato 80, SDS y EDTA Na₂ x 2H₂O. Todos los excipientes se emplearon a una concentración final de 0,5 mg/mL. Las muestras se dispensaron en bulbos 2R a razón de 0,5 mL por vial, se colocaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras en el tiempo inicial y después de 3, 6, 9, 15, 21 y 30 días de almacenamiento. El IFN α 2b hum-rec a la misma concentración, en solución tampón de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 6, se usó como control.

En otro grupo de muestras, el IFN α 2b hum-rec se diluyó a 0,5 mg/mL en solución tampón de citrato de sodio 50 mmol/L, pH 6, y luego se añadieron los siguientes excipientes a la solución: sulfato de cobre penta-hidratado, sulfato de zinc, DTT y GSH. Los excipientes se usaron a una concentración de 0,01 mg/mL. Las muestras se dispensaron en bulbos 2R a razón de 0,5 mL por vial, se almacenaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras en el tiempo inicial y después de 3, 6, 9, 15, 21 y 30 días de almacenamiento. Como control se utilizó el IFN α 2b hum-rec a la misma concentración, en solución tampón de citrato de sodio 50 mmol/L, pH 6.

Efecto de diferentes excipientes en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec

El IFN α 2b hum-rec se diluyó a 3 MUI/mL en solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 7,4 y luego se adicionaron los siguientes excipientes a la solución: polisorbato 80 (0,1; 0,2 ó 0,5 mg/mL), EDTA Na₂ x 2H₂O (0,5; 1 ó 5 mg/mL), PEG 400 (5, 10 ó 20 mg/mL), alcohol bencílico (5, 10 ó 20 mg/mL), benzaldehído (0,01; 0,1 ó 0,5 mg/mL), H₂O₂ (0,01; 0,1 ó 0,5 mmol/mL) y la mezcla de metil/propil parabenos (0,06/0,003 mg/mL, 0,12/0,012 mg/mL, 0,2/0,02 mg/mL, respectivamente). Las soluciones de IFN α 2b hum-rec que se prepararon con alcohol bencílico altamente puro se burbujearon con nitrógeno gaseoso. Todas las muestras se dispensaron en bulbos de borosilicato a razón de 1 mL por vial, y se almacenaron a 37 ± 2°C. El contenido se analizó en el tiempo inicial y después de 3, 6, 9, 15, 21 y 30 días, por RP-HPLC. Las muestras con alcohol bencílico y la mezcla de metil y propil parabenos se analizaron además por el método de determinación de la efectividad del preservo.

Influencia de la concentración de proteínas en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec en solución

El IFN α 2b hum-rec se diluyó a 1, 10, 50 y 100 MUI/mL en la solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 7,4. Cada solución se dispensó en bulbos 2R de borosilicato a razón de 1 mL por vial. Los viales se almacenaron a 37 ± 2°C y su contenido se analizó por RP-HPLC, SDS-PAGE en condiciones reductoras y determinación de actividad biológica por titulación antiviral en el tiempo inicial y después de 3, 6, 9, 15, 21, 35, 48 y 72 días de estudio.

Estudios de estabilidad

Con los resultados que se obtuvieron a partir de los estudios de preformulación se diseñaron dos formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Composición de las formulaciones evaluadas en estudios de estabilidad.

Componentes	A	B
IFN α 2b hum-rec (MUI/mL)	10	10
Alcohol bencílico (mg/mL)	10	-
Polisorbato 80 (mg/mL)	0,2	0,1
Fosfato de sodio monobásico di-hidratado (mg/mL)	3,43	3,43
Fosfato de sodio dibásico anhidro (mg/mL)	12,68	12,68
Cloruro de sodio (mg/mL)	4,89	4,89
Metil parabeno (mg/mL)	-	1,2
Propil parabeno (mg/mL)	-	0,12
EDTA Na ₂ x 2H ₂ O (mg/mL)	-	1

La estabilidad de estas formulaciones se evaluó, según se describe a continuación.

Evaluación de la estabilidad de las nuevas formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec

Para evaluar la estabilidad en condiciones reales y aceleradas de almacenamiento se fabricaron tres lotes independientes y consecutivos de las formulaciones candidatas. Los viales se almacenaron a 5 ± 3 y $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y se analizaron por titulación antiviral, RP-HPLC, ELISA, y determinación de la esterilidad, el contenido de pirógenos, la inocuidad, las características organolépticas, el volumen, el pH y el contenido de polisorbato 80 y alcohol bencílico en el tiempo inicial y después de 3, 6, 9, 12, 18, 24 y 30 meses de estudio en el caso de la estabilidad real. Para estudiar la estabilidad acelerada la formulación se evaluó en el tiempo cero y luego de 1, 2, 3 y 6 meses de almacenamiento.

Establecimiento de las especificaciones de Calidad del producto terminado e introducción en el sistema productivo

Las especificaciones de calidad para el producto terminado se establecieron de acuerdo a los requerimientos de OMS, EMEA e ICH para productos de este tipo (WHO 1988, 1992; ICH, 1999; EMEA, 2002). En general se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: características organolépticas, pirógenos, seguridad general o inocuidad, actividad biológica, inmunoidentificación, pureza, esterilidad, pH, volumen, determinación de preservos y contenido de polisorbato 80 y alcohol bencílico.

Los primeros cinco lotes del producto terminado a escala industrial (tamaño del lote de 30 000 viales cada uno) se consideraron introductorios en el sistema productivo del BIOCEN. Estos lotes se fabricaron según el siguiente procedimiento:

1. Preparación de la solución tampón (15 L)

Se mezclan 1425 mL de una solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mol/L, 6075 mL de una solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mol/L y 390 mL de una solución de NaCl 3 mol/L. Todas las soluciones se preparan en agua para inyección. Se añade agua para inyección hasta completar un volumen de 14 L y se determina el pH que debe estar entre 7,0 y 7,6. Luego se enrasa a 15 L con el mismo tipo de agua. La solución se filtra mediante un sistema de filtración al vacío y membranas de 0,2 μm de tamaño de poro. Por último se esteriliza a 1 ATM y 121°C durante 20 minutos.

2. Preparación de la formulación (10,5 L)

Se disuelven 105 mL de alcohol bencílico en 8 L de solución tampón con agitación y burbujeo de nitrógeno constantes (la agitación y el burbujeo de nitrógeno se mantienen constantes hasta el final del proceso de formulación). Luego se añaden 21 mL de polisorbato

80 al 10 %, se añaden los $90\,000 \times 10^6$ UI más $15\,000 \times 10^6$ UI de exceso por pérdidas en el proceso de filtración y llenado, y por último se añade la solución tampón para enrasar a 10,5 L. El proceso se debe realizar a bajas temperaturas ($< 15^\circ\text{C}$).

La nitrogenación para el paso de formulación se realiza de la siguiente forma:

- Se toma un balón con nitrógeno gaseoso que disponga de un dispositivo regulador y de un manómetro. A la salida del regulador se le acopla una manguera de silicona previamente despirogenizada durante 2 horas con una solución de NaOH 0,2 mol/L, lavada con abundante agua corriente y destilada, y esterilizada a 121°C durante 20 minutos.
- Al extremo libre de la manguera se le acopla un filtro estéril para aire de tamaño de poro $0,2\ \mu\text{m}$. Al otro extremo del filtro se le acopla otra manguera de silicona preparada como en el paso anterior.
- El extremo libre de la segunda manguera se introduce en el frasco que contiene la solución. La llave del regulador se abre hasta alcanzar 100 KPa y se mantiene el flujo de nitrógeno durante toda la etapa de formulación. Si el flujo de nitrógeno provoca espuma se debe reducir la presión.

3. Filtración de la formulación

Los materiales que se usan para el proceso de filtración (tanques, mangueras y filtros) se despirogenizan con NaOH 0,2 mol/L durante 2 h. Se enjuagan con abundante agua, y las mangueras y los tanques se colocan a 180°C durante 6 horas, mientras que los filtros se esterilizan a 121°C durante 20 minutos.

La filtración se realiza por presión utilizando para ello nitrógeno gaseoso en lugar de aire.

4. Llenado de la formulación

Durante el proceso de llenado se dispensan 0,35 mL de la formulación en cada vial. La formulación se hace burbujear con nitrógeno durante todo el proceso de llenado. El bulbo se nitrogena durante este proceso. El llenado, taponado y sellado de los bulbos se realiza en una máquina llenadora automática de la firma Bausch Ströbel (Alemania), de capacidad de llenado de 4600 bulbos/h, con flujo laminar de techo en un área clase 100. El lote se chequea por las diferentes técnicas analíticas establecidas en las especificaciones de calidad, para implementar su liberación.

A las muestras se le ponen etiquetas que indican el lote de formulación, y se colocan a 4°C .

Los lotes introductorios se liberaron de acuerdo a las especificaciones de calidad establecidas.

Análisis económico

Análisis económico

El análisis económico se basó en la determinación del valor actual neto (VAN), la tasa interna de rendimiento (TIR) y el plazo de recuperación (PBP) para la nueva variante de formulación de IFN alfa 2b. Para el análisis se tuvieron en cuenta los siguientes factores: inversión, costos, ventas, ganancias, interés, tasa impositiva, depreciación.

Análisis de sensibilidad

Los estimados de rentabilidad del proyecto se basaron fundamentalmente en el análisis del valor actual neto en un horizonte de planificación (10 años), la tasa interna de rendimiento del mismo, así como el plazo de recuperación. En este tipo de análisis se tuvo un componente alto de subjetividad, pues se estimaron los ingresos por las ventas, los costos, la inversión y el interés. Además se tuvo en cuenta la combinación de todos estos factores.

El VAN, el TIR y el PBP se determinaron básicamente en los casos que: disminuyeran las ventas en un 50 %, disminuyera el precio en un 50 %, aumentaran los costos en un 50 %, aumentara el interés en un 50 %, aumentara la inversión en un 50 % y la combinación de las cinco variantes

Comparación de las nuevas formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec con productos comerciales

Las nuevas formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec se compararon con otra formulación comercial: INTRON A, de Schering Plough, Kenilworth, N.J. EUA.

Las muestras, con 18 meses de almacenamiento a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, se analizaron por determinación de las actividades antiproliferativa y antiviral, ELISA y RP-HPLC.

Métodos analíticos

Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

El análisis por RP-HPLC se realizó en una columna Vydac, con cadena carbonada octil (C8), de tamaño de poro de $5 \mu\text{m}$ y dimensiones de $250 \times 4,6 \text{ mm}$. Los solventes que se emplearon fueron [A: TFA al 0,1 % en agua de calidad bi-destilada y B: TFA al 0.05 % en acetonitrilo]. La velocidad de flujo fue de $0,8 \text{ mL/min}$. La detección se realizó a 226 nm con un procesador automático de datos. Para la adquisición de los datos y su análisis se empleó el programa Unicorn, versión 4.12 (Amersham Biosciences AB, Upsala, Suecia). El gradiente que se empleó fue del 15 al 60 % de la solución B, en 40 min.

Mediante esta técnica analítica se determinó el área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificaciones y la pureza de esta señal. Estos dos parámetros ofrecieron una

idea real acerca del contenido de IFN α 2b hum-rec sin modificaciones, y de su pureza, respectivamente. Las áreas se determinaron en todos los casos mediante el método valle-valle.

En todos los casos las determinaciones se normalizaron en función del contenido de IFN α 2b hum-rec. De esta manera, el contenido de IFN α 2b hum-rec que se analizó en cada tiempo fue el mismo (de acuerdo al contenido en el tiempo inicial y al volumen de muestra aplicado) y la intensidad de las señales variaron en dependencia de la influencia del excipiente o la condición utilizados.

Con el objetivo de comparar los cromatogramas obtenidos en este trabajo con lo establecido en las diferentes farmacopeas (análisis del IFN alfa 2b mediante una columna de cadena hidrocarbonada octadecil (C18)), la citoquina en solución se analizó también mediante este tipo de columna. En análisis se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente.

Determinación de polisorbato 80

Este método se basó en la capacidad que tiene el polisorbato 80 de formar un complejo coloreado con el tiocianato de cobalto, obteniéndose una coloración que va de azul claro a intenso, en dependencia de la concentración de polisorbato 80 que tenga la muestra (USP 26, 2003).

Determinación de alcohol bencílico

La concentración de alcohol bencílico en la forma terminada de rhIFN- α 2b hum-rec se evaluó con la ayuda de un cromatógrafo de gases Pye Unicam PU 4550 (Cambridge, Reino Unido) acoplado a un integrador Shimadzu CR 3A Chromatopac (Kyoto, Japón). La temperatura de trabajo fue de 230°C para la columna y 250°C para el inyector y el detector de ionización de llama. El ensayo se realizó con una columna Porapak Q capillary (1,5 m x 4 mm) (VWR Chromatography, Reino Unido). La concentración de alcohol bencílico en las muestras se determinó comparando la señal obtenida con las señales que se obtuvieron de una curva de calibración de este preservio (2,5; 5; 7,5 y 10 mg/mL) en la solución de formulación.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

Este método se realizó como describió Laemmli (Laemmli, 1970). La corrida se realizó en un gel de poliacrilamida al 12,5 % en presencia de SDS al 0,1 %, con una intensidad de corriente de 3 mA/cm. Para ello se utilizó una solución de corrida compuesta por tris-(hidroximetil) aminometano 0,025 mol/L, glicina 0,192 mol/L, SDS al 0,1%. En cada carrilera se aplicaron 20 μ g de muestra. Las muestras en condiciones reductoras se trataron con el tampón de tratamiento 2X (tris-(hidroximetil) aminometano 0,025mol/L, SDS al 4 %, glicerol

al 20 %, β -mercaptoetanol al 10 % bromofenol azul 0,01 %). Las muestras en condiciones no reductoras se trataron con el mismo tampón sin β -mercaptoetanol. La tinción se realizó con azul brillante de Coomassie G-250, durante 2 h. La destinción se llevó a cabo con una mezcla de metanol al 10 % y ácido acético al 10 %, en agua destilada, mediante cambios sucesivos de la mezcla hasta que el fondo del gel perdió el color azul y quedaron definidas las bandas de proteínas.

Los geles se escanearon y se analizaron densitométricamente mediante el programa Molecular Analyst (Bio-rad, Hercules, CA, EUA).

Determinación de pirógenos

Esta determinación se realizó según los requerimientos de la USP 26/2003. Este ensayo comprendió la medición del aumento de la temperatura en conejos después de la inyección intravenosa de 150 000 UI de la muestra en análisis por Kg de peso del animal. Esta dosis se corresponde con tres veces la dosis terapéutica equivalente en humanos, tomando como referencia un paciente con 70 Kg de masa corporal como promedio. Se consideró que la muestra no contenía pirógenos si ningún conejo incrementaba su temperatura corporal en 0,5°C o más, o si la sumatoria de los incrementos en la temperatura corporal de los ocho conejos evaluados no excedía los 3,3°C (USP 26/2003).

Determinación de la Inocuidad

Este ensayo se realizó según los requerimientos de la Farmacopea Británica (British Pharmacopoeia, 1998) y comprendió la determinación de reacciones tóxicas y pérdidas de peso en ratones y curieles después de la inyección intravenosa de 600 000 UI de la muestra en análisis, por animal. Esta dosis corresponde a 140 veces la dosis terapéutica tomando como referencia un paciente con 70 Kg de masa corporal como promedio. El producto cumplió con los requisitos de inocuidad sólo cuando ningún animal presentó disminución de peso o síntomas tóxicos.

Determinación de la esterilidad

La prueba de esterilidad se realizó según los requerimientos de la USP 26/2003 y se basó en el crecimiento microbiano en medio de cultivo de tioglicolato y de tripton-soya agar. En los casos donde no se observó contaminación pasados catorce días, se definió que la muestra pasó la prueba de manera satisfactoria (USP 26/2003).

Determinación de la efectividad de preservos

Esta determinación se realizó según los requerimientos de la USP 26, 2003. Se basó en la efectividad de los preservos empleados para inhibir el crecimiento de cinco microorganismos:

Candida albicans ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Aspergillus niger* ATCC 1640, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (American Type Culture Collection: <http://www.atcc.org/>) (USP 26/2003).

Para que el preservio sea efectivo las concentraciones de bacterias viables deben tener al menos una reducción logarítmica de la concentración inicial a los siete días, no menos de tres reducciones logarítmicas de la inicial a los 14 días, y los conteos obtenidos a los 14 días no se deben incrementar a los 28 días. Por otra parte, las concentraciones de los hongos no deben incrementarse con respecto a la concentración inicial pasados los 7, 14 y 28 días.

Determinación del pH

Este método se efectuó según los requerimientos de la USP 26/2003 y se basó en la determinación potenciométrica de la concentración de iones hidrogeniónicos en el producto, mediante el empleo de electrodos y un equipo de medición de pH (USP 26/2003).

Determinación de las características organolépticas

En la formulación, se verificó a contraluz la transparencia y la ausencia de sólidos en suspensión (British Pharmacopoeia, 1998).

Determinación de la actividad biológica del IFN α 2b hum-rec por el método de titulación antiviral

La actividad antiviral del IFN α 2b hum-rec se determinó según describieron Pestka y Baron, (1981), por la inhibición del efecto citopático que produce el virus Mengo en células HEp-2 (carcinoma laríngeo humano, ATCC No. CCL23). En una placa de 96 pocillos se incubó una monocapa de células, en presencia de CO₂ al 3 % y un 95 % de humedad, con las muestras de IFN α 2b hum-rec (diluciones seriadas 1:2 en medio mínimo esencial suplementado con suero fetal bovino al 2 % y gentamicina 40 μ g/mL), a 37 \pm 2°C durante 24 h. El virus, con una dosis infectiva en cultivo de tejidos al 50 % (TCID₅₀ de 10⁷), se añadió a cada uno de los pocillos y se incubó bajo las mismas condiciones hasta que fue evidente el efecto citopático (90 % de lisis celular; aproximadamente 18-20 h) en el pocillo control (células que se incubaron con el virus y sin IFN α 2b hum-rec). El grado de destrucción de las células se midió por fijación y tinción con violeta cristal de las células que no se destruyeron. El efecto citopático se determinó con la ayuda de un fotómetro de placa de un sistema ultramicroanalítico (Tecnosuma, La Habana, Cuba). La unidad de actividad antiviral se definió como el recíproco de la dilución de la muestra que produjo el 50 % de protección de las células contra el efecto citopático del virus. La potencia de cada muestra se expresó en unidades internacionales por comparación con un material de referencia secundario que se

calibró en función del estándar internacional de IFN 95/566 fijado por la OMS (NIBSC: <http://immunology.org/links/nibsc.pdf>).

Determinación de la actividad biológica del IFN α 2b hum-rec por el método de titulación antiproliferativa

La actividad antiproliferativa del IFN α 2b hum-rec se determinó mediante la inhibición del crecimiento de las células Daudi (Prummer y col., 1994). En un frasco de 25 cm² se incubaron las células provenientes de un ampulla del banco de trabajo (10⁶ células), durante 4 h, a 37 ± 2°C con CO₂ al 5 % y un 95 % de humedad. Las células se observaron al microscopio para comprobar la cantidad y la morfología de las mismas, tras lo cual se distribuyeron en dos frascos de 25 cm² y se incubaron durante 3-4 días en iguales condiciones a las que se describieron con anterioridad. Pasado ese tiempo, las células se contaron, se centrifugaron a 1300 g en una centrífuga Hettich Mikroliter (Tuttlingen, Alemania) y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10 % y gentamicina 40 µg/mL y a cada pocillo se añadieron 50 µL de células. Las muestras de IFN α 2b hum-rec se titularon en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Como control negativo se utilizó un pocillo con células que se incubaron sin IFN α 2b hum-rec. Las placas se incubaron durante 72 h en las condiciones que se describieron con anterioridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron a cada pocillo de la placa 20 µL de bromuro de MTT, a una concentración de 5 µg/mL, y se incubó durante 4 h, a 37 ± 2°C. Por último, se adicionaron 100 µL de isobutanol. La lectura de las placas se realizó en un equipo SUMA (Tecnosuma, La Habana, Cuba), a una longitud de onda de 578 nm. El título se calculó mediante la relación sigmoideal entre la absorbancia y la dilución del IFN α 2b hum-rec (curva dosis-respuesta).

Identificación y cuantificación del IFN α 2b hum-rec por un ensayo inmunoenzimático

Este procedimiento se realizó según Santana y col., 1999a. El análisis se realizó en una placa de 96 pocillos. Cada pocillo se recubrió con 1 µg de AcM CBIFNA 2,3 que reconoce al IFN α 2b hum-rec, en 0,1 mL de solución tampón de recubrimiento (carbonato de sodio 0,05 mol/L, bicarbonato de sodio 0,05 mol/L, pH 9,6) y se incubó durante 3 h, a 37 ± 2°C. A continuación, se lavó la placa dos veces con solución de lavado (cloruro de sodio 137 mmol/L, cloruro de potasio 2,7 mmol/L, fosfato de sodio monobásico 1,4 mmol/L, fosfato de sodio dibásico 4,3 mmol/L, pH 7,4, más polisorbato 20 al 0,05 % (v/v)). Posteriormente, se añadieron 100 µL de muestra por pocillo, a la dilución apropiada, en el tampón de ensayo

(cloruro de sodio 137 mmol/L, cloruro de potasio 2,7 mmol/L, fosfato de sodio monobásico 1,4 mmol/L, fosfato de sodio dibásico 4,3 mmol/L, pH 7,4, más leche descremada al 0,5 % (m/v)) y se incubó a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 30 min. La placa se lavó cinco veces con solución de lavado. Después se aplicaron 70 μL del segundo anticuerpo (CBIFNA2-4 conjugado con peroxidasa) a una dilución de 1:6000 (v/v) en el tampón de ensayo, y la placa se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 1 h. La placa se lavó ocho veces con solución de lavado y se incubó a 25°C durante 15 min, con 100 μL de la solución sustrato (fosfato de sodio dibásico anhidro 0,1 mol/L, citrato de sodio monohidratado 0,048 mol/L, pH 5,5; con 0,45 g/L de *o*-fenilendiamina y H_2O_2 a 0,3 g/L). El desarrollo de la reacción se detuvo con la adición de 50 μL de ácido sulfúrico 2,5 mol/L. La absorbancia se midió a 492 nm mediante un lector de placas convencional. Como material de referencia para la cuantificación, se ensayó en paralelo una muestra de IFN α 2b hum-rec altamente puro (más de 98 % de pureza según la técnica de RP-HPLC) que se preparó en diluciones seriadas (desde 0,625 hasta 12,5 ng/mL). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Análisis estadístico

La significación estadística entre dos muestras se determinó mediante el test de Mann-Whitney para un nivel de confianza del 95 %. Las diferencias entre los resultados se consideraron significativas cuando el valor de P resultó menor de 0,05 (Sigarroa, 1985).

Las constantes de degradación cinéticas (pendientes de cada experimento) se compararon mediante el test de rangos múltiples de Newman-Keuls (Sigarroa, 1985).

La significación estadística entre tres o más grupos, se determinó mediante el test de Kruskal Wallis (Sigarroa, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios de preformulación

El IFN α 2b hum-rec no se absorbe a los bulbos 2R de borosilicato

Internacionalmente, se ha establecido que para la comercialización de los productos de origen biotecnológico se deben emplear viales de vidrio de calidad hidrolítica clase I (USP 26).

Las proteínas pueden adsorberse a numerosas superficies incluyendo el vidrio (Wang, 1999). Este proceso afecta de manera significativa la estructura secundaria de estas macromoléculas lo que puede dar lugar a la pérdida de su actividad biológica. La velocidad de adsorción depende del material de la superficie así como de la proteína adsorbida, pero en cualquier caso es un proceso muy rápido (Johnston, 1996).

En este trabajo no se encontraron diferencias estadísticas entre la recuperación del IFN α 2b hum-rec en los viales que contenían las soluciones de esta citoquina a las 24 h de almacenamiento, con respecto al tiempo inicial (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Compatibilidad de los bulbos 2R de borosilicato con la solución de IFN α 2b hum-rec.

	Concentración (x 10 ⁶ UI/mL)	Tiempo (h)	Concentración (ELISA) (μ g/mL)	Recuperación
(%)P ($\alpha= 0,05$)	1	0	13,67 \pm 0,89	2413,43 \pm 0,95
	3	0	30,57 \pm 2,48	24 31,31 \pm 1,87
	6	0	47,57 \pm 3,75	24 45,02 \pm 1,77
	12	0	118,53 \pm 4,28	24 118,92 \pm 5,72
	18	0	168,20 \pm 6,75	24 172,08 \pm 8,19
	24	0	236,83 \pm 9,48	24 236,28 \pm 7,19
		24	100,33 \pm 4,89	0,96 (NS)
		30	100,33 \pm 4,89	0,96 (NS)
		45	100,33 \pm 4,89	0,96 (NS)
		60	100,33 \pm 4,89	0,96 (NS)
		90	100,33 \pm 4,89	0,96 (NS)
		120	100,33 \pm 4,89	0,96 (NS)

Las muestras se dispensaron en bulbos 2R de borosilicato, se almacenaron a 5 \pm 3°C durante 24 h, y se analizaron por ELISA. Los resultados se analizaron mediante el test de Mann-Whitney (Sigarroa, 1985). Las diferencias entre los resultados obtenidos a las 24 h y el tiempo inicial se consideraron significativas cuando P<0,05. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Este resultado indicó la ausencia de adsorción rápida a las paredes de cristal de los bulbos o de cualquier otra vía de inestabilización de la proteína que pudieran inducirse en las interfases solución-vial y solución-aire. Además, evidenció que no existe necesidad alguna de emplear excipientes para inhibir este efecto como el polisorbato 80 u otros detergentes no iónicos.

Para llegar a esta conclusión se debió emplear una técnica analítica adecuada, que permitiera la obtención de resultados confiables. Mediante la técnica de ELISA se puede cuantificar de manera eficiente sólo la forma bien plegada y sin modificar del IFN α 2b hum-rec (Santana y col., 1999a). Esta eficiencia disminuye cuando la proteína se modifica, de modo que el empleo de esta técnica incrementa la veracidad de los resultados que se obtuvieron.

Otros autores han evaluado este efecto con otras proteínas. Reyes y colaboradores lo estudiaron en función de la estabilidad de la IL-2 hum-rec, y encontraron que este fenómeno no afectaba dicha citoquina (Reyes y col., 2005). Por otra parte, Fatouros y Sjostrom evaluaron la adsorción del factor VIII del plasma obtenido por vía recombinante, a las superficies del material de envase primario (viales de vidrio y tapones de goma). Los autores encontraron que esta proteína podía adsorberse al material de envase de manera directamente proporcional a la velocidad de agitación. Sin embargo, el uso de detergentes no iónicos como el polisorbato 20 y el polisorbato 80, inhibió este efecto (Fatouros y Sjostrom, 2000). Ello demuestra la vital importancia de estudios como éste durante el desarrollo de una formulación. De hecho, una influencia negativa podría no sólo afectar la estabilidad del ingrediente activo, sino además la dosis que se administrará al paciente (Wong y Parasrampur, 1997; Norde y Anusiem, 1992).

Los tapones de clorobutilo afectan la estabilidad del IFN α 2b hum-rec en solución

Según las farmacopeas de los Estados Unidos de América y del Reino Unido, los tapones de goma que se emplean para el sellado de los contenedores de preparaciones parenterales acuosas y liofilizadas se obtienen por vulcanización de sustancias orgánicas macromoleculares llamadas elastómeros, con aditivos adecuados (USP, 26; British Pharmacopoeia, 1998). Los elastómeros se producen a partir de sustancias naturales o sintéticas por polimerización, poliadición o policondensación (USP, 26; British Pharmacopoeia, 1998).

De acuerdo al tipo de elastómero empleado en la elaboración de los tapones, estos pueden ser de caucho natural, silicona, clorobutilo, bromobutilo, acrilonitrilo, politetrafluoroetileno (PTFE), etc. Sin embargo, internacionalmente, los tapones más empleados en la elaboración

de formas terminadas parenterales con ingredientes activos de origen biotecnológico son los de clorobutilo (FDA: <http://www.fda.gov>). Por ello, y porque según las diferentes farmacopeas sus principales extractables son iones metálicos y sustancias reductoras, resulta imprescindible el estudio de su influencia en la estabilidad de la molécula que se quiera formular.

Antes de evaluar la compatibilidad de los tapones de clorobutilo con el IFN α 2b hum-rec, así como el efecto de varios excipientes (como se describe más adelante) en la estabilidad de esta citoquina en solución, se determinaron cuáles eran los principales productos contaminantes correspondientes a señales con TR diferente al del control de IFN α 2b hum-rec, según la técnica de RP-HPLC. Ésta es una técnica analítica capaz de separar formas modificadas de la proteína. En consecuencia, cualquier cambio en el TR o la aparición de señales adicionales, en comparación con la señal correspondiente a la proteína nativa, se consideró una evidencia de la ocurrencia de modificaciones en la molécula del IFN α 2b hum-rec. El análisis y la evaluación de estos productos pueden contribuir al diseño de una formulación adecuada.

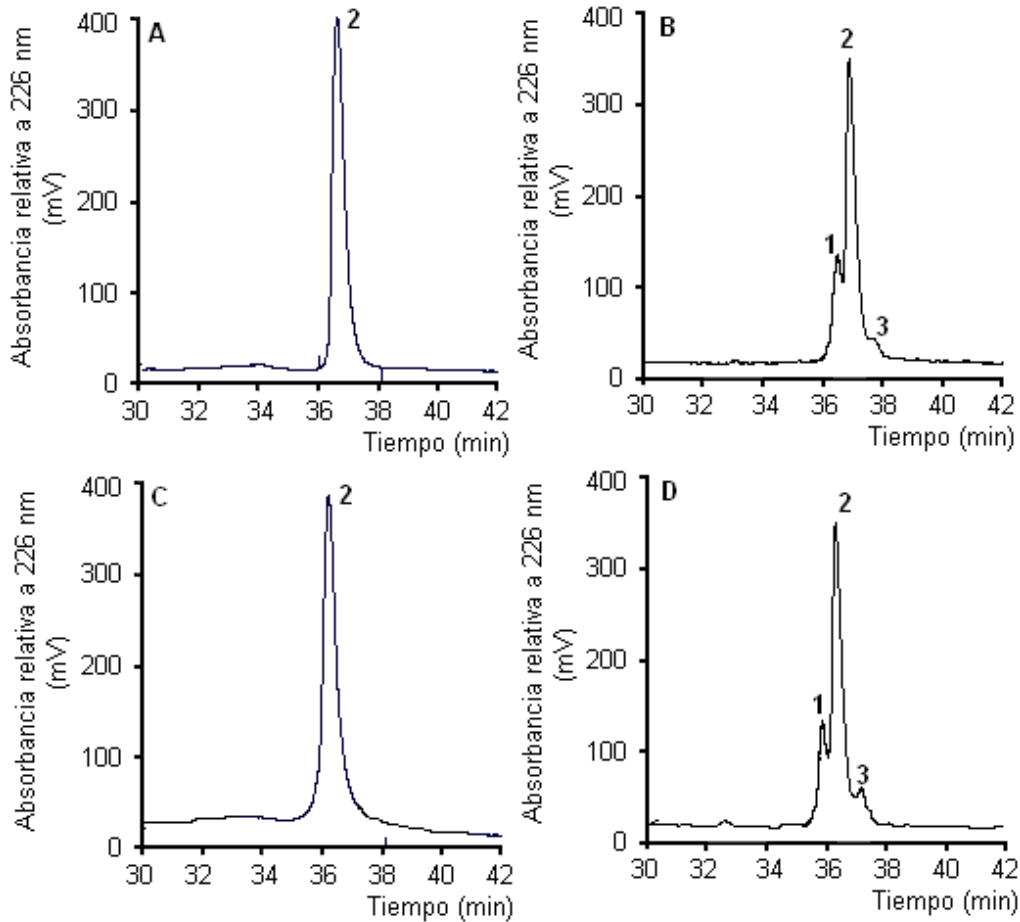
La mayoría de las farmacopeas recomiendan el análisis del IFN α 2b hum-rec por la técnica de RP-HPLC mediante una columna de cadena hidrocarbonada octadecil (18 átomos de carbono). En el CIGB, sin embargo, el análisis se realiza actualmente con columnas con cadena hidrocarbonada octil (8 átomos de carbono). Debido a su naturaleza menos hidrofóbica, las columnas de 8 átomos de carbono pueden ser menos resolutivas que aquéllas de 18 átomos de carbono. Por ello, las señales que contaminan la señal de interés pueden tender a una menor separación.

En este trabajo se determinó el perfil cromatográfico del IFN α 2b hum-rec con una columna C8 y se comparó con el obtenido con una columna C18.

Como se puede observar en la Figura 3.1, no se encontraron diferencias en los perfiles que se obtuvieron para ambas columnas. Mediante las dos columnas cromatográficas se obtuvo un perfil caracterizado por una señal prácticamente única, en el tiempo inicial. Sin embargo, cuando la muestra se almacenó a 37°C, en contacto con los tapones de clorobutilo, en los cromatogramas obtenidos por ambas columnas aparecieron nuevas señales, probablemente relacionadas con productos de modificación de la proteína.

Como no se encontraron diferencias entre los perfiles que se obtuvieron con ambas columnas cromatográficas se decidió emplear la columna de 8 átomos de carbono para los experimentos siguientes.

Los productos de modificación más importantes que se detectaron fueron una señal correspondiente a una especie más hidrofílica (TR de $36,5 \pm 0,2$ min) y otra correspondiente a una especie más hidrofóbica (TR de $37,8 \pm 0,1$ min) que la señal relacionada con la forma nativa de la proteína (Fig. 3.1).



Fi

Figura 3.1. Análisis por RP-HPLC del IFN α 2b hum-rec, en condiciones estresantes de almacenamiento (a 37°C, en contacto con los tapones de clorobutilo) empleando dos columnas cromatográficas.

En la figura se muestran los principales productos de modificación del IFN α 2b hum-rec que se detectaron por RP-HPLC con el empleo de una columna de fase reversa de 18 átomos de carbono (B) y de 8 átomos de carbono (D), respectivamente. Como control se utilizó el IFN α 2b hum-rec con más de un 95 % de pureza (tiempo inicial) analizado en la columna de 18 átomos de carbono (A) y de 8 átomos de carbono (C), respectivamente.

Las muestras (IFN α 2b hum-rec a 3 MUI/mL en solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 7,4) se almacenaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y se analizaron por RP-HPLC a los 15 días de almacenamiento en contacto con los tapones de clorobutilo.

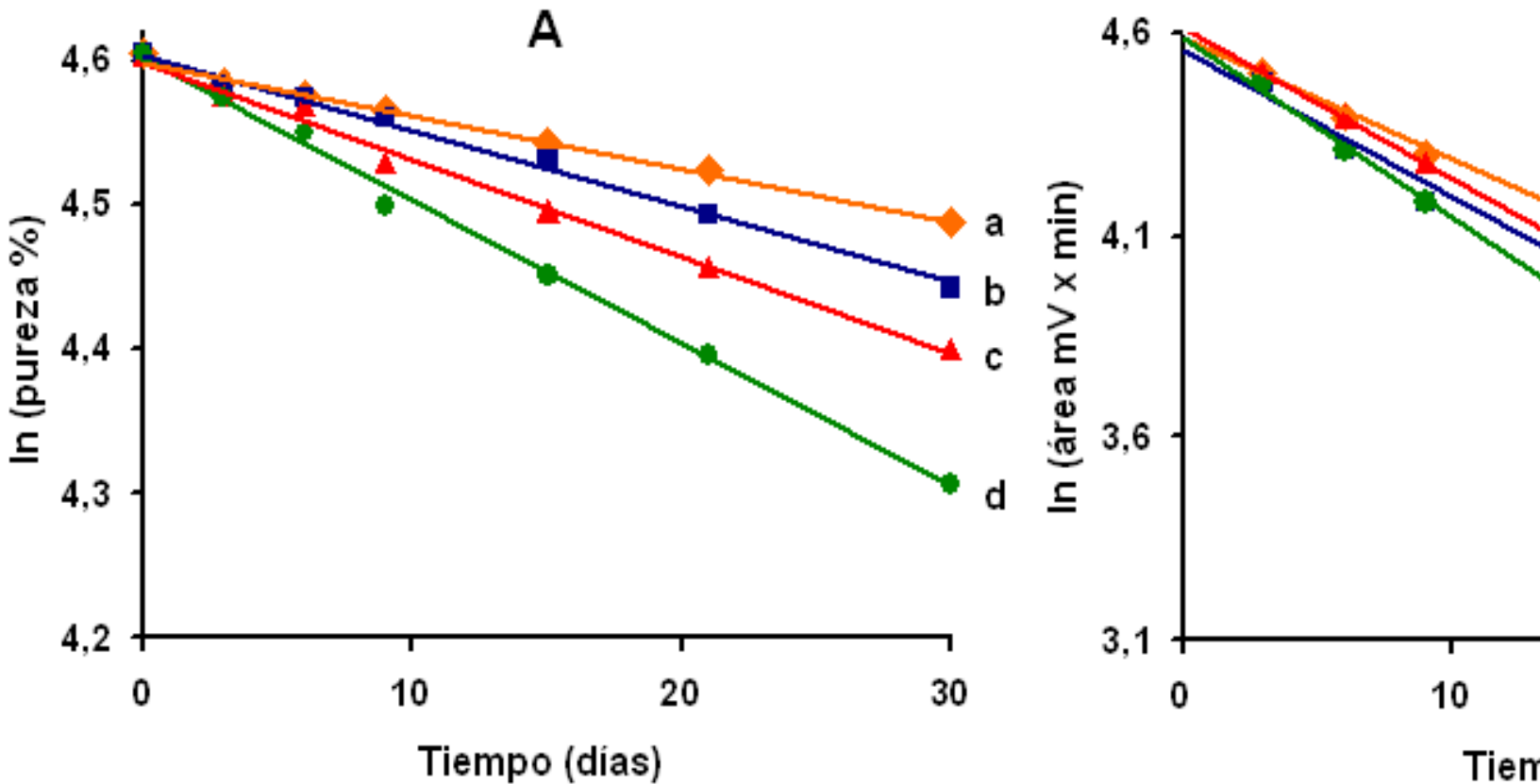
Los picos corresponden a: 1) especie más hidrofílica (TR de $36,5 \pm 0,2$ min); 2) IFN α 2b hum-rec nativo (TR de $37,2 \pm 0,2$ min); 3) especie más hidrofóbica (TR de $37,8 \pm 0,1$ min).

El efecto de los tapones de clorobutilo se estimó mediante la determinación del área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificaciones (TR de $37,2 \pm 0,2$ min) y la pureza de esta señal, según la técnica de RP-HPLC. El almacenamiento de la proteína a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ tanto en contacto como sin contacto con los tapones, dio como resultado una disminución de ambos parámetros en el tiempo.

Con el objetivo de comparar cuantitativamente las diferencias en la estabilidad de preparaciones de IFN α 2b hum-rec a diferentes concentraciones o en presencia de varios excipientes, se ajustó la inactivación térmica a un modelo de primer orden, según la ecuación descrita en el acápite 2.2 (Tabla 3.2, Fig. 3.2). De esta manera, la constante cinética (k) se calculó mediante la relación lineal entre el logaritmo de la pureza y del área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo, y el tiempo.

La concentración de proteínas afecta la influencia de los tapones de clorobutilo sobre la estabilidad del IFN α 2b hum-rec en solución

Como se muestra en la Fig. 3.2, la pureza (A) y el área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo (B) de las muestras de la citoquina en contacto con los tapones de clorobutilo, disminuyeron en mayor proporción al compararlas con las muestras que no se almacenaron en contacto con este material de envase (Fig. 3.2, Tabla 3.2).



Con el objetivo de evaluar cuánto disminuyeron estos parámetros en las muestras a una concentración con respecto a las muestras preparadas a la otra concentración, se determinó la relación entre la velocidad de disminución de estos valores (pendientes de las rectas de acuerdo a una cinética de degradación de primer orden). Ello indicó las veces que disminuyeron tanto la pureza como el área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo de una muestra, con respecto al control utilizado.

Las muestras de IFN α 2b hum-rec a la menor de las concentraciones (3 MUI/mL), almacenadas en contacto de los tapones de clorobutilo, mostraron una reducción en la pureza y el área la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo en $1,82 \pm 0,09$ y $1,28 \pm 0,11$ veces respectivamente, en comparación con las muestras de esta citoquina que se almacenaron sin contacto con el material de envase primario. De manera similar, en las muestras de IFN α 2b hum-rec a 10 MUI/mL y almacenadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ en contacto con los tapones de clorobutilo, la pureza y el área bajo la curva de la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo disminuyeron en $1,86 \pm 0,17$ y $1,25 \pm 0,14$ veces respectivamente, en comparación con las muestras de esta citoquina que se almacenaron sin contacto con este material de envase primario (Fig.3.2, Tabla 3.2). Estos resultados indicaron que el contacto con este material de envase primario afectó la estabilidad del IFN α 2b hum-rec.

Tabla 3.2. Parámetros cinéticos de la estabilidad térmica del IFN α 2b hum-rec con y sin contacto con los tapones de clorobutilo.

Concentración	En contacto con los tapones	Pureza ^a ($k \times 10^3$ (días ⁻¹))	Área ^b ($k \times 10^3$ (días ⁻¹))		
3 MUI/mL	6,74 \pm 1,22	39,11 \pm 2,84	10 MUI/mL	9,92 \pm 0,96	46,34 \pm 3,11
	Sin contacto con los tapones	Pureza ^a ($k \times 10^3$ (días ⁻¹))	Área ^b ($k \times 10^3$ (días ⁻¹))		
3 MUI/mL	3,71 \pm 0,62	30,47 \pm 3,61	10 MUI/mL	5,32 \pm 0,85	37,12 \pm 3,14

^aDeterminación de la pureza del pico principal, determinada por RP-HPLC.

^bDeterminación de la recuperación del área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo, determinada por RP-HPLC.

Los resultados están expresados como la media (n=3) \pm desviación estándar.

Los resultados de este experimento indicaron además, que la concentración de proteínas afectó el comportamiento del IFN α 2b hum-rec, tanto en contacto como sin contacto con los tapones de clorobutilo, como se explica a continuación.

Los resultados cinéticos de la comparación entre las muestras a las dos concentraciones indicaron que en las soluciones más concentradas que no se colocaron en contacto con los

taponos de clorobutilo, la pureza y el área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec disminuyeron en $1,43 \pm 0,08$ y $1,22 \pm 0,11$ veces, respectivamente, en comparación con las muestras más concentradas sin contacto con este material de envase primario. Cuando las soluciones se almacenaron en contacto con los taponos de clorobutilo se obtuvieron resultados similares. En este caso, el análisis cinético indicó que en las muestras a 10 MUI/mL, la pureza y el área bajo la señal de interés disminuyeron $1,47 \pm 0,13$ y $1,18 \pm 0,07$ veces más rápido, respectivamente, en comparación con las muestras a 3 MUI/mL en las mismas condiciones (Tabla 3.2).

La desestabilización de proteínas debido a los taponos de clorobutilo no se ha dilucidado totalmente, sin embargo, existen dos factores que pudieran contribuir a este efecto: *i*) la posible liberación de metales pesados que normalmente se utilizan para la vulcanización de la goma de los taponos (Ellin y col. 1985; British Pharmacopoeia, 1998), y *ii*) otras vías de inestabilización que se pueden inducir en la interfase tapón-solución (Wang, 1999). El primero de estos factores pudo estar relacionado con la aparición de la especie más hidrofílica (Fig. 3.1), que a su vez pudiera corresponder a la forma oxidada del IFN α 2b hum-rec en la metionina 101 según Bordens y colaboradores (1997). El segundo de los factores pudo estar relacionado con la aparición de las especies más hidrofóbicas de la citoquina como agregados moleculares (Fig. 3.1).

El efecto de los taponos de clorobutilo, en combinación con la temperatura que se empleó en este experimento ($37 \pm 2^\circ\text{C}$), pudo incrementar el daño al IFN α 2b hum-rec debido a la desestabilización que se pudo inducir a través de la adsorción a la interfase solución-tapón (Wang, 1999). Este proceso es por lo general dependiente de la concentración por lo que podríamos esperar una mayor inestabilización en las interfases a mayores concentraciones de la proteína.

Algunos autores han sugerido que el aumento en la concentración de proteínas puede facilitar la agregación de estas biomoléculas (Manning y col., 1989, Ruddon y Bedows, 1997). Esta influencia puede explicarse debido al incremento en las interacciones intermoleculares que a su vez pueden facilitar la ocurrencia de modificaciones que afectan directamente la estabilidad de las proteínas (Manning y col., 1989, Rupley y Careri, 1991).

Nuestros resultados coinciden con reportes en la literatura sobre estudios similares. Lu y colaboradores estudiaron el efecto del pH en la adsorción de la lisozima a superficies de óxido de silicio (Lu y col., 1999). En este estudio encontraron que a pH neutro, la lisozima se adsorbía a las superficies de óxido de silicio formando bicapas cuando la concentración de

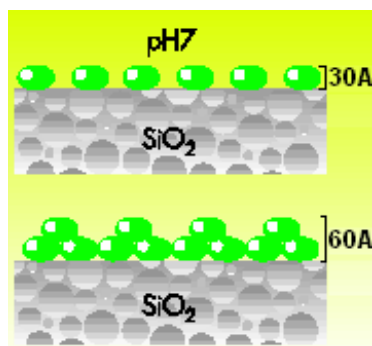


Figura 3.3. Diagrama que ilustra la adsorción de la lisozima en las interfaces silica-solución, cuando se usan dos concentraciones de esta proteína (Tomado de Lu y col., 2001).

proteínas era alta, de modo que un mayor número de residuos estaba en contacto con esta superficie, y por ende expuestos a la modificación por el aumento de la tensión superficial (Fig. 3.3). En cambio, a bajas concentraciones solamente se formaba una capa, por lo que el número de moléculas que se absorbían era menor. En ambos casos la proteína se adsorbía con el eje mayor paralelo a la superficie.

Otro mecanismo que podría explicar el efecto de los tapones en la estabilidad de esta proteína, es la posible liberación de metales y su paso a la solución, como se discute más adelante. Sin embargo, la combinación de ambos mecanismos nos brinda una explicación más convincente a

la influencia de los tapones sobre esta citoquina.

La adición de polisorbato 80 y EDTA Na₂ x 2H₂O afecta la influencia de los tapones de clorobutilo sobre la estabilidad del IFN α 2b hum-rec en solución

Con el objetivo de contribuir a la comprensión de los mecanismos que explican el efecto de los tapones de clorobutilo en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec, se evaluó la influencia de dos excipientes. Estos excipientes se escogieron de entre los solutos que actualmente han demostrado ser funcionales en la estabilización de las proteínas (Wang, 1999) y teniendo en cuenta los dos factores que pudieron contribuir al efecto de los tapones: *i*) la posible liberación de metales pesados que normalmente se utilizan para la vulcanización de la goma de los tapones (Ellin y col. 1985; British Pharmacopoeia, 1998), y *ii*) otras vías de inestabilización que se pueden inducir en la interfase tapón-solución (Wang, 1999).

Uno de estos excipientes, el EDTA Na₂ x 2H₂O, es un agente quelante que se ha empleado con frecuencia para estabilizar proteínas debido a su capacidad para capturar trazas de metales que pueden afectar la estabilidad de estas biomoléculas (Wang, 1999). El otro aditivo, polisorbato 80, es un detergente no iónico que disminuye la tensión superficial en las soluciones de proteínas, lo cual disminuye las fuerzas que promueven la agregación de estos ingredientes farmacéuticos activos por interacciones hidrofóbicas (Wang, 1999).

En este experimento, el EDTA Na₂ x 2H₂O incrementó la pureza y el área bajo la curva de la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo, en $2,09 \pm 0,17$ y $1,36 \pm 0,08$ veces respectivamente, en las muestras de esta citoquina sin contacto con los tapones de

clorobutilo. Para ello se tomaron como referencia las muestras de la proteína que se almacenaron en contacto con este material de envase primario en presencia del EDTA Na₂ x 2H₂O (Fig. 3.4, Tabla 3.3).

Por otra parte, los resultados que se obtuvieron con el empleo del polisorbato 80 indicaron que este detergente incrementó la pureza y el área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo, en $2,11 \pm 0,14$ y $1,63 \pm 0,11$ veces respectivamente, en las muestras de IFN α 2b hum-rec sin contacto con los tapones de clorobutilo. En este caso se comparó con el respectivo control (muestras de esta proteína en contacto con el material de envase primario en presencia de polisorbato 80) (Tabla 3.3, Fig. 3.4).

Tabla 3.3. Parámetros cinéticos de la degradación térmica del IFN α 2b hum-rec en presencia de EDTA Na₂ x 2H₂O o polisorbato 80, con y sin contacto con los tapones de clorobutilo.

Excipientes	En contacto con los tapones	Pureza ^a ($k \times 10^3$ (días ⁻¹))	Área ^b ($k \times 10^3$ (días ⁻¹))
EDTA Na ₂ x 2H ₂ O	5,01 \pm 0,32	25,51 \pm 3,57	
Polisorbato 80	4,24 \pm 0,21	113,37 \pm 2,82	
Control	6,74 \pm 1,22	39,11 \pm 2,84	
Excipientes	Sin contacto con los tapones	Pureza ^a ($k \times 10^3$ (días ⁻¹))	Área ^b ($k \times 10^3$ (días ⁻¹))
EDTA Na ₂ x 2H ₂ O	2,39 \pm 0,22	18,72 \pm 2,71	
Polisorbato 80	2,01 \pm 0,14	82,21 \pm 3,25	
Control	3,71 \pm 0,62	30,47 \pm 3,61	

^aDeterminación de la pureza del pico principal, determinada por la técnica de RP-HPLC.

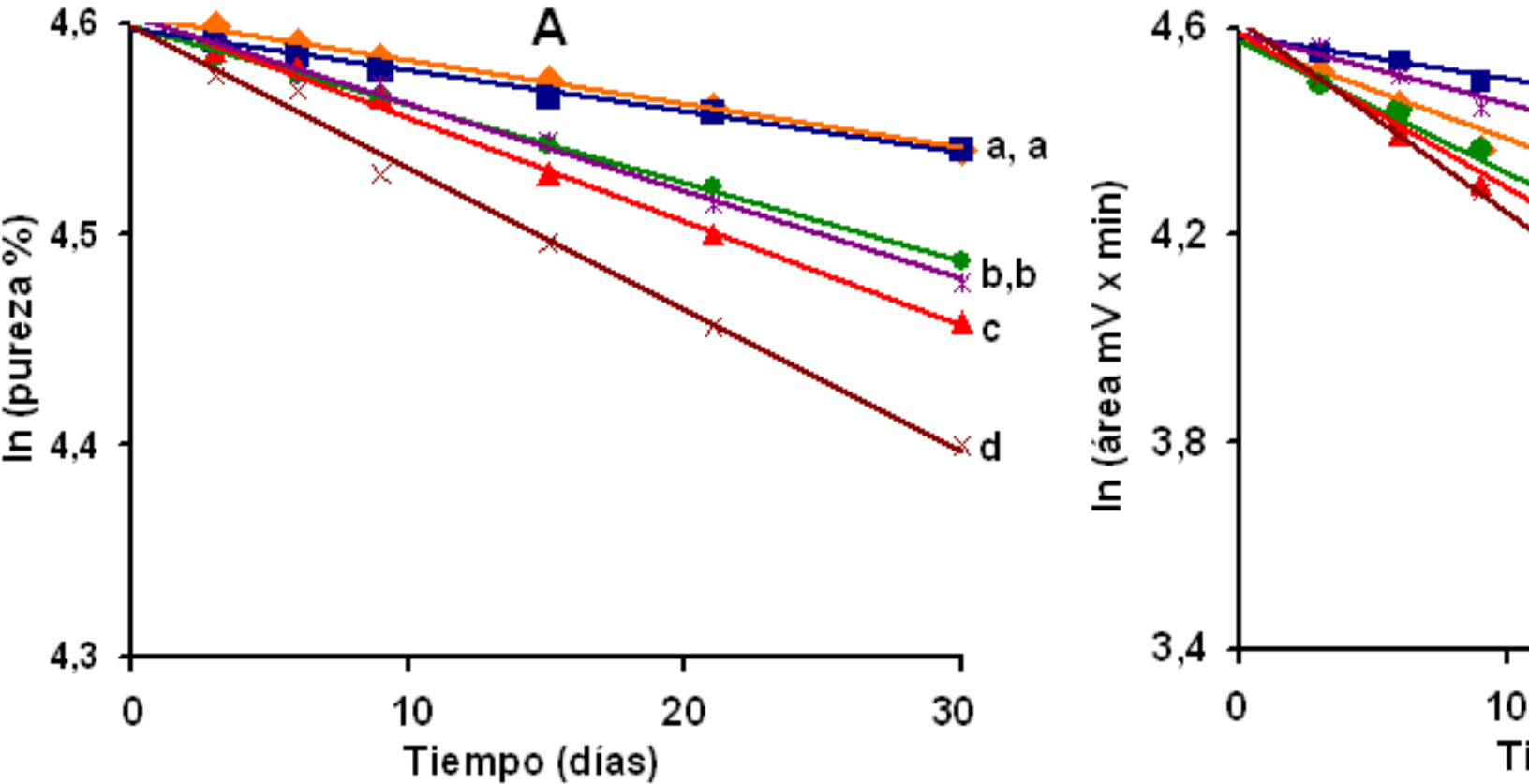
^bRecuperación del área bajo la señal correspondiente al IFN alfa 2b nativo, determinada por la técnica de RP-HPLC.

Los resultados están expresados como la media (n=3) \pm desviación estándar.

Los resultados de este experimento (Fig. 3.4, Tabla 3.3) indicaron que el polisorbato 80 tuvo un mayor impacto en la estabilización del IFN α 2b hum-rec en ambas condiciones de almacenamiento: en contacto y sin contacto con los tapones de clorobutilo, que el EDTA Na₂ x 2H₂O.

El comportamiento que se observó con el empleo del EDTA Na₂ x 2H₂O parece indicar que uno de los posibles mecanismos que explican la desestabilización del IFN α 2b hum-rec tras el contacto con los tapones de clorobutilo, pudiera ser la liberación de iones metálicos desde los tapones hacia la solución. Esta hipótesis se refuerza si tenemos en cuenta que entre los principales extractables que recomienda cuantificar la Farmacopea Británica para los tapones de clorobutilo se incluyen los metales pesados y el zinc soluble (British Pharmacopoeia, 1998). Además, existen reportes sobre la liberación de aluminio hacia la

solución a partir del cristal, el plástico y la goma (Bohrer y col., 2003). Sin embargo, se consideró que esta posibilidad no podía ser la única que explicara el efecto de los tapones dada la ineficacia del EDTA $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ para eliminar completamente la desestabilización de la citoquina en contacto con este material de envase.



A partir de los resultados que se obtuvieron con el empleo del polisorbato 80, parece evidente que este detergente no iónico no fue del todo efectivo para eliminar la desestabilización que causaron los tapones de clorobutilo. Esto pudiera explicarse por la posible presencia de trazas de metales en las sales de la solución tampón de fosfato de sodio (Fransson y Hagman, 1996), y la posible contaminación del polisorbato 80 con peróxidos (Ha y col., 2002). Ambos factores pueden acelerar la desestabilización del IFN α 2b hum-rec.

En cualquier caso, el polisorbato 80 fue más efectivo que el EDTA $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ para disminuir la desestabilización de la proteína provocada por el contacto con los tapones (Fig. 3.4, Tabla 3.3). En este sentido se debe señalar que los detergentes contribuyen a la estabilización de las proteínas disminuyendo la tensión superficial de las soluciones con estas

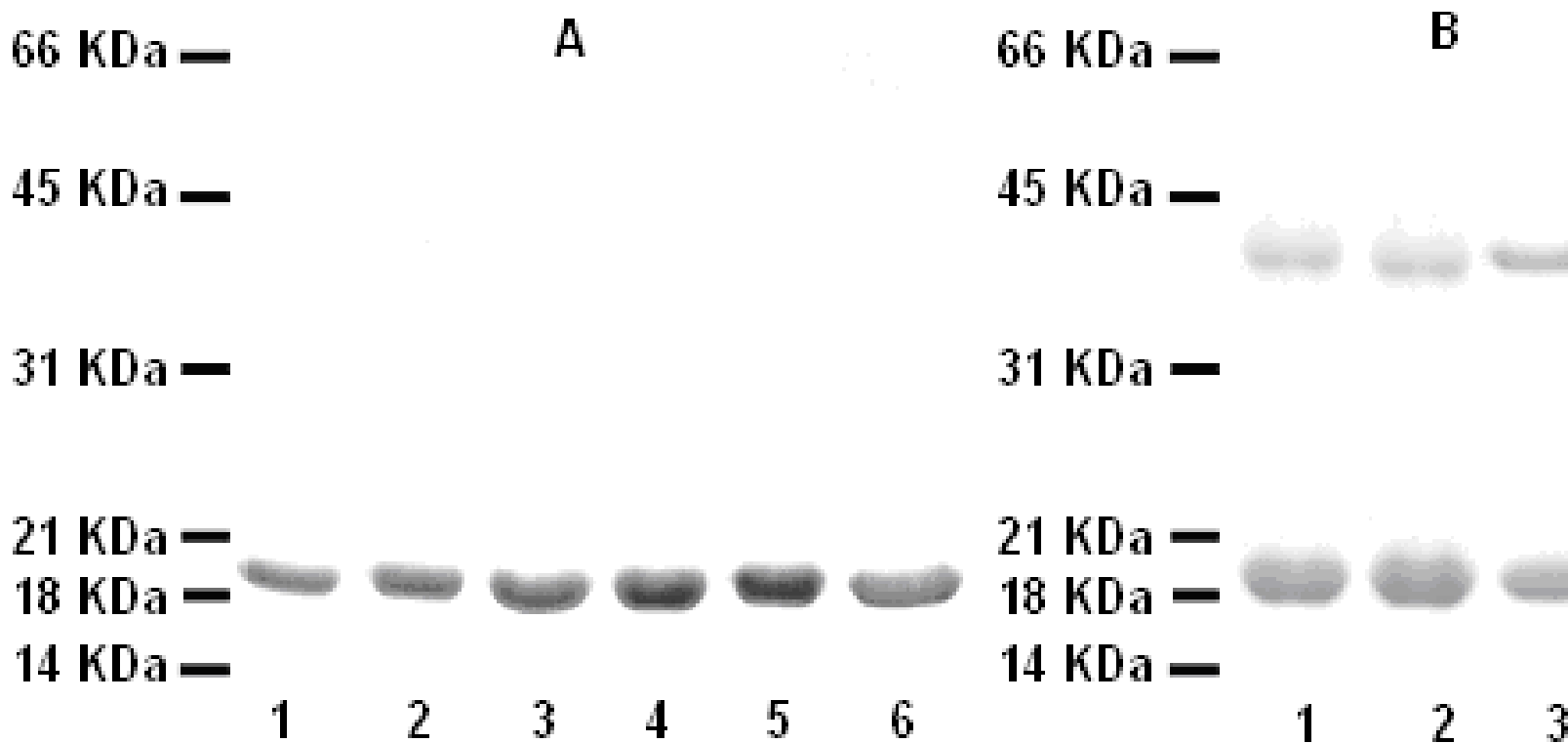
macromoléculas (Wang, 1999). Con ello, inhiben las fuerzas que contribuyen a la agregación de estas biomoléculas por interacciones hidrofóbicas (Wang, 1999).

Ello sugiere que las vías de desestabilización que se inducen en las interfases tapón-solución constituye otro de los mecanismos que explican el efecto de los tapones de clorobutilo en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec. Esto, unido a la posible liberación de metales hacia la solución, indica que para el desarrollo de una formulación líquida de IFN α 2b hum-rec se debe considerar el uso de un detergente no iónico y un agente quelante. Mediante el uso de estos excipientes se inhibirían los mecanismos de desestabilización de la molécula, e incluso podrían actuar de manera sinérgica.

La agregación constituye una de las principales modificaciones del IFN α 2b hum-rec

Otra de las modificaciones que afectan la estabilidad de los IFNs es la agregación (Allen y col., 1999). Esta modificación se puede determinar por SDS-PAGE y su aparición puede constituir un problema desde el punto de vista clínico. Ello se debe a que los agregados de IFN α 2b hum-rec pueden favorecer la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el ingrediente farmacéutico activo y disminuir la eficacia de la terapia (Gross y col., 1998, Wang, 1999).

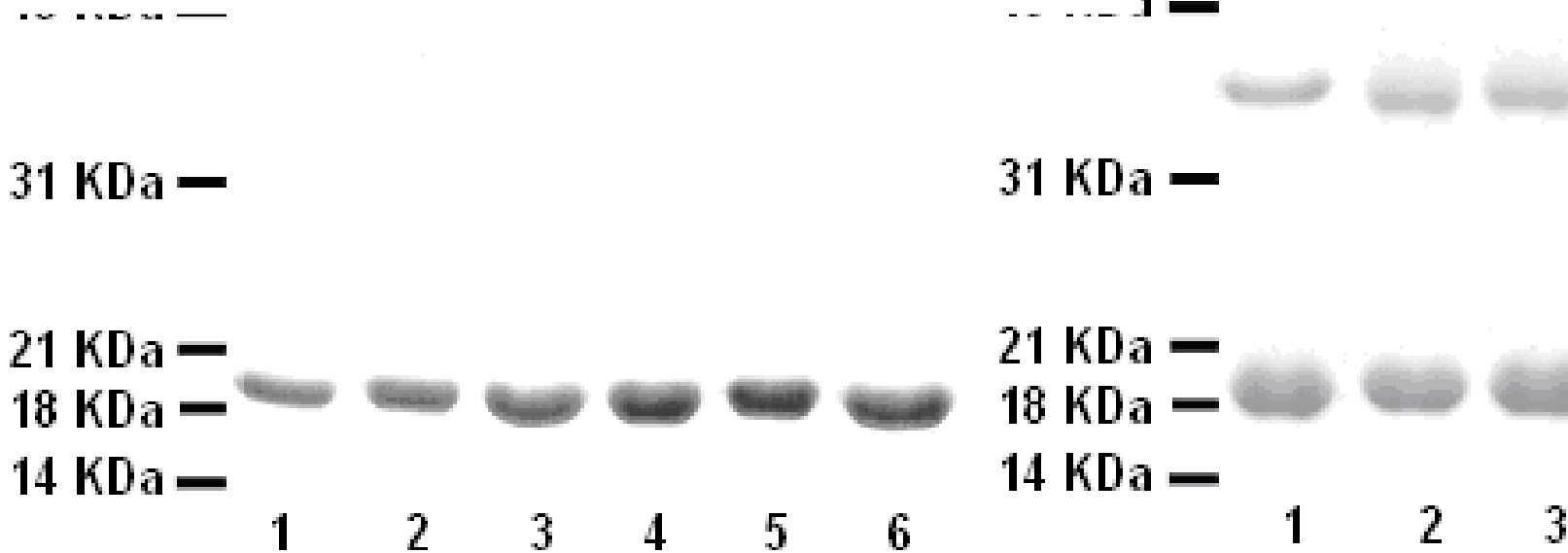
En condiciones reductoras, la migración electroforética en los geles de poliacrilamida de los agregados que se formaron, fue de aproximadamente 40 KDa (Fig. 3.5, 3.6). Teniendo en cuenta el PM del IFN α 2b hum-rec producido en el CIGB (19 500 Da según la técnica de espectrometría de masas (Padrón y col., 1989)), ello sugiere la formación de dímeros.



No se encontraron evidencias que indicaran la formación de agregados de PM mayor a 40 KDa, o la formación de bandas de menor talla que 18 KDa, que indicaran la degradación de la molécula.

Cuando el IFN α 2b hum-rec se analizó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras los resultados fueron similares (Fig. 3.6). Estos resultados indicaron que durante la agregación del IFN α 2b hum-rec se forman tanto agregados reducibles como no reducibles. Si bien el SDS y el β -mercaptoetanol, dos de los agentes que se utilizan en la SDS/PAGE (el primero en condiciones reductoras y no reductoras, y el segundo en condiciones reductoras solamente) deberían desagregar los dímeros de IFN α 2b hum-rec, los resultados fueron diferentes (Fig. 3.6). En la técnica de SDS-PAGE, el SDS se utiliza como desnaturizante para separar los agregados unidos por interacciones no covalentes, eliminando cualquier interacción hidrofóbica entre las moléculas (Wang, 1999). El β -mercaptoetanol es un agente reductor que destruye los puentes disulfuro, principal interacción que contribuye a la formación de los agregados covalentes en las proteínas (Wang, 1999). De modo que su empleo contribuye a separar los agregados unidos por puentes disulfuro.

Figura. 3.6. Análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras del IFN α 2b hum-rec en el tiempo inicial (A) y después de 15 días de almacenamiento a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (B). Las muestras de IFN α 2b hum-rec a 0,5 mg/mL se almacenaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras. Carrileras 1-5: IFN α 2b hum-rec en solución tampón fosfato de sodio 50 mmol/mL, pH 6; carrilera 6: control. Los agregados del IFN α 2b hum-rec están señalados con una saeta. El control se corresponde con el material de referencia IFN α 2-05-0701 suministrado por la Dirección de Calidad del CIGB.



Según los resultados del análisis por densitometría de los geles obtenidos en este experimento, la agregación se detectó en mayor proporción cuando se utilizaron condiciones no reductoras (Tabla 3.4). Ello es indicativo de que fuerzas covalentes, probablemente puentes disulfuro, operaron para lograr la formación de los dímeros de IFN α 2b hum-rec.

La estructura del IFN α 2b hum-rec sugiere que la principal vía para la formación de agregados covalentes en esta proteína es la unión por puentes disulfuro. Ello se debe a que en su estructura están presentes dos enlaces de este tipo que se podrían intercambiar a altas temperaturas (Wang, 1999). Sin embargo, cuando se empleó el β -mercaptoetanol en la SDS-PAGE (Fig. 3.6) la agregación también se detectó, si bien, en menor proporción, según el análisis por densitometría de los geles obtenidos (Tabla 3.4). Todo parece indicar que este agente reductor no resultó del todo eficaz para separar este tipo de agregados, probablemente por la poca accesibilidad a las interfaces donde las moléculas de IFN α 2b hum-rec forman sus enlaces covalentes (Wang, 1999).

Tabla 3.4. Parámetros cinéticos de la agregación del IFN α 2b hum-rec en presencia de diferentes estabilizantes.

Excipientes	SDS/PAGE ^a	SDS/PAGE ^a
	(en condiciones reductoras)	(en condiciones no reductoras)
	$k \times 10^3$ (días ⁻¹)	$k \times 10^3$ (días ⁻¹)
Polisorbato 20	0,71 \pm 0,06	0,84 \pm 0,04
Polisorbato 80	0,85 \pm 0,05	1,12 \pm 0,05
SDS	1,48 \pm 0,11	1,67 \pm 0,07
EDTA Na ₂ x 2H ₂ O	0,52 \pm 0,03	0,75 \pm 0,03
Control	1,54 \pm 0,11	1,82 \pm 0,08

^aDeterminación de la pureza de la banda principal de IFN α 2b hum-rec.

Los resultados están expresados como la media (n=3) \pm desviación estándar.

A continuación se presenta un análisis cinético más detallado de los resultados obtenidos con cada uno de los excipientes empleados para modificar la velocidad de agregación de esta proteína.

La adición de polisorbatos, EDTA Na₂ x 2H₂O y SDS disminuye la velocidad de agregación del IFN α 2b hum-rec en solución

EDTA Na₂ x 2H₂O: este agente quelante redujo la velocidad de agregación del IFN α 2b hum-rec en una mayor extensión que el resto de los excipientes (Tabla 3.4, Fig. 3.7). El análisis cinético mostró que este excipiente disminuyó la velocidad de agregación del IFN α 2b hum-rec en 2,96 \pm 0,09 y 2,43 \pm 0,08 veces en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente, y tomando como comparación las muestras controles de IFN α 2b hum-rec en la solución tampón de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 6 (Tabla 3.4, Fig. 3.7).

En las presentes condiciones experimentales, el papel del EDTA $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pudiera relacionarse con la captura de las trazas de metales en las soluciones de proteínas, que de otra forma podrían acelerar varias reacciones de modificación. Estas trazas de metales podrían provenir de las sales de las soluciones tampones, como se ha reportado previamente (Fransson y Hagman, 1996). Entre las reacciones más importantes que pueden catalizar estas trazas de metales se incluyen la oxidación y la agregación (Wang, 1999; Cholewinski y col., 1996).

De acuerdo a estos resultados, la agregación del IFN α 2b hum-rec parece estar relacionado con la oxidación de residuos, catalizada por metales como se ha reportado para otras proteínas. Li y colaboradores lograron inhibir completamente la agregación y la oxidación de la relaxina en un sistema altamente oxidante (ácido ascórbico-cloruro de cobre-oxígeno). Este resultado se logró con la adición de EDTA 0,1 mmol/L (Li y col., 1995). También Allen y colaboradores reportaron una reducción significativa de la oxidación de los residuos de metionina en una forma híbrida del IFN α con la adición de EDTA (Allen y col., 1999).

Los resultados obtenidos con el empleo del EDTA $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ en este experimento demuestran la necesidad de su uso para disminuir la agregación indirecta del IFN α 2b hum-rec.

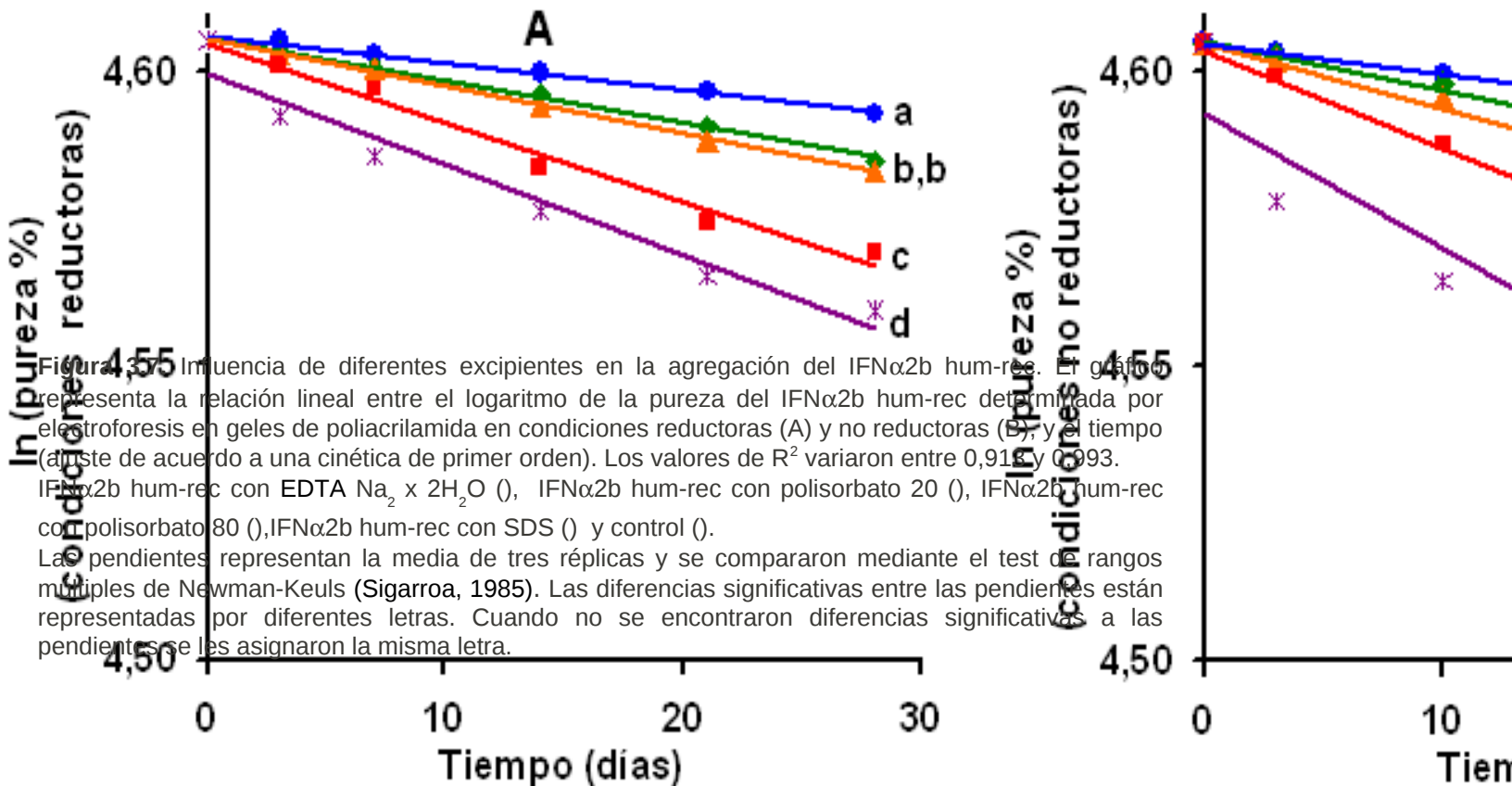


Figura 4.37 Influencia de diferentes excipientes en la agregación del IFN α 2b hum-rec. El gráfico A representa la relación lineal entre el logaritmo de la pureza del IFN α 2b hum-rec determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B), y el tiempo (ajuste de acuerdo a una cinética de primer orden). Los valores de R^2 variaron entre 0,915 y 0,993. IFN α 2b hum-rec con EDTA $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (a), IFN α 2b hum-rec con polisorbato 20 (b), IFN α 2b hum-rec con polisorbato 80 (c), IFN α 2b hum-rec con SDS (d) y control (*). Las pendientes representan la media de tres réplicas y se compararon mediante el test de rangos múltiples de Newman-Keuls (Sigarra, 1985). Las diferencias significativas entre las pendientes están representadas por diferentes letras. Cuando no se encontraron diferencias significativas a las pendientes se les asignaron la misma letra.

Polisorbatos 20 y 80: estos detergentes no iónicos incrementaron la estabilidad del IFN α 2b hum-rec mediante la disminución de su velocidad de agregación (Tabla 3.4, Fig. 3.7). Sin embargo, este efecto fue menor que el del EDTA Na₂ x 2H₂O. El análisis cinético mostró que estos dos detergentes disminuyeron la velocidad de agregación de la proteína entre 1,63 \pm 0,12 y 2,17 \pm 0,15 veces, en comparación con el IFN α 2b hum-rec sin excipientes (Tabla 3.4, Fig. 3.7).

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la interacción proteína-detergente, estos compuestos podrían estabilizar al IFN α 2b hum-rec cubriendo los sitios hidrofóbicos de la superficie proteica lo que reduciría la posibilidad de formación de agregados no covalentes.

En general, los detergentes disminuyen la tensión superficial de las soluciones de proteínas y con ello inhiben las fuerzas que contribuyen a la agregación de estas biomoléculas por interacciones hidrofóbicas. El uso de estos compuestos a bajas concentraciones resulta, por lo general, suficiente para prevenir o reducir la agregación de las proteínas, debido a su baja concentración micelar crítica (Wang, 1999).

Hay numerosos reportes en la literatura acerca del uso de los polisorbatos en la estabilización de proteínas. Sebeka y colaboradores encontraron que tanto el polisorbato 20 como el polisorbato 80 protegían la actividad antiviral del IFN α 2b contra la inactivación por calor (Sebeka y col., 2001). Otras proteínas como la hGH, la hemoglobina y el factor XIII han mostrado una disminución en la velocidad de agregación tras el empleo de estos detergentes no iónicos (Wang, 1999).

Sin embargo, los polisorbatos fueron menos efectivos que el EDTA Na₂ x 2H₂O en la reducción de la velocidad de agregación del IFN α 2b hum-rec. Esto se podría explicar por la posible contaminación de estos detergentes con peróxidos de alquilo, los cuales pueden acelerar las reacciones de modificación de las proteínas, como la oxidación (Ha y col., 2002). De hecho, algunos autores han reportado la desestabilización de algunas proteínas tras la adición de polisorbatos. Herman y colaboradores encontraron una relación directa entre el nivel de peróxidos en el polisorbato 80 y la oxidación del G-CSF (Herman y col., 1996). Por otra parte, Allen y col., encontraron que el polisorbato 20 inducía la oxidación de un residuo de metionina en una forma híbrida de IFN α (Allen y col., 1999). Sin embargo, este efecto se puede inhibir con el empleo de antioxidantes como la cisteína, la metionina y el glutatión (Knepp y col., 1996).

SDS: a pesar de los reportes que existen sobre el efecto estabilizante del SDS con algunas proteínas como la ASH (Giancola y col., 1997), el factor de crecimiento de fibroblastos en su

forma ácida (Won y col., 1998) y la ARNasa (Tsai y col., 1998), con este detergente aniónico se obtuvo el menor impacto en la estabilización del IFN α 2b hum-rec. El análisis cinético indicó que este aditivo redujo la velocidad de agregación de la citoquina sólo en $1,04 \pm 0,06$ y $1,09 \pm 0,05$ veces, en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente. En este caso se tomaron como referencia las muestras controles de IFN α 2b hum-rec en la solución tampón de fosfato de sodio 50 mmol/L, pH 6 (Tabla 3.4, Fig. 3.7).

El bajo impacto de este detergente en la estabilización del IFN α 2b hum-rec puede explicarse debido a su capacidad para unirse a las proteínas, de manera que se rompen tanto las interacciones hidrofóbicas como los puentes de hidrógeno. Ello reduce el potencial químico de las proteínas y la energía libre de desnaturalización (Wang, 1999).

De hecho, este resultado indicó que el SDS no es una buena opción para la estabilización del IFN α 2b hum-rec, al menos en las condiciones que se evaluaron en este trabajo.

Con los resultados precedentes, se pudo concluir que el EDTA Na₂ x 2H₂O tuvo un mayor impacto en la inhibición de la agregación del IFN α 2b hum-rec. Ello sugiere que los iones metálicos tienen cierta relevancia en la formación de agregados de esta molécula, quizás de manera indirecta, por oxidación de residuos aminoacídicos, como en el caso de la relaxina humana (Li y col., 1995).

Para corroborar esta hipótesis se evaluó el efecto de dos metales en la velocidad de la agregación de esta proteína. Adicionalmente, se comparó su efecto con el que produjeron el DTT y el GSH, dos compuestos que pueden acelerar la agregación de las proteínas mediante reacciones covalentes como el intercambio de puentes disulfuro (Wang, 1999; Rajesh y Chang, 2003, Reyes y col., 2005).

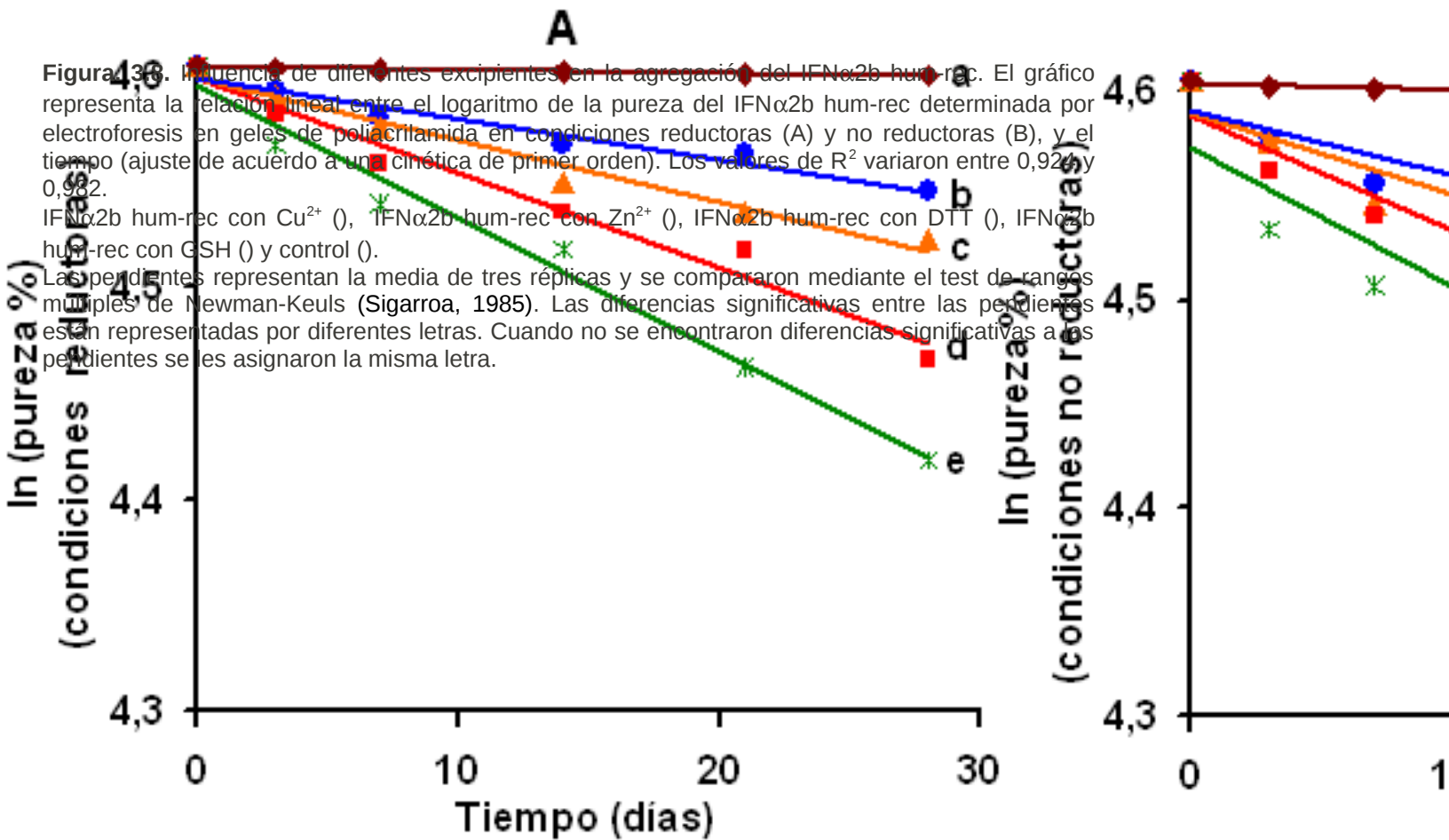
La adición de Cu²⁺ y Zn²⁺, GSH y DTT aumenta la velocidad de agregación del IFN α 2b hum-rec en solución

Cu²⁺ y Zn²⁺: estos dos metales incrementaron la velocidad de agregación del IFN α 2b hum-rec en una proporción mayor que el resto de los excipientes que se evaluaron. Los resultados primarios y el análisis cinético de este experimento (Tabla 3.5, Fig. 3.8) mostraron que estos compuestos incrementaron la velocidad de agregación del IFN α 2b hum-rec entre $3,4 \pm 0,15$ y $6,03 \pm 0,38$ veces, en comparación con el control (IFN α 2b hum-rec en solución tampón de citrato de sodio 50 mmol/L, pH 6, sin excipientes).

Estos resultados indican que la oxidación puede incrementar la velocidad de formación de agregados de IFN α 2b hum-rec.

En correspondencia con esto, otros autores han estudiado la oxidación de proteínas debido a la presencia de trazas de estos metales (Wang, 1999). La oxidación de esos residuos puede incrementar la probabilidad de agregación de estas biomoléculas. Específicamente, los residuos libres de cisteína pueden oxidarse fácilmente para formar enlaces disulfuro entre dos o más moléculas. Aún cuando la proteína no contenga residuos de cisteína libres, puede tener lugar el intercambio de puentes disulfuro lo que causa la agregación de la molécula (Wang, 1999).

Li y colaboradores estudiaron la agregación y la precipitación de la relaxina humana inducidas por reacciones catalizadas por metales (Li y col., 1995). Estos autores concluyeron que la oxidación de algunos aminoácidos puede estar indirectamente involucrada con la agregación de las proteínas. En particular, la relaxina humana se agrega tras la oxidación de los residuos de histidina y metionina (Li y col., 1995). Otros autores han reportado la



modificación como el intercambio de puentes disulfuro, las cuales pudieron incrementar la velocidad de agregación de la IL-2 hum-rec (Reyes y col., 2005).

No obstante, el incremento en la velocidad de agregación que produjeron el DTT y el GSH

Tabla 3.5. Parámetros cinéticos de la agregación del IFN α 2b hum-rec en presencia de otros excipientes.

Excipientes	SDS/PAGE ^a (en condiciones reductoras)	SDS/PAGE ^a (en condiciones no reductoras)
$k \times 10^3$ (días ⁻¹)	$6,21 \pm 0,26$	$6,77 \pm 0,22$
Zn ²⁺	$4,54 \pm 0,44$	$5,54 \pm 0,51$
DTT	$2,96 \pm 0,72$	$4,02 \pm 0,72$
GSH	$1,92 \pm 0,11$	$3,18 \pm 0,25$
Control	$1,03 \pm 0,05$	$1,63 \pm 0,08$

^aDeterminación de la pureza de la banda principal de IFN α 2b hum-rec.
Los resultados están expresadas como la media (n=3) \pm desviación estándar.

fue menor que el obtenido con el uso de metales. Ello parece indicar que a pesar de que el intercambio de puentes disulfuro puede acelerar la agregación del IFN α 2b hum-rec, las reacciones que son catalizadas por metales tienen un impacto mayor en esta vía de modificación. Debido a la capacidad de los iones metálicos para oxidar los residuos de cisteína, estas reacciones pueden incluir no sólo la oxidación de los residuos lábiles, sino además el intercambio de puentes disulfuro.

El empleo de diferentes excipientes afecta la pureza del IFN α 2b hum-rec

La evaluación cromatográfica (similar a Fig. 3.1) del efecto de diferentes excipientes en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec resultó necesaria para determinar cuán efectivos fueron estos compuestos en la inhibición de los productos de modificación que se detectaron.

Polisorbato 80: en este experimento, la incorporación del polisorbato 80 incrementó la estabilidad del IFN α 2b hum-rec 2b, a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, cuando se comparó con los resultados que se obtuvieron a partir de las muestras controles (Tabla 3.6, Fig 3.9).

Tabla 3.6. Parámetros cinéticos de la estabilidad térmica del IFN α 2b hum-rec en presencia de diferentes aditivos, según la técnica de RP-HPLC.

Condición	Concentración (mg/mL)	Pureza	Área ^a	k x 10 ³ (días ⁻¹)	k x 10 ³ (días ⁻¹)
¹)Polisorbato 800	$12,6 \pm 0,6$	$11,8 \pm 0,7$	Polisorbato 800	$22,2 \pm 0,18$	$2 \pm 1,4$
Polisorbato 800	$53,1 \pm 0,1$	$114,4 \pm 2,1$	EDTA Na ₂ x 2H ₂ O	$52,5 \pm 0,2$	$222,8 \pm 2,8$
EDTA Na ₂ x 2H ₂ O	$12 \pm 0,3$	$18,7 \pm 0,7$	EDTA Na ₂ x 2H ₂ O	$51,8 \pm 0,2$	$17,2 \pm 3,5$
PEG 400	$518,3 \pm 0,9$	$42,6 \pm 2,1$	PEG 400	$1028,1 \pm 2,0$	$55,5 \pm 2,8$
PEG 400	$2060,8 \pm 2,7$	$84,9 \pm 3,5$	Control-4	$0,328,8 \pm 2,1$	

^a: Determinación de la pureza o el área bajo la curva de la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificar, según la técnica de RP-HPLC.

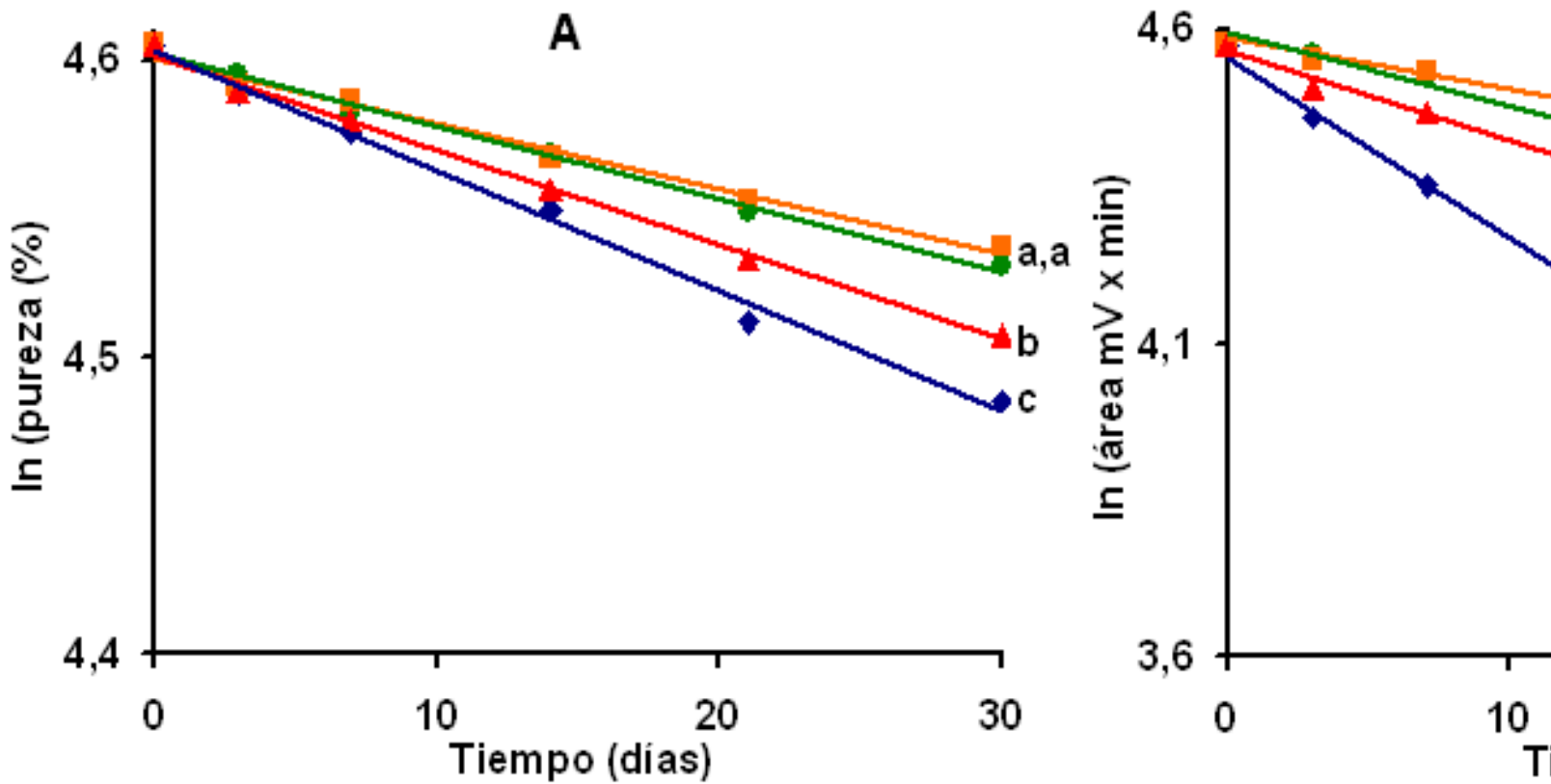
El IFN α 2b hum-rec se preparó a 3 MUI/mL en presencia de polisorbato 80, EDTA Na₂ x 2H₂O o PEG 400 a las concentraciones que se indican en la tabla. La solución se dispensó en bulbos 2R, se almacenó a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y se analizó por RP-HPLC.

Las constantes cinéticas se calcularon mediante la relación lineal entre el logaritmo de la pureza o el área bajo la curva de la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificar, según la técnica de la técnica de RP-HPLC, y el tiempo.

Los resultados están expresados como la media (n=3) \pm desviación estándar.

El impacto de este detergente en la estabilización del IFN α 2b hum-rec fue mayor cuando se emplearon las menores concentraciones del mismo (0,1-0,2 mg/mL). A estas concentraciones el polisorbato 80 incrementó la pureza y el área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificar entre $1,5 \pm 0,02$ y $3,5 \pm 0,05$ veces, en comparación con el control.

Los resultados mostraron además, que el polisorbato 80 al 0,5 mg/mL tuvo el menor impacto en la estabilización del ingrediente farmacéutico activo (Tabla 3.6, Fig. 3.9). Sin embargo, incluso a esta concentración, este detergente incrementó la pureza y el área bajo la curva de la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificar en $1,3 \pm 0,04$ y $2 \pm 0,07$ veces, respectivamente, en comparación con las muestras controles.

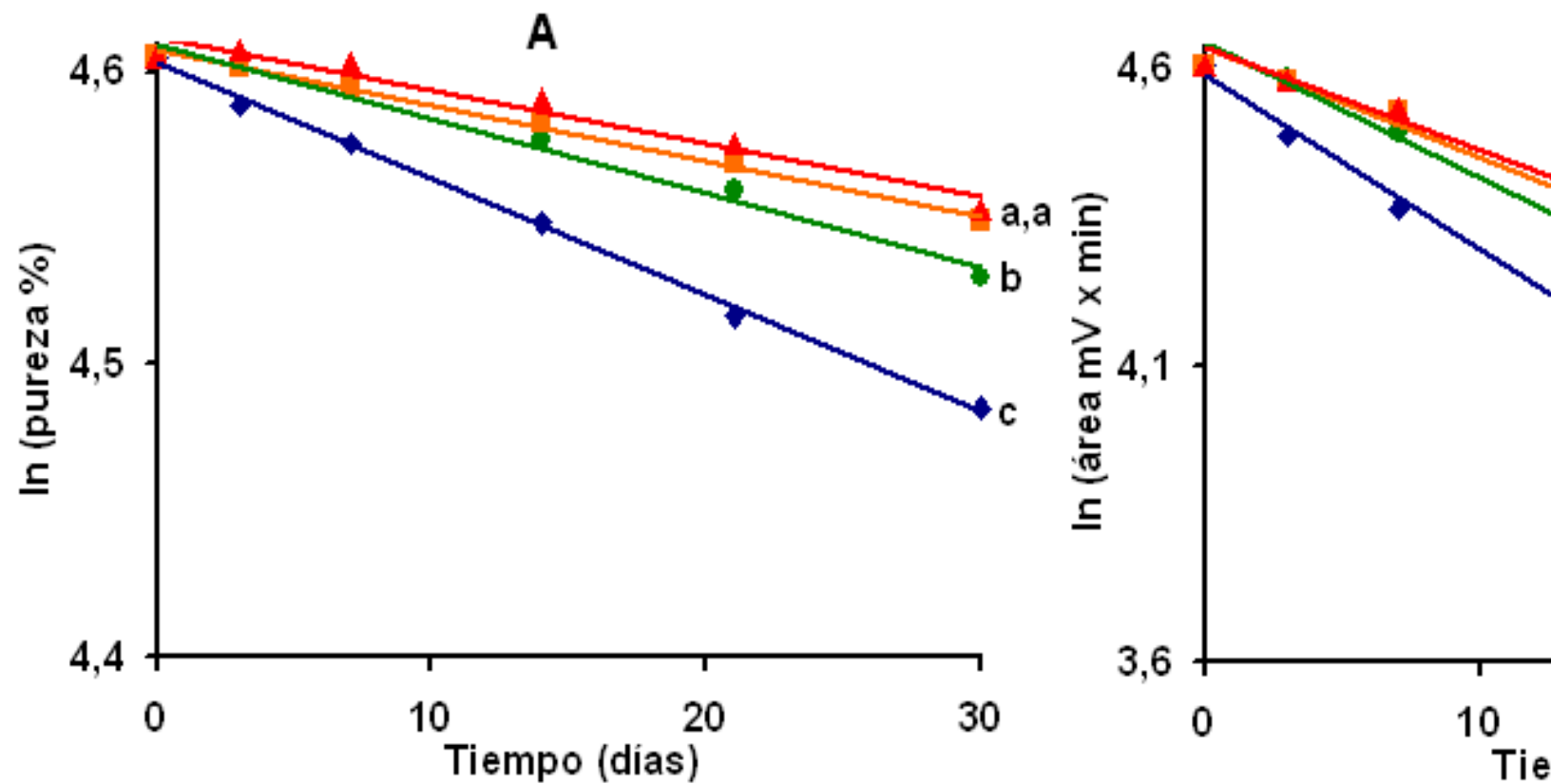


Se han descrito dos mecanismos que explican el efecto de los detergentes no iónicos como el polisorbato 80, en la estabilización de las proteínas. El primero de estos mecanismos se basa en la competencia con las proteínas por adsorberse a varias interfases (p. ej., aire-solución y vial-solución). De esta manera, pueden proteger contra la desnaturalización o la agregación en estas interfases. El segundo mecanismo involucra interacciones específicas con la superficie de las proteínas, donde cubren los sitios hidrofóbicos a través de los cuales puede favorecerse la agregación, o actuando como “chaperonas” para catalizar la renaturalización de proteínas que se han desnaturalizado parcialmente (Bam, 1998; Wang, 1999).

Muchas proteínas han sido estabilizadas con este detergente no iónico (Wang, 1999). Sin embargo, aunque el polisorbato 80 constituye un estabilizante de proteínas, parece evidente que este detergente puede contener peróxidos que aumentan la desestabilización de estas biomoléculas. Hora y colaboradores (1992) y Ha y colaboradores (2002), evaluaron la influencia de este detergente en la oxidación de la IL-2 (Hora y col., 1992; Ha y col., 2002). Estos resultados indicaron a medida que aumentaba la concentración de este excipiente

aumentaba la oxidación de la citoquina. Resultados similares mostraron Reyes y colaboradores con la misma proteína (Reyes y col., 2005). Estas evidencias, conjuntamente con los resultados precedentes, indicaron que el uso de concentraciones altas de polisorbato 80 puede resultar dañino para la estabilidad de las proteínas. Por ello se determinó que las mejores concentraciones para el desarrollo de una formulación líquida de IFN α 2b hum-rec eran 0,1 y 0,2 mg/mL.

EDTA Na₂ x 2H₂O: En este estudio, la inclusión del EDTA Na₂ x 2H₂O garantizó una protección contra la formación de los productos de modificación de esta citoquina (Tabla 3.6, Fig. 3.10).



Contrario a lo obtenido con el polisorbato 80, la estabilidad del IFN α 2b hum-rec aumentó con el incremento de la concentración de este compuesto. Los resultados indicaron que a la concentración de 5 mg/mL la velocidad de inestabilización del ingrediente farmacéutico activo disminuyó en $2,2 \pm 0,09$ y $1,7 \pm 0,04$ veces de acuerdo a la pureza y el área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificaciones, respectivamente.

En las condiciones experimentales que se evaluaron aquí, el efecto del EDTA $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ puede explicarse por la captura de iones metálicos presentes en la solución, los cuales pueden acelerar las reacciones de modificación del ingrediente activo y disminuir su estabilidad (Fransson y Hagman, 1996). Este efecto se incrementó con el aumento de la concentración de este aditivo, lo cual está en total acuerdo con este mecanismo.

Este agente quelante se ha usado para la estabilización de proteínas, incluido el IFN α 2b hum-rec (Allen y col., 1999, Yuen y Kline, 1999), básicamente por inhibición de las reacciones de oxidación debido a la captura de iones metálicos que pueden estar presentes en la solución.

PEG 400: A diferencia de los resultados que se obtuvieron con el polisorbato 80 y el EDTA $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, en presencia de este aditivo no se incrementó la estabilidad del IFN α 2b hum-rec (Fig. 3.11).

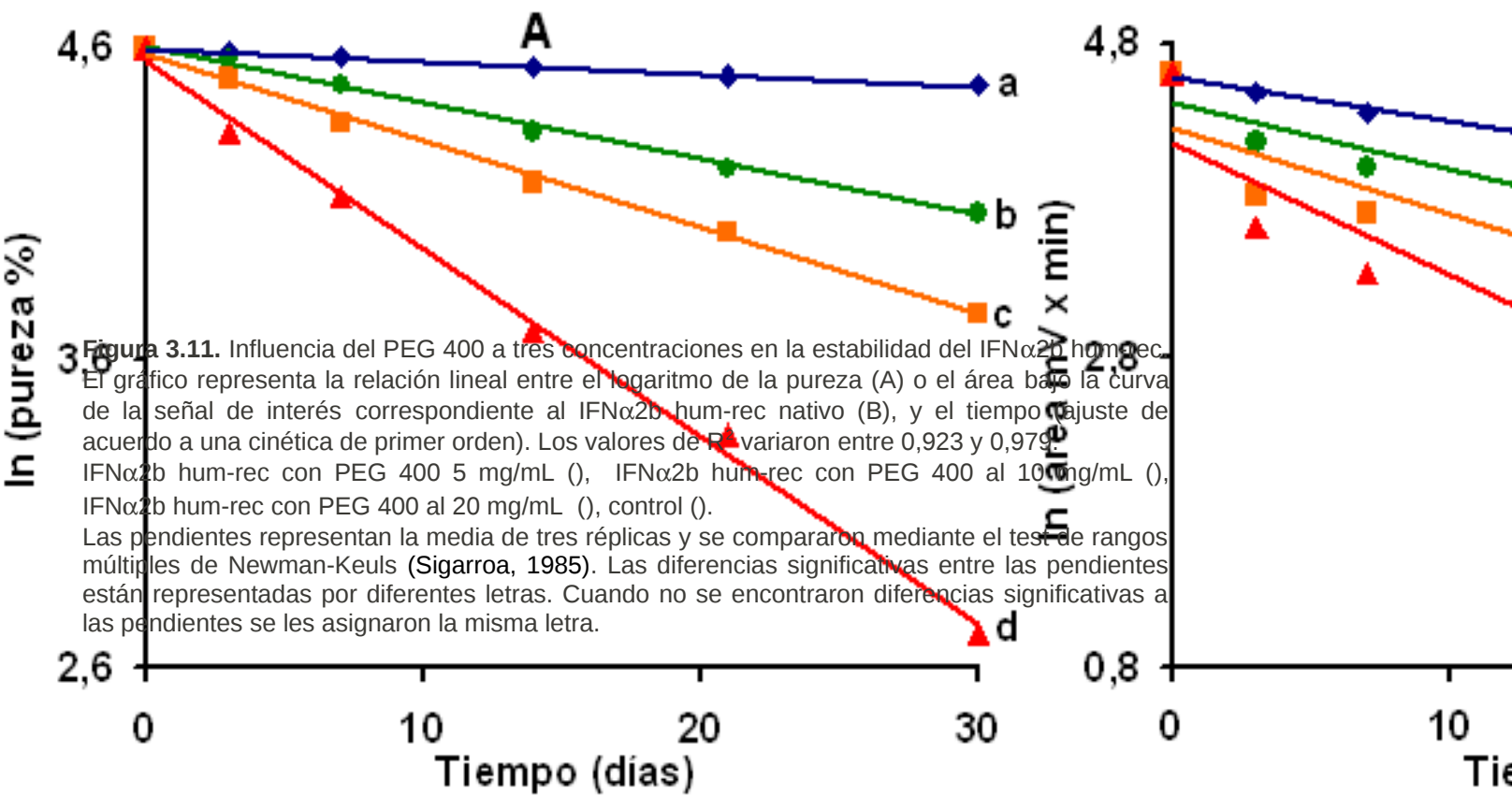


Figura 3.11. Influencia del PEG 400 a tres concentraciones en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec. El gráfico representa la relación lineal entre el logaritmo de la pureza (A) o el área bajo la curva de la señal de interés correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo (B), y el tiempo (ajuste de acuerdo a una cinética de primer orden). Los valores de R² variaron entre 0,923 y 0,979. IFN α 2b hum-rec con PEG 400 5 mg/mL (●), IFN α 2b hum-rec con PEG 400 al 10 mg/mL (■), IFN α 2b hum-rec con PEG 400 al 20 mg/mL (▲), control (◆). Las pendientes representan la media de tres réplicas y se compararon mediante el test de rangos múltiples de Newman-Keuls (Sigarroa, 1985). Las diferencias significativas entre las pendientes están representadas por diferentes letras. Cuando no se encontraron diferencias significativas a las pendientes se les asignaron la misma letra.

El IFN α 2b hum-rec se desestabilizó en presencia de este polímero mediante la formación de una señal correspondiente a una forma más hidrofílica y otras señales relacionadas con formas más hidrofóbicas que la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec nativo (Fig. 3.12).

De acuerdo a los resultados de este experimento, la velocidad de inestabilización de la proteína, por disminución de la pureza y del área bajo la señal correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificaciones fue de $1,5 \pm 0,07$ a $14,8 \pm 0,14$ veces mayores que los que se obtuvieron para el control de este experimento.

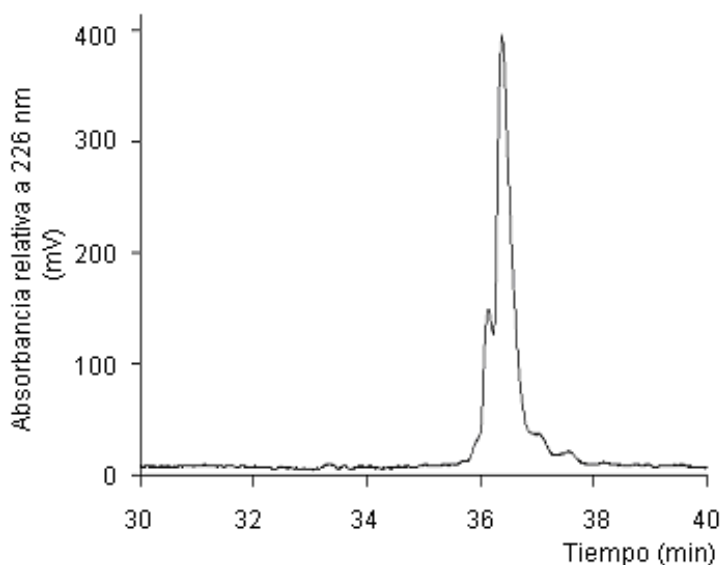


Figura 3.12: Influencia del PEG 400 a 5 mg/mL en el perfil cromatográfico del IFN α 2b hum-rec. Las muestras se almacenaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y se analizaron por RP-HPLC. El cromatograma corresponde a la evaluación después de 15 días de estudio.

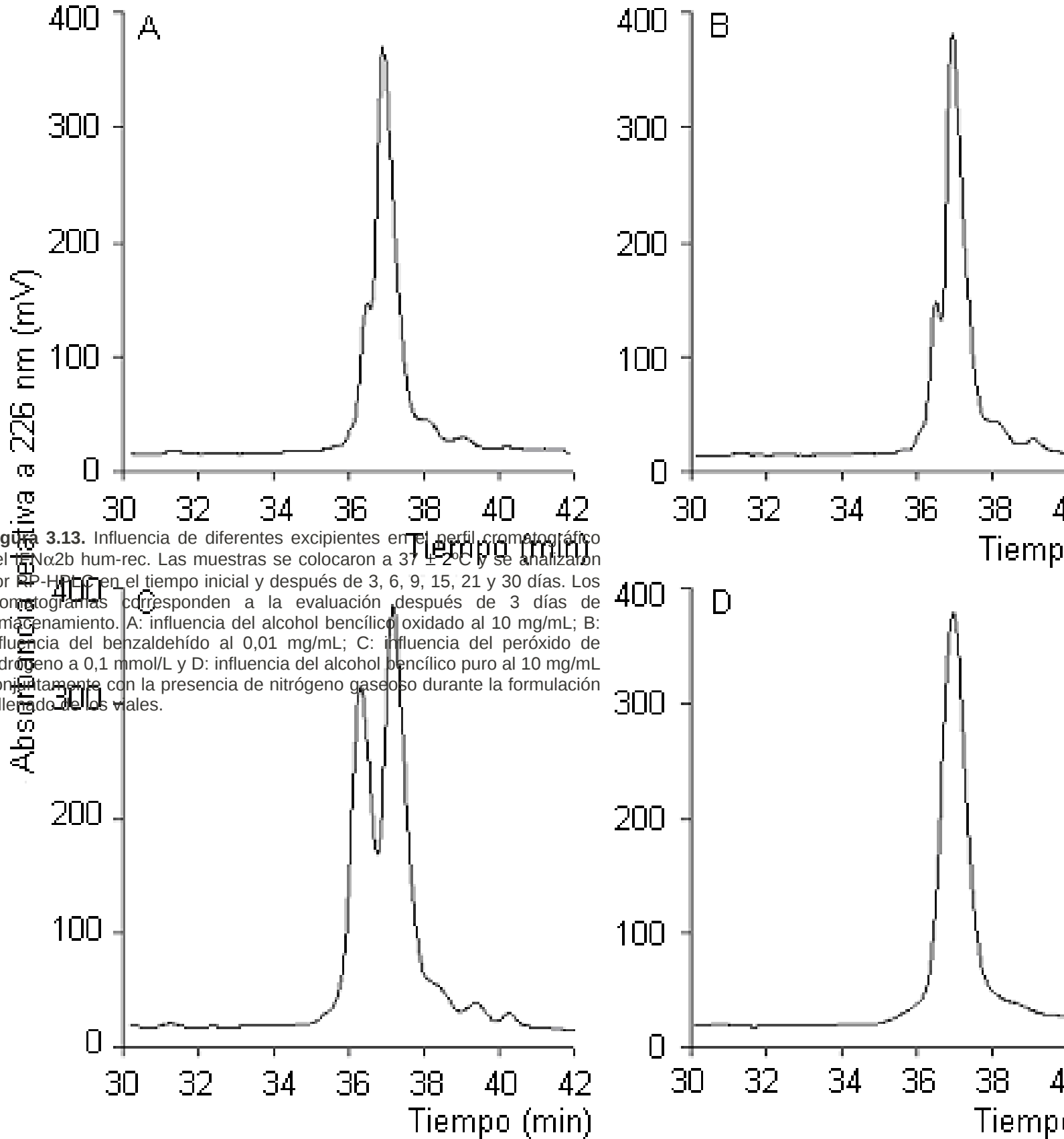
Este polímero se ha utilizado para estabilizar las proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferencial. De acuerdo a esto, el PEG 400 se excluye preferencialmente de la superficie de la proteína lo cual afecta la energía libre del sistema y contribuye al desplazamiento del equilibrio de las moléculas desnaturadas hacia las moléculas nativas (Arakawa y col., 1991; Carpenter y col., 1992).

Sin embargo, estos resultados indican que pudieron estar presentes otros factores, además de la simple presencia del PEG 400, en la solución de IFN α 2b hum-rec. Considerando la alta relación excipiente-IFN α 2b hum-rec utilizada, podríamos esperar que el polímero pudiera estar contaminado con trazas de peróxidos que a su vez podrían afectar la estabilidad de la proteína en solución. Johnson y Taylor estudiaron el efecto del PEG 400 en la oxidación del fenprostaleno (Johnson y Taylor, 1984). Ellos encontraron que la degradación de este medicamento estaba relacionada directamente con la autooxidación del PEG 400 en presencia de oxígeno, y determinaron la efectividad de varios antioxidantes en la inhibición de la velocidad de la degradación. Por su parte, Knepp y colaboradores encontraron que el PEG 400 indujo la pérdida total de la actividad del factor IX del plasma fraccionado así como su estado soluble (Knepp y col., 1998). También Sharma y

Kalonia reportaron un efecto desestabilizante del PEG 400 sobre una proteína. Estos autores demostraron que el IFN α 2a precipita en presencia de ciertas concentraciones de este polímero (Sharma y Kalonia, 2004).

Debido a estos resultados, se descartó el uso del PEG 400 para el desarrollo futuro de una formulación líquida con IFN α 2b hum-rec como ingrediente farmacéutico activo.

Alcohol bencílico: En este trabajo se encontró que algunos lotes de este excipiente produjeron un efecto adverso en la estabilidad del IFN α 2b hum-rec y causaron la formación



de una especie más hidrofílica que la especie correspondiente al IFN α 2b hum-rec sin modificaciones (Fig. 3.13A).

El benzaldehído, principal contaminante del alcohol bencílico, provocó el mismo efecto en el perfil cromatográfico de esta citoquina (Fig. 3.13B). El origen oxidativo de la especie más hidrofílica se comprobó mediante la incubación con H₂O₂. Este agente oxidante provocó el mismo cambio en el perfil cromatográfico (Fig. 3.13C). Además, el TR de esta especie coincidió con el TR de la especie más hidrofílica que apareció tras el uso del PEG 400 (Fig. 3.12). De esta manera, este experimento constituyó una confirmación de que la oxidación es la causa de la formación de la especie más hidrofílica que se obtuvo en estudios precedentes.

La concentración del alcohol bencílico tuvo una influencia notable en las características organolépticas y en la efectividad del preservativo. Por una parte, las muestras a 5 y 10 mg/mL se disolvieron totalmente y se mantuvieron incoloras y transparentes. Sin embargo, cuando la concentración aumentó al 20 mg/mL, el alcohol bencílico presentó una pobre disolución y la muestra se comportó como una emulsión que se separó en dos fases cuando se eliminó la agitación manual. Este comportamiento puede estar asociado a la alta concentración de sales en las muestras (solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L) lo cual puede comprometer la solubilidad de excipientes poco solubles en agua, como es el caso del alcohol bencílico (Mbah, 2005).

Por el contrario, las soluciones de este preservativo a las mayores concentraciones fueron efectivas en la inhibición del crecimiento de los microorganismos que se evaluaron mientras que a la menor concentración (5 mg/mL) esta efectividad disminuyó (Tabla 3.7).

Este agente preservante se ha utilizado en formulaciones con proteínas como la EPO (St Peter y col., 1998), un anticuerpo monoclonal humanizado (Gupta y Kaisheva, 2003) y la

Tabla 3.7. Resultados del test de efectividad de preservativo para el alcohol bencílico y la mezcla de parabenos.

	Preservot
(días)	C. albicans ATCC 10231 Ps. aeruginosa ATCC 9027A. niger ATCC 1640E. coli ATCC 8739 St. aureus ATCC 6538 Alcohol bencílico
(5 mg/mL)	01,1 x 10 ⁶ ufc 1,1 x 10 ⁶ ufc 1,4 x 10 ⁶ ufc 1,9 x 10 ⁶ ufc 1,9 x 10 ⁶ ufc 282,6 x 10 ⁴ ufc 1,1 x 10 ⁵ ufc 1,6 x 10 ⁴ ufc 1,1 x 10 ⁶ ufc 1,3 x 10 ⁵ ufc Alcohol bencílico
(10 mg/mL)	02,1 x 10 ⁷ ufc 1,0 x 10 ⁷ ufc 1,1 x 10 ⁶ ufc 4,4 x 10 ⁶ ufc 2,9 x 10 ⁶ ufc 28 < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc Alcohol bencílico
(20 mg/mL)	01,1 x 10 ⁶ ufc 1,1 x 10 ⁶ ufc 1,3 x 10 ⁶ ufc 2,6 x 10 ⁶ ufc 1,6 x 10 ⁶ ufc 28 < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc Parabenos
(0,06/0,003 mg/mL)	02,1 x 10 ⁷ ufc 9,1 x 10 ⁶ ufc 1,1 x 10 ⁶ ufc 6,7 x 10 ⁶ ufc 2,9 x 10 ⁶ ufc 281,4 x 10 ⁵ ufc 1,1 x 10 ⁶ ufc 1,9 x 10 ⁵ ufc 1,1 x 10 ⁶ ufc 1,9 x 10 ⁶ ufc Parabenos
(0,12/0,012 mg/mL)	01,2 x 10 ⁶ ufc 1,3 x 10 ⁶ ufc 1,2 x 10 ⁶ ufc 1,4 x 10 ⁶ ufc 1,7 x 10 ⁶ ufc 28 < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc Parabenos
(0,2/0,02 mg/mL)	01,9 x 10 ⁷ ufc 1,1 x 10 ⁷ ufc 1,1 x 10 ⁶ ufc 8,5 x 10 ⁶ ufc 2,1 x 10 ⁶ ufc 28 < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc < 1 ufc Parabenos
t: tiempo.	ufc < 1 ufc < 1 ufc

ufc: unidades formadoras de colonias.

Sólo se tabulan los resultados correspondientes al tiempo inicial y al día 28 del ensayo.

hGH (Kappelgaard y col., 2004), debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, pero nunca a concentraciones inferiores a 9 mg/mL.

La Farmacopea Británica establece que el alcohol bencílico que se utiliza para la producción de formas farmacéuticas parenterales debe contener menos del 5 mg/mL de benzaldehído (British Pharmacopoeia, 1998).

En este trabajo se observó la modificación del IFN α 2b hum-rec incluso a muy bajas concentraciones de benzaldehído (0,01 mg/mL) (Fig. 3.13B). Por ello, resultó evidente que un punto crítico en el desarrollo de una formulación líquida de IFN α 2b hum-rec era el uso de del alcohol bencílico puro, de manera que se obtuviera un perfil cromatográfico como el de la Fig. 3.13D. Por ello se consideró que el alcohol bencílico puro, a una concentración del 10 mg/mL, podía constituir un componente de la formulación.

Metil y propil parabenos: A diferencia de lo que se observó para el alcohol bencílico en estado oxidado, los parabenos no mostraron ningún efecto desestabilizante en el IFN α 2b hum-rec, en ninguna de las concentraciones que se evaluaron. Sin embargo, en presencia de estos excipientes el perfil cromatográfico estuvo caracterizado por dos picos, adicionales

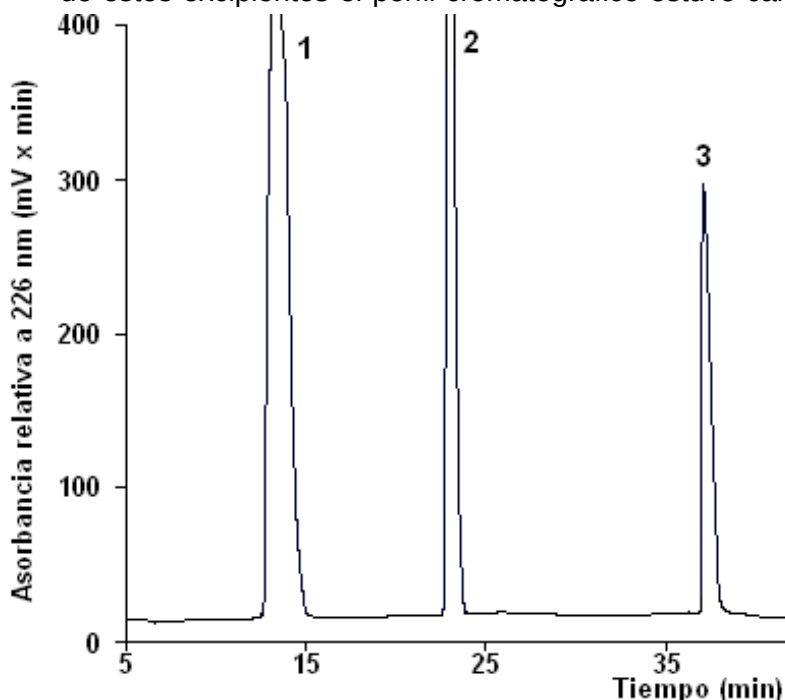


Figura 3.14: Influencia de la mezcla de metil/propil parabenos en el perfil cromatográfico del IFN α 2b hum-rec. Las muestras se colocaron a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y se analizaron por RP-HPLC en el tiempo inicial y después de 3, 6, 9, 15, 21 y 30 días. El cromatograma corresponde a la evaluación de la influencia de la mezcla de preservos a una concentración de 0,12/0,012 mg/mL, respectivamente, después de tres días de almacenamiento.

Los picos corresponden a: 1) metil parabeno; 2) propil parabeno; 3) IFN α 2b hum-rec.

al correspondiente al IFN α 2b hum-rec (Fig. 3.14).

Al igual que en el caso del alcohol bencílico, la concentración de estos excipientes tuvo una influencia notable en las características organolépticas y en la efectividad que mostraron para inhibir el crecimiento microbiano. Por una parte las menores concentraciones (0,06/0,003 mg/mL, 0,12/0,012 mg/mL, de metil y propil parabenos, respectivamente) se disolvieron totalmente en la solución. Estas soluciones se mantuvieron incoloras y

transparentes. Sin embargo, a las mayores concentraciones (0,2/0,02 mg/mL de metil y propil parabenos, respectivamente), estos excipientes no se disolvieron totalmente y se observó un precipitado blanco en estas soluciones. Por otra parte, la mezcla de estos preservos a las mayores concentraciones fue efectiva en la inhibición del crecimiento de los microorganismos. Pero a la menor concentración (0,06/0,003 mg/mL) esta efectividad disminuyó (Tabla 3.7).

Los parabenos pertenecen a la clase de los ésteres del ácido benzoico y han tenido un amplio uso en preparaciones inyectables, oftálmicas, tópicas y orales (Martindale, 1996).

Tabla 4.8. Parámetros cinéticos de la estabilidad del rhIFN- α 2b hum-rec, en condiciones de estrés, a cuatro concentraciones diferentes.

Concentración	$k \times 10^{-3} (\text{día}^{-1})$
	Actividad Biológica
1 MUI/mL	16,54 \pm 1,44
10 MUI/mL	14,55 \pm 1,15
50 MUI/mL	11,61 \pm 0,98
100 MUI/mL	9,23 \pm 1,25

	Pureza (RP-HPLC)
	1 MUI/mL
10 MUI/mL	3,35 \pm 0,19
50 MUI/mL	4,16 \pm 0,22
100 MUI/mL	4,63 \pm 0,15

	Pureza (SDS/PAGE)
	10 MUI/mL
50 MUI/mL	1,13 \pm 0,01
100 MUI/mL	1,64 \pm 0,02

^a: Determinación de la pureza del pico de IFN α 2b hum-rec sin modificar, según la según la técnica de RP-HPLC.

^b: Determinación de la pureza de la banda principal de IFN α 2b hum-rec.

El IFN α 2b hum-rec se preparó a 1, 10, 50 y 100 MUI/mL, se dispensó en bulbos 2R, se almacenó a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y se analizó por determinación de la actividad biológica, RP-HPLC y SDS/PAGE en condiciones reductoras.

Las constantes cinéticas se calcularon mediante la relación lineal entre el logaritmo de la actividad biológica o la pureza, y el tiempo.

Los resultados están expresados como la media ($n=3$) \pm desviación estándar.

Estos excipientes se utilizan en combinación lo que puede incrementar su efecto antimicrobiano (Hart, 1984).

Teniendo en cuenta los resultados de este experimento se consideró que la mezcla de metil y propil parabenos a una concentración de 0,12/0,012 mg/mL, respectivamente, podía constituir un componente de la formulación.

La concentración de proteínas afecta la estabilidad del IFN α 2b hum-rec en solución

La concentración constituye un factor muy estudiado en relación con la estabilidad de las proteínas.

En este estudio la actividad biológica del ingrediente activo disminuyó en todas las concentraciones evaluadas, probablemente debido a la temperatura de almacenamiento ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) (Tabla 3.8, Fig. 3.15). Sin embargo, se encontró que en las mayores concentraciones de IFN α 2b hum-rec (50 y 100 MUI/mL) la actividad biológica disminuyó más lentamente que en las menores concentraciones de esta citoquina (1 y 10 MUI/mL) (Fig. 3.15).

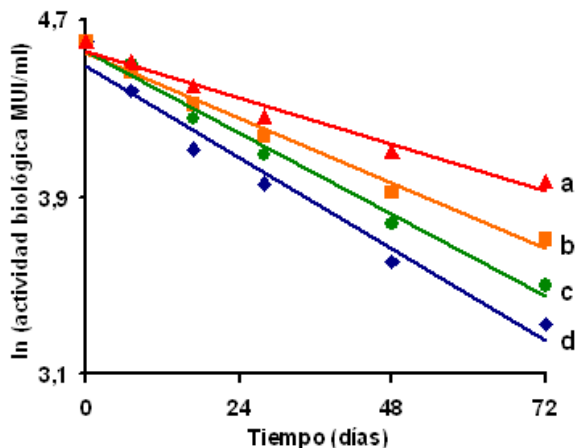


Figura 3.15. Influencia de la concentración de proteínas en la actividad biológica del IFN α 2b hum-rec. El gráfico representa la relación lineal entre el logaritmo de la actividad biológica y el tiempo (ajuste de acuerdo a una cinética de primer orden). Los valores de R^2 variaron entre 0,974 y 0,987.

IFN α 2b hum-rec a 1 MUI/mL (\blacklozenge), IFN α 2b hum-rec a 10 MUI/mL (\bullet), IFN α 2b hum-rec a 50 MUI/mL (\blacksquare), IFN α 2b hum-rec a 100 MUI/mL (\blacktriangle).

Las pendientes representan la media de tres réplicas y se compararon mediante el test de rangos múltiples de Newman-Keuls (Sigarra, 1985). Las diferencias significativas entre las pendientes están representadas por diferentes letras.

Los resultados mostraron que las muestras a 10, 50 y 100 MUI/mL incrementaron la actividad biológica del IFN α 2b hum-rec en $1,34 \pm 0,08$, $1,42 \pm 0,04$ y $1,79 \pm 0,06$ veces, respectivamente, en comparación con las muestras que se prepararon a 1 MUI/mL (Tabla 3.8, Fig. 3.15).

De acuerdo a estos resultados, el uso del IFN α 2b hum-rec a altas concentraciones resulta conveniente para mantener la actividad biológica de esta citoquina en formulaciones líquidas.

La pureza fue otro de los parámetros que se evaluaron en este experimento. En análisis por RP-HPLC mostró un perfil similar al de la Figura 3.1. Por su parte, el perfil electroforético se caracterizó por la formación de dímeros y monómeros, de manera similar al resultado que muestran

las Figuras 3.5 y 3.6. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido para la determinación de la actividad biológica, las altas concentraciones del ingrediente activo (50 y 100 MUI/mL) contribuyeron a la disminución de la pureza del IFN α 2b hum-rec en una mayor proporción que las muestras a las menores concentraciones (1 y 10 MUI/mL) (Tabla 3.8, Figs. 3.16, 3.17).

De acuerdo a estos resultados, el IFN α 2b hum-rec a 10, 50 y 100 MUI/mL disminuyó la pureza de la citoquina según la técnica de RP-HPLC, en $1,03 \pm 0,04$, $1,28 \pm 0,09$ y $1,44 \pm 0,11$ veces, respectivamente, en comparación con las muestras a 1 MUI/mL (Fig. 3.16).

Por otra parte, la proteína a una concentración de 50 y 100 MUI/mL disminuyó su pureza según la técnica de SDS/PAGE entre $1,59 \pm 0,14$ y $2,30 \pm 0,11$ veces, en comparación con las muestras a 10 MUI/mL (Fig. 3.17, Tabla 3.8).

Las muestras de IFN α 2b hum-rec a 1 MUI/mL no se analizaron por SDS/PAGE debido a la baja concentración de la proteína.

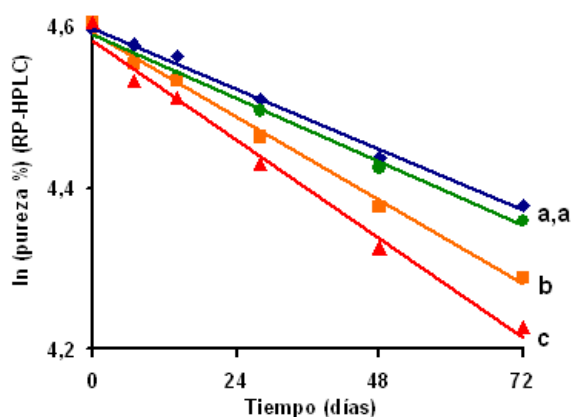


Figura 3.16. Influencia de la concentración de proteínas en la estabilidad físico-química del IFN α 2b hum-rec. El gráfico representa la relación lineal entre el logaritmo de la pureza según la técnica de RP-HPLC, y el tiempo (ajuste de acuerdo a una cinética de primer orden). Los valores de R^2 variaron entre 0,977 y 0,997.

IFN α 2b hum-rec a 1 MUI/mL (◆), IFN α 2b hum-rec a 10 MUI/mL (●), IFN α 2b hum-rec a 50 MUI/mL (■), IFN α 2b hum-rec a 100 MUI/mL (▲).

Las pendientes representan la media de tres réplicas y se compararon mediante el test de rangos múltiples de Newman-Keuls (Sigarroat, 1985). Las diferencias significativas entre las pendientes están representadas por diferentes letras.

Teniendo en cuenta estos resultados, el uso del IFN α 2b hum-rec a bajas concentraciones resulta conveniente para mantener la pureza de esta citoquina en formulaciones líquidas. Sin embargo, haciendo un balance general del experimento, las concentraciones medias del IFN α 2b hum-rec (p. ej., 10 MUI/mL) puede incrementar la estabilidad física, química y biológica de la molécula en formas farmacéuticas líquidas.

El efecto de la concentración en la actividad biológica de las proteínas se ha estudiado por otros autores (Lecker y Khan, 1996; Wang, 1999). Lecker y Khan lograron incrementar la actividad de la enzima α amilasa mediante el incremento en su concentración (Lecker y Khan, 1996).

También Carpenter y colaboradores estudiaron el efecto de la concentración de proteínas en la enzima lactato deshidrogenasa y encontraron que un aumento en su concentración la hace más resistente a la pérdida de la actividad tras la congelación (Carpenter y col., 1992). El consenso general es que las concentraciones altas contribuyen a mantener la actividad biológica de estas macromoléculas (Wang, 1999). La explicación de este fenómeno se basa en *i*) la inhibición de la desnaturalización por repulsiones estéricas de las moléculas vecinas (Allison y col., 1996), y en *ii*) los cambios en la conformación monomérica de la proteína hacia dímeros y multímeros más estables que retienen la actividad biológica con más efectividad (Mozhaev y Martinek, 1984).

La influencia de este parámetro en la pureza de las proteínas también se ha abordado en la literatura (Wang, 1999). Se ha sugerido que concentraciones mayores de 0,02 mg/mL contribuyen a la agregación de estas biomoléculas (Wang, 1999). Este fenómeno se ha encontrado en proteínas como la IL-1 β (Gu y col., 1991), la apomiogloblina (Wang, 1999), la β lactoglobulina (Wang, 1999) y el factor de crecimiento de fibroblastos en su forma ácida

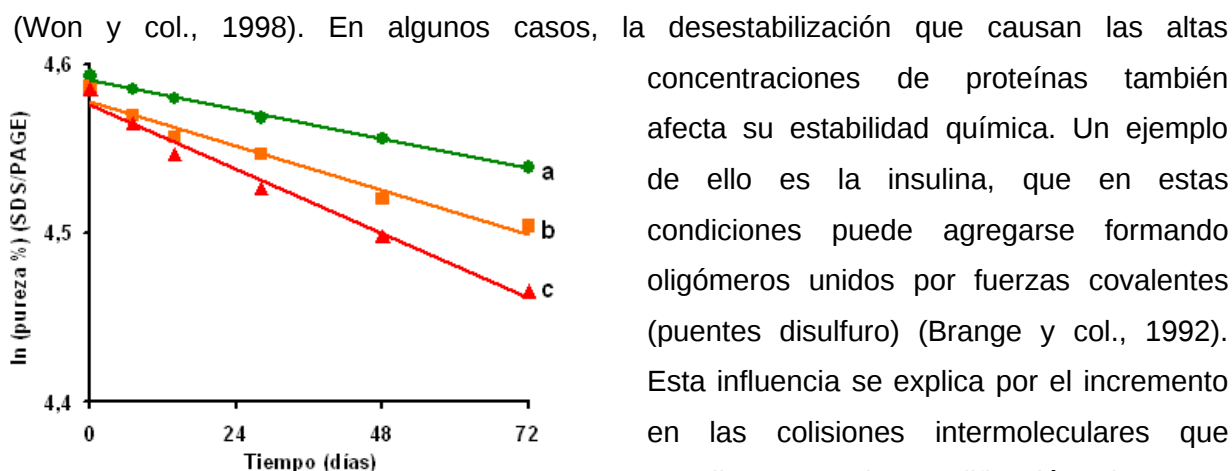


Figura 3.17. Influencia de la concentración de proteínas en la pureza del IFN α 2b hum-rec según la técnica de SDS/PAGE. El gráfico representa la relación lineal entre el logaritmo de la pureza del IFN α 2b hum-rec determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, y el tiempo (ajuste de acuerdo a una cinética de primer orden). Los valores de R^2 variaron entre 0,915 y 0,992.

IFN α 2b hum-rec a 1 MUI/mL (◆), IFN α 2b hum-rec a 10 MUI/mL (●), IFN α 2b hum-rec a 50 MUI/mL (■), IFN α 2b hum-rec a 100 MUI/mL (▲).

Las pendientes representan la media de tres réplicas y se compararon mediante el test de rangos múltiples de Newman-Keuls (Sigarroat, 1985). Las diferencias significativas entre las pendientes están representadas por diferentes letras.

De acuerdo a estos resultados, la concentración recomendable para el desarrollo de una formulación líquida de IFN α 2b hum-rec podría ser de 10 MUI/mL.

A esta concentración, la citoquina mostró un comportamiento que garantizó un incremento en su estabilidad física, química y biológica, a diferencia de las concentraciones menores (1 MUI/mL) o mayores (50 y 100 MUI/mL).

Definición de dos formulaciones líquidas

de IFN α 2b hum-rec

En algunos casos se requieren múltiples excipientes para lograr el diseño eficaz de una formulación líquida con proteínas como ingredientes activos. El tipo y la concentración de estos excipientes pueden afectar la estabilidad de las proteínas (Wang y col., 1999).

Estos excipientes incluyen soluciones tampones, estabilizantes, modificadores de la osmolalidad y preservos (Wang y col., 1999).

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron durante la etapa de preformulación, se diseñaron dos formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec compuestas por i) IFN α 2b hum-rec a 10 MUI/mL, solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 7,4, alcohol bencílico a 10 mg/mL, polisorbato 80 a 0,2 mg/mL y cloruro de sodio a 4,9 mg/mL, y por ii) IFN α 2b hum-rec a 10 MUI/mL, solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 7,4, metil parabeno a

1,2 mg/mL, propil parabeno a 0,12 mg/mL, polisorbato 80 a 0,1 mg/mL, EDTA Na₂ x 2H₂O a 1 mg/mL y cloruro de sodio a 4,9 mg/mL (Tabla 3.9).

Además, y dada la importancia del uso del nitrógeno gaseoso durante la preparación de la formulación y su distribución en viales 2R, se decidió usar un alcohol bencílico con más de un 99 % de pureza y emplear la nitrogenación como paso imprescindible durante los procesos de preparación y llenado de la formulación que contenía este preservo.

Tabla 3.9. Composición de las formulaciones que se diseñaron en este trabajo, en comparación con la formulación de INTRON A.

Componentes	Formulación I	Formulación II	INTRON	IFN α 2b hum-rec	10 MUI/mL	10 MUI/mL	6 ó 10 MUI/mL
Alcohol bencílico	10 mg/mL	--	Polisorbato 800	2 mg/mL	0,1 mg/mL	0,1 mg/mL	Fosfato de sodio monobásico di-hidratado
	3,43 mg/mL	3,43 mg/mL	Fosfato de sodio dibásico anhidro	12,68 mg/mL	12,68 mg/mL	1,8 mg/mL	Fosfato de sodio monobásico mono-hidratado
	--	--	Cloruro de sodio	4,67 mg/mL	4,67 mg/mL	7,5 mg/mL	Acido etilendiaminotetraacético sal disódica dihidratado
	1 mg/mL	1 mg/mL	Metil parabeno	1,2 mg/mL	1,2 mg/mL	0,12 mg/mL	m-cresol
	--	--					1,5 mg/mL

Formulación I: Formulación con alcohol bencílico como preservo desarrollada en este trabajo.

Formulación II: Formulación con parabenos como preservos desarrollada en este trabajo.

INTRON: Formulación de INTRON A, de la compañía Schering Plough (Los datos de la composición de INTRON A se tomaron de Yuen y Kline, 1999).

Estudios de estabilidad

Las nuevas formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec permanecen estables durante 2 meses en condiciones aceleradas de almacenamiento

La evaluación de la estabilidad acelerada ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) de las formulaciones de IFN α 2b hum-rec, mostró que estas preparaciones se mantuvieron estables durante 2 meses en estas condiciones de almacenamiento (Tablas 3.10, 3.11). Durante ese tiempo la actividad biológica varió entre el 64 y el 156 % de valor nominal, según lo descrito previamente por Ferrero y colaboradores, (1994). Esto coincide con valores que oscilan entre 6,4 y 15,6 MUI/mL, dada la concentración de IFN α 2b hum-rec (10 MUI/mL)

Usualmente los métodos de determinación de la actividad biológica (ensayos biológicos) presentan gran variabilidad. De ahí que los límites establecidos para este producto oscilen entre el 64 y el 156 % de valor nominal. Ello se debe al número de factores relacionados con el sistema establecido y con la manipulación de las muestras que intervienen en la determinación. Por ello la mayoría de las farmacopeas han establecido límites amplios para este parámetro (USP 26, British Pharmacopoeia, 1998).

Tabla 3.10. Estabilidad acelerada de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec que contiene metil y propil parabenos como preservos.

Meses	Actividad Biológica (x 10 ⁶ UI/mL)			RP-HPLC (pureza en %)			ELISA (concentración en μ g/mL)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
0	8,54	9,17	10,75	96,59	98,42	98,13	59,48	56,47	57,49
1	9,18	9,66	9,49	95,75	97,18	97,55	57,51	55,39	54,94
2	10,77	9,14	10,28	95,18	96,29	95,03	56,97	56,24	56,48
3	9,79	9,21	9,37	93,61	92,42	94,15	58,64	57,48	55,79
6	9,94	9,18	9,89	71,84	83,85	71,93	56,74	55,68	54,94

La formulación se envasó en bulbos 2R. Las muestras se almacenaron a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se analizaron en la Dirección de Calidad del CIGB mediante las siguientes técnicas analíticas: titulación antiviral, (actividad biológica), RP-HPLC, ELISA y la determinación de pirógenos, inocuidad, pH, características organolépticas, esterilidad, volumen y contenido de polisorbato 80.

Tabla 3.11. Estabilidad acelerada de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec que contiene alcohol bencílico como preservos.

Meses	Actividad Biológica (x 10 ⁶ UI/mL)			RP-HPLC (pureza en %)			ELISA (concentración en μ g/mL)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
0	10,83	9,81	10,42	98,43	98,52	98,26	62,48	65,72	60,75
1	10,57	10,81	9,23	96,89	96,37	96,07	60,58	66,91	59,77
2	9,43	9,72	10,15	95,02	95,45	95,03	62,71	63,77	52,75
3	11,35	11,34	11,94	91,56	92,58	92,36	59,47	68,77	60,48
6	9,41	9,82	9,86	83,09	83,80	83,08	65,78	65,78	58,17

La formulación se envasó en bulbos 2R. Las muestras se almacenaron a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se analizaron en la Dirección de Calidad del CIGB mediante las siguientes técnicas analíticas: titulación antiviral, (actividad biológica), RP-HPLC, ELISA y la determinación de pirógenos, inocuidad, pH, características organolépticas, esterilidad, volumen y contenido de polisorbato 80 y alcohol bencílico.

Por otra parte, la pureza (RP-HPLC) se mantuvo por encima del 95 %. Además, las formulaciones permanecieron apirogénicas, atóxicas, estériles y con las características organolépticas adecuadas para este tipo de preparado (incolora, transparente y sin partículas en suspensión). El pH se mantuvo entre 7,2 y 7,6 y el ingrediente farmacéutico activo se identificó y cuantificó por ELISA en todos los puntos de control del estudio (Tablas 3.10, 3.11).

De acuerdo a estos datos, estas formulaciones son robustas contra pérdidas potenciales de estabilidad, debido a eventos inesperados como fallos cortos en la cadena de frío, durante el almacenamiento o la transportación del producto.

El estudio de estabilidad en condiciones aceleradas de almacenamiento permitió conocer el periodo durante el cual estas formulaciones mantuvieron sus principales parámetros dentro de los límites que establecen algunas agencias regulatorias como la OMS, la ICH y la EMEA (WHO, 1988, 1992; ICH, 1999; EMEA, 2002).

La estabilidad de estas formulaciones puede explicarse por la propia composición de las mismas. Por una parte, una de las formulaciones contenía alcohol bencílico, polisorbato 80 y cloruro de sodio en solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 7,4. La solución tampón de fosfato de sodio se utilizó para mantener el pH estable dentro de la formulación. La función del alcohol bencílico fue preservar la formulación de posibles contaminaciones microbianas. El papel del polisorbato 80 fue proteger el ingrediente activo contra posibles inestabilidades. Por último, el cloruro de sodio se utilizó como agente isotonzante, para obtener una osmolalidad en la formulación similar a la de los fluidos corporales. Los resultados de este estudio indicaron que estos excipientes fueron efectivos para la estabilización del IFN α 2b hum-rec durante un tiempo que permite la toma de decisiones en caso de eventos imprevistos como los fallos en la cadena de frío.

Por otra parte, la segunda formulación estuvo compuesta por metil y propil parabenos, EDTA Na₂ x 2H₂O, polisorbato 80 y cloruro de sodio en solución tampón de fosfato de sodio 100 mmol/L, pH 7,4. El papel de los fosfatos se enmarcó en la manutención de un pH estable y adecuado para la estabilidad del ingrediente activo. La función de los parabenos, al igual que el alcohol bencílico, fue preservar la esterilidad de la formulación. Se ha reportado que la acción de estos excipientes se potencia con la presencia del EDTA (Hart, 1984). El polisorbato 80 y el EDTA Na₂ x 2H₂O, por su parte, debían estabilizar el IFN α 2b hum-rec en el medio acuoso. Finalmente, el cloruro de sodio se empleó como agente isotonzante. Esta formulación, al igual que la anterior, demostró gran robustez ante condiciones adversas que no pueden prevenirse durante el almaceamiento o la transportación.

La compañía Schering Plough también ha desarrollado una formulación líquida con el IFN α 2b hum-rec como ingrediente activo (Yuen y Kline, 1999). A pesar de ello, aún se comercializan formas farmacéuticas liofilizadas de esta citoquina, con ASH como estabilizante (Gross y col., 1998) lo cual aumenta considerablemente su estabilidad. Sin embargo, la liofilización es un proceso caro (por concepto de equipamiento y sistemas

auxiliares), limita la producción a la capacidad del equipamiento y puede generar rechazos de producto cuando sus características organolépticas no son adecuadas (p. ej., mala calidad de la pastilla). Por otra parte, el producto requiere de una mayor manipulación (reconstitución en agua para inyección) previo a la aplicación al paciente (Wang, 1999).

El uso de la ASH en estas formulaciones también constituye un problema ya que implica riesgos potenciales como la transmisión de virus u otros patógenos provenientes de la sangre, y la formación de agregados ASH-fármaco que pueden aumentar la inmunogenicidad del principio activo. Este último inconveniente puede favorecer la generación de anticuerpos que podrían disminuir el efecto terapéutico del ingrediente activo (Gross y col., 1998).

Las nuevas formulaciones líquidas desarrolladas en este trabajo eliminan ambos inconvenientes.

En comparación con las formulaciones patentadas por la compañía Schering Plough, las nuevas formulaciones líquidas desarrolladas en este trabajo tienen una estabilidad superior cuando se almacenan a altas temperaturas. En condiciones aceleradas, Yuen y Kline evaluaron la estabilidad de sus formulaciones a 25 ± 2 y $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (Yuen y Kline, 1999) (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Comparación de la pureza en condiciones aceleradas, de las formulaciones que se diseñaron en este trabajo, en comparación con la formulación de INTRON A.

Meses		INTRON a	
$25 \pm 2^\circ\text{C}$		INTRON a	
$30 \pm 2^\circ\text{C}$	Formulación I a $28 \pm 2^\circ\text{C}$	Formulación II a $28 \pm 2^\circ\text{C}$	INTRON A
95,50 %	96,44 %	96,83 %	84,40 %
91,98 %	93,39 %		

Formulación I: Formulación con alcohol bencílico como preservo desarrollada en este trabajo.

Formulación II: Formulación con parabenos como preservas desarrollada en este trabajo.

INTRON: Formulación de INTRON A, de la compañía Schering Plough (Los datos de estabilidad de INTRON A se tomaron de la patente de Yuen y Kline, 1999).

Si bien en esas condiciones las formulaciones mantuvieron el 100 % de su actividad biológica durante los tres meses del estudio (Yuen y Kline, 1999), el contenido de IFN α 2b hum-rec determinado por RP-HPLC (presumiblemente referido a la pureza), comenzó a disminuir rápidamente (Tabla 3.12), y ya a los tres meses presentaba sólo el 84,40 % del valor inicial cuando se almacenaba a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Yuen y Kline, 1999).

Para explicar las diferencias en el comportamiento de las formulaciones que se desarrollaron en este trabajo, con relación a las de la compañía Schering Plough, resulta necesario acudir

a un estudio publicado por Beldarraín y colaboradores en el año 2001. Estos autores evaluaron las propiedades conformacionales del IFN α 2b hum-rec producido en el CIGB, en función del pH y la temperatura. Para ello emplearon la calorimetría diferencial de barrido y el dicroísmo circular. Sus resultados evidenciaron que los valores de pH cercanos a la neutralidad contribuyen a la estabilización de la molécula ya que la temperatura de fusión presenta un máximo en estas condiciones experimentales. Esto indica que a valores de pH cercanos a la neutralidad, la desnaturalización del IFN α 2b hum-rec se logra a temperaturas superiores (cerca de 10°C más) en comparación con otros valores de pH. O lo que es lo mismo, que a pH neutro el IFN α 2b hum-rec es más resistente frente a la desnaturalización por calor (Beldarraín y col., 2001).

Por otra parte, las altas fuerzas iónicas (≥ 100 mmol/L) de la solución tamponeadora, constituyen las concentraciones más favorables para la estabilidad de la molécula (Beldarraín y col., 2001). En ese sentido, fuerzas iónicas superiores a 100 mmol/L contribuyen al aumento de la temperatura de fusión (T_m). Es decir, que a fuerzas iónicas iguales o superiores a 100 mmol/L se necesita una mayor temperatura (cerca de 2°C más) para desnaturalizar el IFN α 2b hum-rec, que a fuerzas iónicas inferiores a este valor.

Por otra parte, la inclusión de cloruro de sodio no contribuye de igual forma a la estabilidad térmica de esta proteína. De hecho, el incremento en la temperatura de fusión es de sólo 1°C, y el comportamiento se mantuvo inferior al que se observó para las muestras en las que sólo se incrementó la fuerza iónica de la solución tamponeadora (Beldarraín y col., 2001).

Si tenemos en cuenta que las formulaciones de la compañía Schering Ploug tienen una concentración de iones fosfato de cerca de 20 mmol/L, y una concentración de cloruro de sodio dos veces superior a la que se utilizó en este trabajo (7,5 mg/mL), y tomando como referencia las investigaciones de Beldarraín y colaboradores (2001), podemos esperar que la estabilidad a altas temperaturas de estas formulaciones sea inferior a la que demostraron las nuevas formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec que se desarrollaron en este trabajo.

Las nuevas formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec permanecen estables durante 30 meses en condiciones reales de almacenamiento

El examen visual de las formulaciones en el estudio de estabilidad real indicó la ausencia de cambios en el color o la formación de precipitados durante los 30 meses de almacenamiento. Además, la pureza del IFN α 2b hum-rec permaneció superior al 95 % a través de todo el

estudio y no se encontraron pérdidas en la actividad biológica, la cual osciló entre 6,4 y 15,6 MUI/mL (Tablas 3.13, 3.14), de acuerdo a las especificaciones de calidad (ANEXOS II y III).

Ambas formulaciones se mantuvieron apirogénicas, atóxicas y estériles, el pH se mantuvo entre 7,2 y 7,6 y el contenido del polisorbato 80 y alcohol bencílico permaneció en el rango que se estableció en las especificaciones de calidad de estas preparaciones (ANEXOS II y III). Además, no se detectaron signos de benzaldehído en la formulación que contenía alcohol bencílico como agente preservante. Todos los resultados se encontraron dentro de los límites que establece la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1988, 1992).

Tabla 3.13. Estabilidad acelerada de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec que contiene metil y propil parabenos como preservos.

Meses	Actividad Biológica (x 10 ⁶ UI/mL)			RP-HPLC (pureza en %)			ELISA (concentración en μ g/mL)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
0	8,84	9,19	10,15	96,59	98,42	98,13	57,84	61,08	62,18
3	9,15	10,28	8,59	96,43	98,39	98,73	59,54	59,87	59,84
6	8,59	10,48	11,54	95,77	98,13	97,52	55,42	59,81	60,48
9	9,48	9,38	8,69	95,31	97,98	96,23	58,36	62,64	61,55
12	11,15	11,28	10,27	96,83	97,92	96,19	55,91	60,44	62,35
18	10,28	10,87	10,58	95,21	95,27	95,97	57,39	59,87	59,88
24	9,58	9,79	9,87	95,39	95,71	95,42	61,09	62,18	61,09
30	8,97	8,97	9,08	95,61	96,97	96,31	58,75	62,01	62,17

La formulación se envasó en bulbos 2R. Las muestras se almacenaron a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y se analizaron en la Dirección de Calidad del CIGB mediante las siguientes técnicas analíticas: titulación antiviral (actividad biológica), RP-HPLC, ELISA y la determinación de pirógenos, inocuidad, pH, características organolépticas, esterilidad, volumen y contenido de polisorbato 80.

Tabla 3.14. Estabilidad acelerada de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec que contiene alcohol bencílico como preservos.

Meses	Actividad Biológica (x 10 ⁶ UI/mL)			RP-HPLC (pureza en %)			ELISA (concentración en μ g/mL)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
0	11,84	9,52	9,82	96,15	97,32	95,53	69,48	71,55	68,44
3	12,61	11,91	12,64	94,92	96,34	95,34	68,44	70,48	69,18
6	10,52	9,43	9,54	96,33	96,11	95,91	63,75	69,75	65,27
9	12,34	10,40	10,93	94,31	95,94	96,64	75,48	67,22	68,48
12	11,14	8,82	10,72	94,52	95,92	94,55	65,78	69,08	67,03
18	12,12	11,04	9,82	96,61	97,21	97,23	69,41	65,18	64,99
24	10,31	10,91	11,24	96,53	97,82	97,41	67,09	69,78	68,43
30	12,02	8,32	10,21	95,05	95,61	95,13	68,07	71,57	68,11

La formulación se envasó en bulbos 2R. Las muestras se almacenaron a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y se analizaron en la Dirección de Calidad del CIGB mediante las siguientes técnicas analíticas: titulación antiviral (actividad biológica), RP-HPLC, ELISA y la determinación de pirógenos, inocuidad, pH, características organolépticas, esterilidad, volumen y contenido de polisorbato 80 y alcohol bencílico.

Aunque los parabenos no se cuantificaron en estos estudios de estabilidad, los resultados organolépticos demuestran que no hubo un exceso en la concentración de estos preservos en la formulación, pues la misma permaneció incolora, transparente y libre de partículas extrañas durante todo el tiempo de almacenamiento. En caso de utilizar una concentración mayor a la señalada probablemente estos excipientes no se hubieran disuelto o hubieran precipitado en el transcurso del estudio. Por otra parte, tampoco se detectó contaminación del producto (mediante el ensayo de esterilidad) en ninguno de los tiempos evaluados, lo que sugiere que tampoco hubo un defecto en la concentración de estos excipientes.

En comparación con las formulaciones patentadas por la compañía Schering Plough, las nuevas formulaciones líquidas mostraron una mayor estabilidad en condiciones de anaquel (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Comparación de la pureza en condiciones reales, de las formulaciones que se diseñaron en este trabajo, en comparación con la formulación de INTRON A.

Meses	INTRON a 5 ± 3 °C	Formulación I a 5 ± 3 °C	Formulación II a 5 ± 3 °C
3	100 %	95,50 %	97,85 %
6	100 %	96,10 %	97,14 %
12	100 %	95,00 %	96,97 %
18	98 %	97,00 %	95,47 %
24	93 %	97,23 %	95,51 %
30	-	95,23 %	96,29 %

Formulación I: Formulación con alcohol bencílico como preservo desarrollada en este trabajo.

Formulación II: Formulación con parabenos como preservos desarrollada en este trabajo.

INTRON: Formulación de INTRON A, de la compañía Schering Plough (Los datos de estabilidad de INTRON A se tomaron de la patente de Yuen y Kline, 1999).

Si bien las formulaciones de la compañía norteamericana mostraron una estabilidad de 24 meses en estas condiciones, la estabilidad de las que se desarrollaron aquí fue seis meses superior. Además, ya a los 24 meses de almacenamiento el porcentaje de IFN α 2b hum-rec sin modificar era inferior al 95 % (Tabla 3.15). Las diferencias en este comportamiento pueden explicarse según lo discutido en el acápite correspondiente a la estabilidad acelerada.

A pesar de que la mayoría de las farmacopeas recomiendan el análisis del IFN α 2b hum-rec por la técnica de RP-HPLC mediante una columna de cadena hidrocarbonada octadecil (18 átomos de carbono), en el CIGB el análisis se realiza actualmente con columnas con cadena hidrocarbonada octil (8 átomos de carbono). Debido a su naturaleza menos hidrofóbica, las columnas de 8 átomos de carbono son menos resolutivas que aquellas de 18 átomos de

carbono. Por ello, las señales que puedan contaminar la señal de interés, tienden a una menor separación.

Sin embargo, cuando se evaluó la pureza de lotes actuales (producidos en el año 2005) de la formulación con alcohol bencílico como preservo, y de lotes producidos en el año 2003 (24 meses de almacenamiento a $5 \pm 3^\circ\text{C}$) mediante una columna de 18 átomos de carbono, los resultados fueron similares a los que se obtuvieron con una columna de 8 átomos de carbono (Tabla 3.16, Fig. 3.18).

Tabla 3.16. Resultados de determinación de la pureza de 6 lotes de la nueva formulación líquida con alcohol bencílico.

Lote	Año de fabricación	Pureza por C8 (%)	Pureza por C18 (%)
L3301	2003	96,42	96,34
L3302	2003	96,27	96,18
L3303	2003	97,11	96,89
L5301	2005	97,74	97,71
L5302	2005	97,42	97,52
L5303	2005	97,27	97,14

Las muestras se analizaron en el año 2005 por lo que la pureza de los lotes fabricados en el año 2003 se corresponde con 24 meses de envejecimiento, mientras que la pureza de los lotes fabricados en el año 2005 se corresponde con el tiempo inicial.

Ello parece indicar, que independientemente de que la columna de 18 átomos de carbono es más resolutive que la de 8 átomos de carbono, la formulación con alcohol bencílico como preservo es capaz de mantener la estabilidad (referida a la pureza) del IFN α 2b hum-rec

dentro de los límites establecidos para formulaciones de este tipo independientemente de la columna cromatográfica que se emplee para su evaluación.

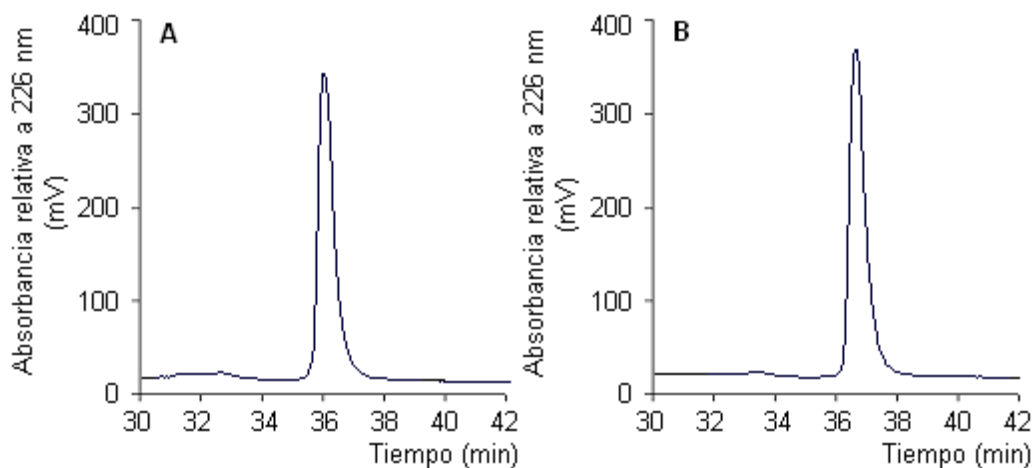


Figura 3.18. Evaluación del lote L5301 mediante una columna de 8 átomos de carbono (A) y 18 átomos de carbono (B).

Establecimiento de las especificaciones de Control de la Calidad e introducción en el sistema productivo

Las especificaciones de calidad para el producto terminado se establecieron de acuerdo a los requerimientos de la OMS, la EMEA y la ICH, para productos de este tipo (WHO 1988, 1992; ICH, 1999; EMEA, 2002).

También se tuvo en cuenta el comportamiento de ambas formulaciones en los estudios de estabilidad. Específicamente, la pureza del ingrediente activo permaneció por encima del 95 %, el pH de la formulación osciló entre 7,2 y 7,6, la concentración de alcohol bencílico varió entre 8 y 12 mg/mL (para la formulación que contenía este excipiente como preservativo) y la concentración de polisorbato 80 se mantuvo entre 0,05 y 0,15 mg/mL (para la formulación que contenía metil y propil parabenos como preservativos) y entre 0,1 y 0,3 mg/mL (para la formulación que contenía alcohol bencílico como preservativo). Por otra parte, las formulaciones se mantuvieron incoloras, transparentes, libres de partículas en suspensión, apirogénicas, atóxicas y estériles.

Si bien algunos de los parámetros anteriores (p. ej., pureza, seguridad general, pirógenos y esterilidad) están concretamente establecidos por las diferentes agencias regulatorias, existen otras propiedades como la actividad biológica cuyos límites deben ser aprobados por las agencias nacionales competentes (WHO 1988; British Pharmacopoeia, 1998). En este caso la actividad biológica también se mantuvo estable en ambas condiciones de almacenamiento. Sin embargo, debido a la variabilidad del ensayo de determinación de este parámetro por titulación antiviral (Ferrero y col., 1994), se decidió establecer un rango de aceptación entre el 64 y el 156 % del valor nominal. De manera que las formulaciones de IFN α 2b hum-rec formuladas a 10 MUI/mL, deberían mantener una actividad biológica entre 6,4 y 15,6 MUI/mL, para su liberación como producto terminado.

Sobre esa base se diseñaron las especificaciones de calidad antes de su aprobación por la Dirección de Calidad del CIGB (ANEXOS II y III).

Tras la aprobación de las especificaciones de calidad de estos productos, se decidió introducir uno de ellos (la formulación líquida con alcohol bencílico como preservativo) en el sistema productivo del Centro Nacional de Biopreparados, mediante la fabricación de cinco lotes introductorios.

Cuando una formulación desarrollada a escala de laboratorio o piloto se va a producir a escala industrial, aparecen nuevas variables que pueden afectar la estabilidad de la misma. Entre estas variables se pueden citar el aumento en los volúmenes de trabajo, el aumento en

los tiempos de agitación y disolución y el aumento en los tiempos de dispensación. Esto puede constituir un problema para formulaciones sensibles a determinados factores como el oxígeno, la luz o la temperatura. Sin embargo, los cinco lotes de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec con alcohol bencílico como preservativo, se liberaron de acuerdo a las especificaciones de calidad establecidas, y demostraron la consistencia de la formulación y el proceso (Tabla 3.17). De esta manera la actividad biológica de los cinco lotes productivos cumplió estrictamente con las especificaciones de calidad al encontrarse en el rango de 6,4 a

Tabla 3.17. Resultados de liberación de los cinco lotes introductorios de la nueva formulación líquida con alcohol bencílico, en el sistema productivo del BIOCEN.

	Pureza (%)	Actividad Biológica (MUI/mL)
Lote A5301	97,54	9,57
Lote A5302	97,08	10,58
Lote A5303	98,01	10,78
Lote A5304	97,34	9,83
Lote A5305	97,42	10,48

15,6 MUI/mL. Esto indicó que el proceso de manufactura en esta escala no afectó la función biológica de esta proteína.

La pureza también se mantuvo estable en estos lotes y su valor se mantuvo por encima del 95 % en todos los casos, de acuerdo a las especificaciones establecidas.

Finalmente, la totalidad de los lotes fueron incoloros, transparentes, apirogénicos, atóxicos, estériles, el pH se mantuvo entre 7,2 y 7,6, la concentración de alcohol bencílico osciló entre 8 y 12 mg/mL y la de polisorbato entre 0,1 y 0,3 mg/mL. Con ello se demostró que el proceso de fabricación a escala industrial no afectó ninguno de los parámetros de calidad de esta formulación.

Análisis económico

El análisis económico de estos nuevos productos se basó en la determinación del valor actual neto (VAN), la tasa interna de rendimiento (TIR) y el plazo de recuperación (PBP) para la nueva variante de formulación liofilizada de IFN alfa 2b.

En la Tabla 3.18 se muestran los resultados del análisis económico para el caso base.

Tabla 3.18. Indicadores económicos para el caso base

VAN	TIR	PBP
\$1 505 500,86	79 %	2 años

La determinación del **VAN** se encuentra entre los métodos más empleados para la evaluación económica de proyectos. Este factor representa la diferencia entre los ingresos acumulados durante la

vida del proyecto y los desembolsos producidos durante todos esos años, ambos actualizados mediante el tipo de interés para poder compararlos. Así, para un interés determinado, si el **VAN** es positivo quiere decir que el proyecto proporcionará beneficios por lo que el rendimiento de la inversión será superior al capital invertido en el proyecto. Cuando el **VAN** es negativo la conclusión es que los beneficios generados por el proyecto son

menores que el costo del capital invertido, por lo que no sería conveniente la inversión en este proyecto en las condiciones indicadas (del Caño y de la Cruz, 1995).

En este caso el VAN es positivo (\$1 505 500,86), por lo que el proyecto, en las condiciones propuestas, proporcionará beneficios económicos.

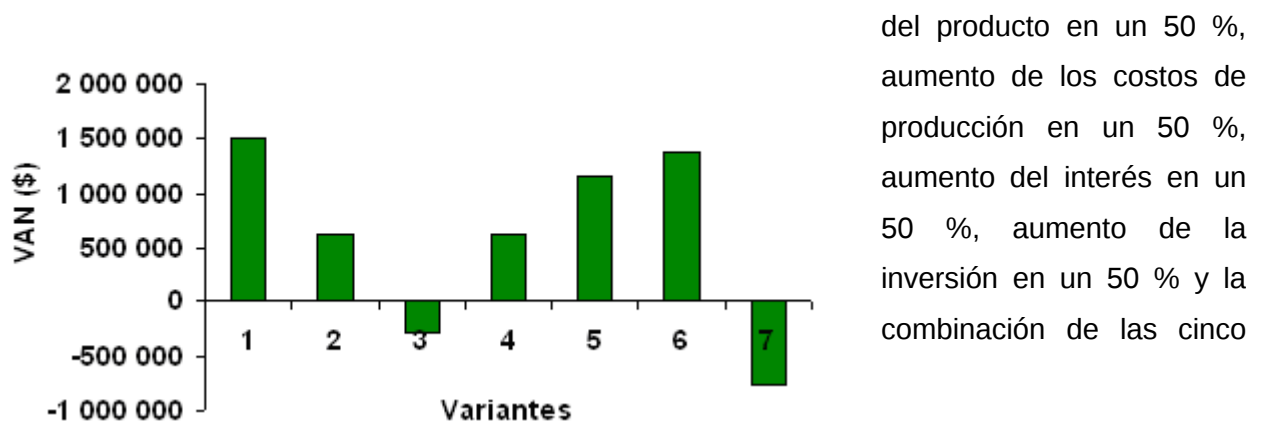
La determinación del **TIR** consiste en hallar el tipo de descuento para el cual se igualan los ingresos actualizados, a los desembolsos, también actualizados. Según este método, los proyectos aceptables serán aquellos cuyo TIR sea superior al tipo de interés aplicable a la inversión, y más interesantes mientras mayor sea este valor (del Caño y de la Cruz, 1995). En este caso se impuso un interés del 10 % y según se aprecia en la Tabla 3.18, el valor del TIR para el caso base es de 79%, superior al valor impuesto, lo que hace rentable al proyecto.

El plazo de recuperación (**PBP**) indica el tiempo necesario para recuperar la inversión inicial mediante los ingresos netos anuales. De las posibles alternativas de inversión, son preferibles aquellas que presentan plazos de recuperación menores (del Caño y de la Cruz, 1995). Para este proyecto se observa que en 2 años se recuperará la inversión inicial y se obtendrán ganancias (Tabla 3.18).

Análisis de sensibilidad

El análisis de sensibilidad determina la influencia que tienen, sobre el proyecto, las variaciones individuales de los datos económicos, y permite deducir cuales son las variables críticas del proyecto. Conviene destacar que el análisis de sensibilidad no elimina los posibles errores, pero indica las variables en potencia, más peligrosas y por tanto cuales son los factores claves en la decisión y la realización de una inversión.

Los estimados de rentabilidad del proyecto se determinaron atendiendo a la variación de algunos de los factores asociados a los principales indicadores económicos (Figs. 3.19, 3.20 y 3.21). Estos factores fueron: disminución de las ventas en un 50 %, disminución del precio



del producto en un 50 %, aumento de los costos de producción en un 50 %, aumento del interés en un 50 %, aumento de la inversión en un 50 % y la combinación de las cinco

Figura 3.19. Análisis del VAN para las diferentes variantes: (VAN en función de las variantes). 1: caso base, 2: disminución de las ventas en un 50 %, 3: disminución del precio en un 50 %, 4: aumento de los costos en un 50 %, 5: aumento del interés en un 50 %, 6: aumento de la inversión en un 50 %, 7: combinación de las variantes.

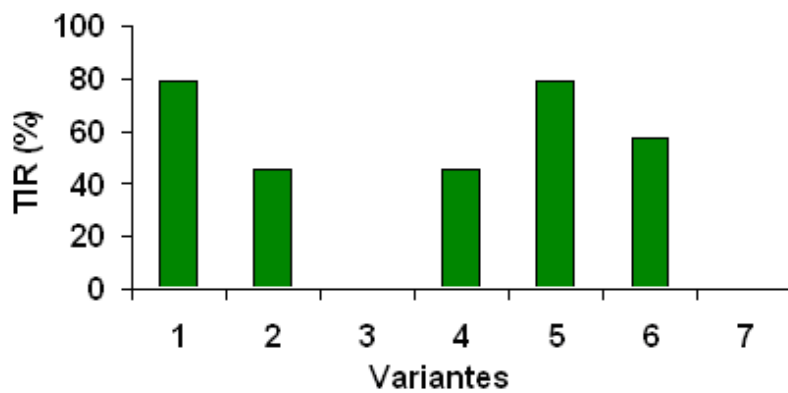
variantes anteriores. En todos los casos se comparó con el caso que se consideró como base.

Como se muestra en las Figura 3.19, la disminución de los precios es el factor que más influencia tiene sobre el VAN.

Menos significativos resultaron la disminución de las ventas y el aumento de los costos y del interés. Por su parte, la combinación de las variantes constituyó el peor de los casos que se pueda presentar, puesto que el proyecto sólo tendría pérdidas sin recuperación, en el plazo evaluado.

Al igual que en el caso del VAN, la disminución de los precios es el factor que más influencia tiene sobre el TIR (Fig. 3.20).

Por otra parte, aunque la disminución de las ventas y el aumento de los costos, del interés y de la inversión afectan este parámetro, los valores que se obtienen son adecuados para este



tipo de proyecto. Sin embargo, la combinación de las variantes constituyó una vez más el peor de los casos, y al igual que en la variante 3 (disminución del precio del producto) el saldo fue negativo (Fig. 3.20).

Figura 3.20. Análisis del TIR para las diferentes variantes. 1: caso base, 2: disminución de las ventas en un 50 %, 3: disminución del precio en un 50 %, 4: aumento de los costos en un 50 %, 5: aumento del interés en un 50 %, 6: aumento de la inversión en un 50 %, 7: combinación de las variantes.

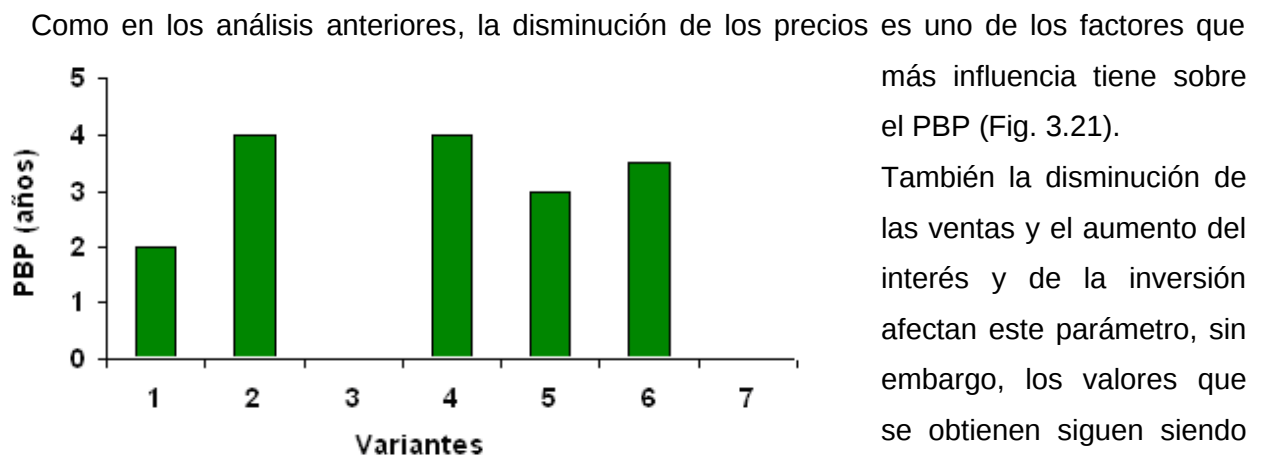


Figura 3.21. Análisis del PBP para las diferentes variantes. 1: caso base, 2: disminución de las ventas en un 50 %, 3: disminución del precio en un 50 %, 4: aumento de los costos en un 50 %, 5: aumento del interés en un 50 %, 6: aumento de la inversión en un 50 %, 7: combinación de las variantes.

más influencia tiene sobre el PBP (Fig. 3.21).

También la disminución de las ventas y el aumento del interés y de la inversión afectan este parámetro, sin embargo, los valores que se obtienen siguen siendo adecuados para este tipo de proyecto. No obstante, la combinación de las variantes constituyó el peor de los casos y de manera

similar a variante 3 (disminución del precio del producto) la inversión no se recupera (Fig. 3.21).

Este análisis indica que aún cuando los factores evaluados varíen con el objetivo de comprometer la rentabilidad del proyecto, el saldo será positivo, excepto cuando disminuya el precio en un 50 % o se combinen las cinco variantes. Por ello se puede afirmar que el precio del producto constituye el factor más importante a tener en cuenta en este caso. Si el precio disminuye el proyecto será irrentable.

El flujo de caja para cada uno de las variantes se muestra en el ANEXO IV.

Las nuevas formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec son física-química y biológicamente equivalentes al INTRON A

La comparación de los productos propios con otros de la competencia brinda argumentos sólidos acerca de su calidad y permite evaluar la posibilidad de usar indistintamente uno u otro producto en un esquema clínico determinado. Hank y colaboradores compararon la actividad biológica de dos preparaciones de IL-2 (una suministrada por la compañía Chiron Corporation y la otra suministrada por la compañía Hoffman La Roche) para conocer si podían usarse indistintamente (Hank y col., 1999). Algo similar investigaron Morteza-Semnani y colaboradores con un agente antioxidante de origen natural (Morteza-Semnani y col., 2003).

En este trabajo se evaluó la calidad de las nuevas formulaciones de IFN α 2b hum-rec, en comparación con el producto líder de la competencia (INTRON A). Para ello se determinó la actividad biológica (antiviral y antiproliferativa), la pureza (RP-HPLC) y la inmunoidentificación (ELISA) a los 18 meses de almacenamiento.

Según se muestra en la Tabla 3.19, la actividad antiviral, la inmunoidentificación y la pureza de las formulaciones desarrolladas en este trabajo fueron similares a las de INTRON A.

Tabla 3.19. Indicadores de comparación de tres formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec, después de 18 meses de almacenamiento.

Producto	RP-HPLC	ELISA	Actividad antiviral
INTRON A	97,3 \pm 0,3 %	53,5 \pm 5,6 μ g/mL	10,1 \pm 1,7 \times 10 ⁶ UI/mL
HEBERON I	97,1 \pm 0,4 %	61,7 \pm 4,3 μ g/mL	10,5 \pm 1,9 \times 10 ⁶ UI/mL
HEBERON II	97,4 \pm 0,3 %	65,84 \pm 5,4 μ g/mL	10,3 \pm 1,4 \times 10 ⁶ UI/mL
P (α 0.05)	0,32 (NS)	0,55 (NS)	0,61 (NS)

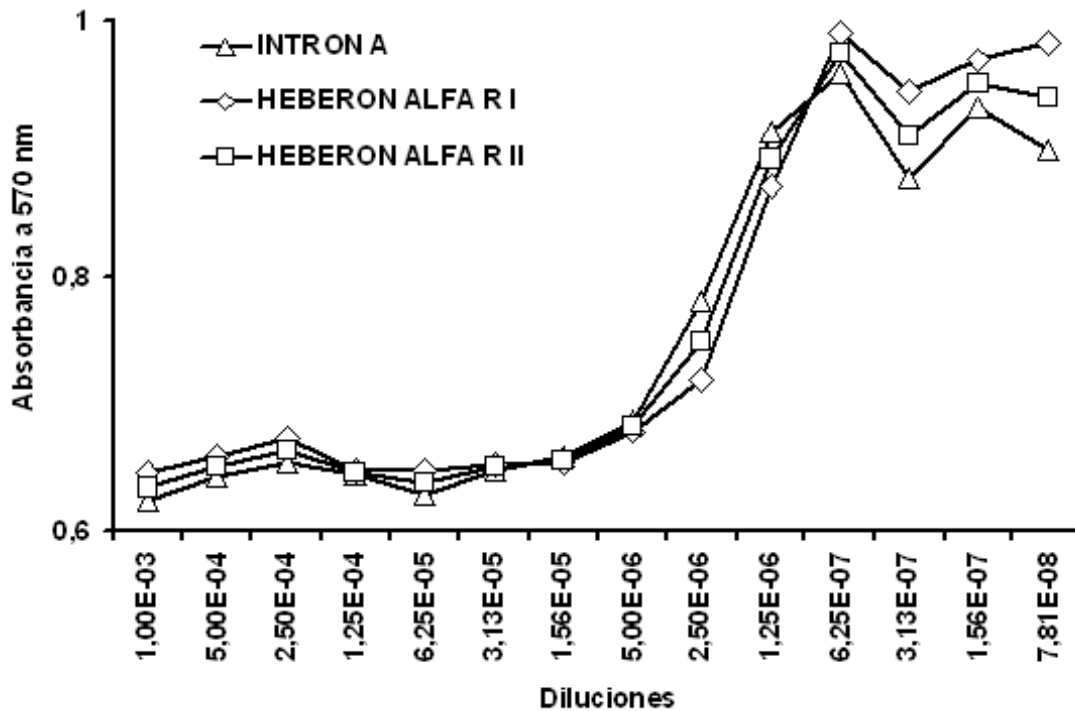
Las muestras se analizaron por triplicado (RP-HPLC y ELISA) o seis veces (determinación de la actividad antiviral).

Los resultados se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis (Sigarroa, 1985). Las diferencias entre los resultados obtenidos se consideraron significativas cuando P<0,05.

HEBERON ALFA R I: Formulación de IFN α 2b hum-rec que contenía alcohol bencílico como agente preservante.

HEBERON ALFA R II: Formulación de IFN α 2b hum-rec que contenía metil y propil parabenos como agentes preservantes.

Esta similitud también se observó en relación con la actividad antiproliferativa (Fig. 3.22). Estos resultados demuestran la equivalencia de estas formulaciones desde el punto de vista físico-químico y biológico, al menos, a los 18 meses de almacenamiento en condiciones de estante.



Fi

Figura 3.22. Actividad antiproliferativa de tres formulaciones de IFN α 2b hum-rec (INTRON A, HEBERON I y HEBERON II).

El análisis se basó en la capacidad del IFN α 2b hum-rec para inhibir el crecimiento de las células Daudi (Prummer y col., 1994). Se realizaron 6 réplicas de las determinaciones.

La equivalencia entre estas formulaciones pudiera carecer de sentido dadas las diferencias en cuanto a sus respectivas composiciones. Sin embargo, Yuen y Kline ya habían demostrado la estabilidad de la formulación de Schering Plough en condiciones de estante (Yuen y Kline, 1999). Por otra parte, la estabilidad de las formulaciones líquidas que se desarrollaron en este trabajo quedó fehacientemente demostrada en el acápite correspondiente.

La calidad del ingrediente activo es otra de las variables que puede propiciar las diferencias entre los productos terminados. Si bien la calidad del ingrediente activo del INTRON A se ha demostrado a través de las patentes de esta compañía (Yuen y Kline, 1998, 1999), en un estudio del año 2001, Beldarraín y colaboradores demostraron la calidad físico-química de la molécula producida en el CIGB. Por otra parte, Santana y colaboradores investigaron las diferencias entre varias preparaciones de IFN α 2b hum-rec entre las que se incluían el INTRON A, el Bioferon y el Interimmun, con respecto al ingrediente activo que se produce en el CIGB. Estos autores encontraron que el interferón cubano mostró características muy

similares al INTRON A y mayor homogeneidad que el Bioferon y el Interimmun (Santana y col., 1999b).

El resultado de este trabajo no sólo confirma los datos obtenidos por Santana y colaboradores, sino que además los enriquece pues demuestra la equivalencia de estas dos moléculas a nivel de formulaciones comerciales.

Consideraciones finales

Otros trabajos se han asociado a por lo menos, una de las formulaciones obtenidas en esta investigación.

En el año 2003 el CECMED aprobó el registro sanitario de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec con alcohol bencílico como preservativo (Autobibliografía). Desde esa fecha, se emplea en nuestro país en diferentes estudios clínicos. Uno de los ejemplos más significativos y trascendentales fue su uso en la epidemia de conjuntivitis hemorrágica que padeció el país en el año 2003.

La obtención de esta misma formulación propició además la firma de una empresa mixta entre Cuba y la República Popular China para la producción de IFN α 2b hum-rec (ANEXO V).

Por otra parte, en el año 2004, García-García y colaboradores publicaron un estudio de bioequivalencia entre la misma formulación y el INTRON A, en voluntarios sanos (García-García y col., 2004). En este trabajo encontraron que ambas formulaciones eran bioequivalentes entre sí (ANEXO VI).

Actualmente se realizan nuevos estudios de estabilidad con esta formulación, y recientes reportes indican que puede permanecer estable durante 1 mes cuando se almacena a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (Comunicación personal; Maribel Vega, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, 9 de Junio del 2005).

Por su parte, la formulación que presenta metil y propil parabenos como preservativos también tiene ventajas sobre muchas de las formulaciones existentes en el mercado que son liofilizadas y presentan ASH como estabilizante.

Al igual que la formulación con alcohol bencílico, este nuevo producto no contiene ASH, por lo que se eliminan los riesgos que significan emplearla en formas parenterales. Además, se presenta en solución con lo que disminuyen considerablemente los costos de producción.

Por otra parte, este nuevo producto presenta ventajas sobre la formulación líquida con alcohol bencílico ya registrada desde el punto de vista farmacológico y químico-farmacéutico. Se ha reportado que el alcohol bencílico puede provocar problemas en niños por lo que el uso de esta formulación estaría limitado en ese sentido (Brown y col., 1982; Gershanik y col.,

1982; Jardine y Rogers, 1989). Con la nueva formulación que contiene parabenos en lugar de alcohol bencílico se elimina totalmente esta dificultad.

Además, los parabenos son compuestos más estables que el alcohol bencílico debido a su naturaleza (son ésteres del ácido p-hidroxibenzoico), por lo que su oxidación no se produciría con tanta facilidad como en el caso del alcohol bencílico. Debido a ello podemos considerar que la nueva formulación es más estable de modo que el ingrediente activo tiene menos factores que propicien su inestabilidad físico-química. Actualmente se está solicitando la autorización de estudios clínicos de esta nueva formulación al CECMED con el objetivo de lograr su registro a corto plazo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se diseñaron dos formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec con una estabilidad superior a la que reporta la compañía Schring Plough para el INTRON A, producto líder del mercado.
- Las dos formulaciones que se diseñaron fueron estables durante 30 meses en condiciones de vida de estante ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) lo cual garantiza su uso clínico durante ese tiempo.
- Las dos formulaciones que se diseñaron fueron estables durante dos meses en condiciones aceleradas de almacenamiento ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) lo cual garantiza su estabilidad durante circunstancias no programadas como fallos de la cadena de frío.
- La producción de ambas formulaciones resulta sumamente atractiva desde el punto de vista económico.
- Las dos formulaciones tienen una calidad físico-química y biológica comparable al producto líder del mercado (INTRON A) aunque una estabilidad superior.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- Caracterizar por espectrometría de masas y determinación de la actividad biológica los productos de modificación del IFN α 2b hum-rec cuya naturaleza no está bien dilucidada.
- Determinar si el contacto con los tapones de clorobutilo incrementa los niveles de metales en la solución.
- Determinar qué aminoácidos del IFN α 2b hum-rec se oxidan en presencia de metales así como su influencia en la agregación y la actividad biológica de esta citoquina.
- Establecer un método para determinar la concentración del metil y el propil parabeno en la formulación que contiene estos excipientes como preservos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aboulafia, D. M. 2002. Interleukin-2, ganciclovir, and high-dose zidovudine for the treatment of AIDS-associated primary central nervous system lymphoma. *Clin. Infect. Dis.*, **34** (12): 1660-1662.
2. Abuchowski, A.; Davis, F. F.; Davis S. 1981. Immunosuppressive properties and circulating life of *Achromobacter* glutaminase-asparaginase covalently attached to polyethylene glycol in man. *Cancer Treat. Rep.*, **65** (11-12): 1077-1081.
3. Allen, J. D.; Bentley, D.; Stringer, R. A.; Lowther, N. 1999. Hybrid (BDBB) interferon-alpha: preformulation studies. *Int. J. Pharm.*, **187** (2): 259-272.
4. Allison, S. D.; Dong, A.; Carpenter, J. F. 1996. Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying and rehydration. *Biophys. J.*, **71** (4): 2022-2032.
5. Alpin, J. D.; Wriston, J. C. Jr. 1981. Preparation, properties, and applications of carbohydrate conjugates of proteins and lipids. *Crit. Rev. Biochem.*, **10** (4): 259-306.
6. American Type Culture Collection (ATCC) (<http://www.atcc.org/>)
7. Arakawa, T.; Kita, Y.; Carpenter, J. F. 1991. Protein-solvent interactions in Pharmaceutical Formulations. *Pharm. Res.*, **8** (3): 285-291.
8. Arakawa, T.; Petrelski, S. J.; Kenney, W. C.; Carpenter, J. F. 2001. Factor affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46** (1-3): 307-326.
9. Argos, P.; Rossmann, M. G.; Grau, U.; Zuber, H.; Frank, G.; Tratschin, J. D. 1979. Thermal stability and Protein Structure. *UCLA Forum Med. Sci.*, **21**: 159-169.
10. Bam, N. B.; Cleland, J. L.; Yang, J.; Manning, M. C.; Carpenter, J. F.; Kelley, R. F.; Randolph, T. W. 1998. Polysorbate protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *J. Pharm. Sci.*, **87** (12): 1554-1559.
11. Bedu-Addo, F.; Moreadith, R.; Advant, S. J. 2002. Preformulation development of recombinant pegylated staphylokinase SY161 using statistical design. *AAPS PharmSci.*, **4** (4): E19.
12. Beldarraín, A.; Cruz, C.; Cruz, O.; Navarro, M.; Gil., M. 2001. Purification and conformational properties of a human interferon alpha 2b produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **33** (Pt 3): 173-182.

13. Berlanga, J.; Lodos, J.; Lopez-Saura, P. 2002. Attenuation of internal organ damages by exogenously administered epidermal growth factor (EGF) in burned rodents. *Burns*, **28** (5): 435-442.
14. Biobusiness. Recombinant enzymes, hormones and cytokines. (http://www.i-s-b.org/business/recombinant_f.htm).
15. Bohrer, D.; do Nascimento, P. C.; Binotto, R.; Becker, E. 2003. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical products by aluminium. Part III: Interaction container-chemicals during the heating for sterilisation. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **17** (2): 107-115.
16. Bolívar, F.; Rodríguez, R. L.; Greene, P. J.; Betlach, M. C.; Hayneker, H. L.; Boyer, H. W. 1977. Construction and Characterization of New Cloning Vehicles. II. A Multipurpose Cloning System. *Gene*, **2** (2): 95-113.
17. Bond, M.; Jankowski, M.; Patel, H.; Karnik, S.; Strang, A.; Xu, B.; Rouse, J.; Koza, S.; Letwin, B.; Steckert, J.; Amphlett, G.; Scoble, H. 1998. Biochemical characterization of recombinant factor IX. *Semin. Hematol.*, **35** (2 suppl 2): 11-17.
18. Bordens, R.; Grossberg, S. E.; Trotta, P. P.; Nagabhushan, T. L. 1997. Molecular and biologic characterization of recombinant interferon-alpha 2b. *Semin. Oncol.*, **24** (Suppl 9): S9-41–S9-51.
19. Bottomley, S. P.; Tew, D. J. 2000. The citrate ion increases the conformational stability of alpha(1)-antitrypsin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1481** (1): 11-7.
20. Brange, J.; Havelund, S.; Hougaard, P. 1992. Chemical stability of insulin. 2. Formation of higher molecular weight transformation products during storage of pharmaceutical preparations. *Pharm. Res.*, **9** (6): 727-734.
21. British Pharmacopoeia. 1998. London: Her Majesty's Stationery Office.
22. Brown, W. J.; Buist, N.R.; Gipson, H.T.; Huston, R.K.; Kennaway, N.G. 1982. Fatal benzyl alcohol poisoning in a neonatal intensive care unit. *Lancet*, **29** (8283), 1250.
23. Buti, M.; Esteban, R. 2005. Drugs in Development for Hepatitis B. *Drugs*, **65** (11): 1451-1460.
24. Cantell, K. 1984. Una gota de agua en un océano: ideas sobre interferones. *Interferón y Biotecnología*, **1** (2): 1-10.
25. Cantell, K.; Hirvoren, G.; Kauppien, H.; Myllyla, G. 1991. *Methods Enzymol.*, **78**: 29-38.
26. Carpenter, C. P.; Woodside, M. D.; Kinkead, E. R.; King, J. M.; Sullivan, L. J. 1971. Response of dogs to repeated intravenous injection of polyethylene glycol 4000.

- Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **18** (1): 35-40.
27. Carpenter, J. F.; Arakawa, T.; Crowe, J. H. 1992. Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. International Symposium on Biological Product freeze-drying and formulation. *Dev. Biol. Stand.*, **74**: 225-239.
 28. Carpenter, J. F.; Prestrelski S. J.; Arakawa, T. 1998. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch. Biochem. Bioph.*, **303** (2): 456-64.
 29. Chan, M. K.; Muklund, S.; Kletzin, A.; Adams, M. W. W.; Rees, D. C. 1995. Structure of a Hyperthermophilic Tungstoperin Enzyme, Aldehyde Ferredoxin Oxidoreductase. *Science*, **267** (5203): 1463-1469.
 30. Chang, B. S.; Reeder, G.; Carpenter, J. F. 1996. Development of a stable freeze-dried formulation of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Pharm. Res.*, **13** (2): 243-249.
 31. Chao, J. C.; Liu, K. Y.; Chen, S. H.; Fang, C. L.; Tsao, C. W. 2003. Effect of oral epidermal growth factor on mucosal healing in rats with duodenal ulcer. *World. J. Gastroenterol.*, **9** (10): 2261-2265.
 32. Cheever, M. A., Greenberg, P. D.; Fefer, A.; Gillis, S. 1982. Augmentation of the anti-tumor therapeutic efficacy of long-term cultured T-lymphocytes by *in vivo* administration of purified interleukin-2. *J. Exp. Med.*, **155** (4): 968-980.
 33. Chen, B. L.; Arakawa, T.; Hsu, E.; Narhi, L. O.; Tressel, T. J.; Chien, S. L. 1994. Strategies to suppress aggregation of recombinant keratinocyte growth factor during liquid formulation development. *J. Pharm. Sci.*, **83** (12): 1657-1661.
 34. Cholewinski, M.; Luckel, B.; Horn, H. 1996. Degradation pathways, analytical characterization and formulation strategies of a peptide and a protein. Calcitonine and human growth hormone in comparison. *Pharm. Acta. Helv.*, **71** (6): 405-419.
 35. Cleland, J. L.; Powell, M. F.; Shire, S. J. 1993. The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, **10** (4): 307-377.
 36. Cohen, S. N.; Chang, A. C.; Boyer, H. W.; Helling, R. B. 1973. Construction of Biologically Funtional Bacterial Plasmid *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70** (11): 3240-3244.
 37. Crombet, T.; Torres, O.; Neningen, E.; Catala, M.; Rodriguez, N.; Ramos, M.; Fernandez, E.; Iznaga, N.; Perez, R.; Lage, A. 2001. Phase I clinical evaluation of a

- neutralizing monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor. *Cancer Biother. Radiopharm.*, **16** (1): 93-102.
38. Danielson, J. W. 1992. Toxicity potential of compounds found in parenteral solutions with rubber stoppers. *J. Parenter. Sci. Technol.*, **46** (2): 43-47.
39. Darnell, J.; Mkerr, I.; Stark, G. 1995. JaK-Stat Pathways and transcriptional activation in response to interferons and other extracellular signaling proteins. *Science*, **264** (5164):1415-1421.
40. Darrington, R. T.; Anderson, B. D. 1994. The role of intermolecular nucleophilic catalysis and the effects of self-association on the deamidation of human insulin at low pH. *Pharm. Res.*, **6** (11): 784-793.
41. Del Caño, A.; de la Cruz, P. 1995. Conceptos básicos de la dirección de proyectos, UNED; Madrid, España, ISBN 84-362-3287-9.
42. Devos, R.; Plactinet, G.; Cheroutre, H.; Simons, G.; DeGrave, W.; Tavernier, J.; Remaut, E.; Fiers, W. 1983. Molecular cloning of human interleukin-2 cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, **11** (13): 4307-4323.
43. Eberlein, T. J.; Rosenstein, M.; Rosenberg, S. A. 1982. Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin-2. *J. Exp. Med.*, **156** (2): 385-397.
44. Einat, M.; Resnitzky, D.; Kimchi, A. 1985. Inhibitory effects of interferon on the expression of genes regulated by platelet derived growth factor. *Proc. Natl. and Sci. USA*, **82** (22): 7608-7612.
45. Ellin, R. I.; Kaminskis, A.; Zvirblis, P.; Sultan, W. E.; Shutz, M. B.; Matthews, R. 1985. Leaching of zinc compound from rubber stoppers into the contents of automatic atropine injectors. *J. Pharm. Sci.*, **74** (7): 788-790.
46. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). 2002. Note for guidance on stability testing: stability testing of existing active substances and related finished products (<http://www.emea.eu.int/>).
47. European Pharmacopoeia. 2002. Strasbourg, France. Council of Europe.
48. Fatouros, A.; Osterberg, T.; Mikaelsson, M. 1997. Recombinant factor VIII SQ--inactivation kinetics in aqueous solution and the influence of disaccharides and sugar alcohols. *Pharm. Res.*, **14** (12): 1679-1684.
49. Fatouros, A.; Sjostrom, B. 2000. Recombinant factor VIII SQ--the influence of formulation parameters on structure and surface adsorption. *Int. J. Pharm.*, **194** (1):

- 69-79.
50. Ferrero, J.; Ochagavía, M. E.; Aguilera, A.; López-Saura P. 1994. Interferon antiviral activity titration using the "SUMA" device system. *Biotecnología Aplicada*, **11** (1): 34-42.
 51. Finter, N. B. 1973. Interferons and interferon inducers. Eds. Elsevier. New York.
 52. FDA: Food and Drug Administration. (<http://www.fda.gov/>).
 53. Franceschini, R.; Zoppi, F.; Garuti, A.; Gobbi, M. 2004. The role of alpha-interferon in chronic myelogenous leukaemia in Imatinib era. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.*, **23** (4): 697-698.
 54. Fransson J.; Hagman A. 1996. Oxidation of human insulin-like growth factor I in formulation studies, II. Effects of oxygen, visible light, and phosphate on methionine oxidation in aqueous solution and evaluation of possible mechanisms. *Pharm. Res.*, **13** (19): 1476-1481.
 55. Friedman, M.; Masters, P. M. 1979. Racemization of amino acids in alkali-treated food proteins. *J. Agric. Food. Chem.*, **27** (3): 507-511.
 56. Fujita, T.; Takaoka, C.; Matsui, H.; Taniguchi, T. 1983. Structure of the human interleukin-2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80** (24): 7437-7441.
 57. García-García, I.; González-Delgado, C. A.; Valenzuela-Silva, C.; Hernández-Bernal, F.; Ferrero-Bibilonia, J.; Soto-Hernández, R.; Cervantes-Llano, M.; Ducongé, J.; Correa-Fernández, A.; Olivera-Ruano, L.; López-Saura, P. 2004. Bioequivalence of two recombinant interferon alpha-2b liquid formulations in healthy male volunteers. *Drugs R D.*, **5** (5): 271-280.
 58. Geiger, T.; Clarke, S. 1987. Deamidation, isomerization and racemization at asparaginylyl and aspartyl residues in peptides. *J. Biol. Chem.*, **262** (2): 785-800.
 59. Gershanik, J.; Boecler, B.; Ensley, H.; McCloskey, S.; George, W. 1982. The gasping syndrome and benzyl alcohol poisoning. *N. Engl. J. Med.*, **25** (22): 1384-8.
 60. Giancola, C.; De Sena, C.; Fessas, D.; Graziano, G.; Barone, G. 1997. DSC studies on bovine serum albumin denaturation. Effects of ionic strength and SDS concentration. *Int. J. Biol. Macromol.*, **20** (3): 193-204.
 61. Golovanov, A. P.; Hautbergue, G. M.; Wilson, S. A.; Lian, L. Y. 2004. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (29): 8933-8939.
 62. González, G.; Crombet, T.; Catala, M.; Mirabal, V.; Hernandez, J. C.; Gonzalez, Y.;

- Marinello, P.; Guillen, G.; Lage, A. 1998. A novel cancer vaccine composed of human-recombinant epidermal growth factor linked to a carrier protein: report of a pilot clinical trial. *Ann. Oncol.*, **9** (4): 431-435.
63. González, G.; Crombet, T.; Torres, F.; Catala, M.; Alfonso, L.; Osorio, M.; Neningen, E.; García, B.; Mulet, A.; Pérez, R.; Lage, R. 2003. Epidermal growth factor-based cancer vaccine for non-small-cell lung cancer therapy. *Ann. Oncol.*, **14** (3): 461-656.
64. Grazul-Bilska, A. T.; Johnson, M. L.; Bilski, J. J.; Redmer, D. A.; Reynolds, L. P.; Abdullah, A.; Abdullah, K. M. 2003. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc.)*, **39** (10): 787-800.
65. Gross, G.; Del Terzo, S.; Kumar, S. 1998. Stabilizer interferon alpha solutions. United States Patent 5762923.
66. Grossberg, S. E.; Sedmak, J. J. 1981. Interferon stabilization. United States Patent 4252791.
67. Gu, L.C.; Erdos, E. A.; Chiang, H. S.; Calderwood, T.; Tsai, K.; Visor, G. C.; Duffy, J.; Hsu, W. C.; Foster, L. C. 1991. Stability of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in aqueous solution: analytical methods, kinetics, products, and solution formulation implications. *Pharm. Res.*, **8** (4): 485-490.
68. Gupta, S.; Kaisheva, E. 2003. Development of a multidose formulation for a humanized monoclonal antibody using experimental design techniques. *AAPS PharmSci.*, **5** (2): E8.
69. Ha, E.; Wang, W.; Wang, Y. J. 2002. Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability. *J. Pharm. Sci.*, **91** (10): 2252-2264.
70. Hank, J. A.; Surfus, J.; Gan, J.; Albertini, M.; Lindstrom, M.; Schiller, J. H.; Hotton, K. M.; Khorsand, M.; Sondel, P. M. 1999. Distinct clinical and laboratory activity of two recombinant interleukin-2 preparations. *Clin. Cancer Res.*, **5** (2): 281-289.
71. Hart, J. R. 1984. Chelating agents as preservatives potentiators. En: Kabara, J. J. ed., *Cosmetic and drug preservation: principles and practices (Cosmetic Science and Technology Series Vol. I)*. Marcel Dekker, New York.
72. Herman, A. C.; Boone, T. C.; Lu, H. S.; 1996. Characterization, formulation, and stability of Neupogen (Filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Pharm. Biotechnol.*, **9**: 303-328.
73. Hill, R. L. 1965. Hydrolysis of protein. *Adv. Protein. Chem.*, **20**: 37-107.

74. Hora, M. S.; Rana, R. K.; Wilcox, C. L.; Katre, N. V.; Hirtzer, P.; Wolfe, S. N.; Thomson, J. W. 1992. Development of a lyophilized formulation of interleukin-2. *Dev. Biol. Stand.*, **74**: 295-303.
75. ICH. 1999. HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE SPECIFICATIONS: TEST PROCEDURES AND ACCEPTANCE CRITERIA FOR BIOTECHNOLOGICAL /BIOLOGICAL PRODUCTS Q6B. (<http://www.ich.org>)
76. Isaacs, A.; Lindenman, J. 1957. Virus interference-1. The interferons. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **147**: 258-267.
77. Jaenicke, R. 1996. Stability and folding of ultrastable proteins: Eye Lens cristallins and enzymes from thermophiles. *FASEB J.*, **10** (1): 84-92.
78. Jain, R. A.; Rhodes, C. T.; Railkar, A. M.; Malick, A. W.; Shah, N. H. 2000. Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50** (2): 257-262.
79. Jardine, D. S.; Rogers, K. 1989. Relationship of benzyl alcohol to kernicterus, intraventricular hemorrhage, and mortality in preterm infants. *Pediatrics*, **83** (2): 153-60.
80. Jenke, D. R.; Jene, J. M.; Poss, M.; Story, J.; Tsilipetros, T.; Odufu, A.; Terbush, W. 2005. Accumulation of extractables in buffer solutions from a polyolefin plastic container. *Int. J. Pharm.*, **297** (1-2): 120-33.
81. Jensen, J. L.; Roy, S. E.; Hershenson, S. I.; Schöneich, C., 1998. Metal-catalyzed degradation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): analytical and mechanistic challenges for the identification of modified sites. *Pharm. Res.*, **17** (2): 190-196.
82. Johnson, D. M.; Taylor, W. F. 1984. Degradation of fenprostalene in polyethylene glycol 400 solution. *J. Pharm. Sci.*, **73** (10): 1414-1417.
83. Johnston, T. P. 1996. Adsorption of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) to polyvinyl chloride, polypropylene, and glass: effect of solvent additives. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **50** (4): 238-245.
84. Jones, L. S.; Kaufmann, A.; Middaugh, C. R. 2005. Silicone oil induced aggregation of proteins. *J. Pharm. Sci.*, **94** (4): 918-927.
85. Kanazawa, H.; Fujimoto, S.; Ohara, A. 1994. Effect of radical scavengers on the inactivation of papain by ascorbic acid in the presence of cupric ions. *Biol. Pharm. Bull.*, **17** (4): 476-481.

86. Kappelgaard, A. M.; Bojesen, A.; Skydsgaard, K.; Sjogren, I.; Laursen, T. 2004. Liquid growth hormone: preservatives and buffers. *Horm. Res.*, **62** (Suppl 3): 98-103.
87. Katre, N. V. 1993. The conjugation of proteins with polyethylene glycol and other polymers. Altering properties of proteins to enhance their therapeutic potential. *Adv. Drug Del. Rev.*, **10** (1): 91-114.
88. Keowmaneechai, E; McClements, D. J. 2002. Influence of EDTA and citrate on physicochemical properties of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions containing CaCl₂. *J. Agric. Food Chem.*, **50** (24): 7145-7153.
89. Kikwai, L.; Babu, R. J.; Kanikkannan, N.; Singh, M. 2004. Preformulation stability of Spantide II, a promising topical anti-inflammatory agent for the treatment of psoriasis and contact dermatitis. *J. Pharm. Pharmacol.*, **56** (1): 19-25.
90. Kirkwood, J. 2002. Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin. Oncol.*, **29** (3), Suppl 7: 18-26.
91. Kirkwood, T. B. 1977. Predicting the stability of biological standards and products. *Biometrics*, **33** (4): 736-742.
92. Knepp, V. M.; Muchnik, A.; Oldmark, S.; Kalashnikova, L. 1998. Stability of nonaqueous suspension formulations of plasma derived factor IX and recombinant human alpha interferon at elevated temperatures. *Pharm. Res.*, **15** (7): 1090-1095.
93. Knepp, V. M.; Whatley, J. L.; Muchnik, A.; Calderwood, T.S. 1996. Identification of antioxidants for prevention of peroxide-mediated oxidation of recombinant human ciliary neurotrophic factor and recombinant human nerve growth factor. *J. Pharm. Sci. Technol.*, **50** (3): 163-171.
94. Kosky, A. A.; Razaq, U. O.; Treuheit, M. J.; Brems, D. N. 1999. The effects of alpha-helix on the stability of Asn residues: deamidation rates in peptides of varying helicity. *Protein Sci.*, **8** (11): 2519-2523.
95. Kwan, H. K. 1985. Biologically stable alpha-interferon formulations. United States Patent 4496537.
96. Labdon, J.; Gibson, K.; Sun, S.; Pestka S. 1984. Some species of human leukocyte interferon are glycosylated. *Act. Bioch. and Bioph.*, **232** (1): 422-426.
97. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259): 680-685.
98. Lecker, D. N.; Khan, A. 1996. Theoretical and experimental studies of the effects of heat, EDTA, and enzyme concentration on the inactivation rate of alpha amylase

- from *Bacillus sp. Biotechnol. Progr.*, **12**: 713-717.
99. Li, L. C.; Parasrampur, J.; Tian, Y. 1993. Particulate contamination from siliconized rubber stoppers: a statistical evaluation. *J. Parenter. Sci. Technol.*, **47** (5): 270-273.
100. Li, S.; Nguyen, T. H.; Schoneich, C.; Borchardt, R. T. 1995. Aggregation and precipitation of human relaxin induced by metal-catalyzed oxidation. *Biochemistry*, **34** (17): 5762-5772.
101. López, M.; González, L. R.; Reyes, N.; Sotolongo, J.; Pujol, V. 2004. Stabilization of a freeze-dried recombinant streptokinase formulation without serum albumin. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **29** (4): 367-373.
102. López-Saura, P. 1992. What is interferon good? For ten year of experience in Cuba. *Bioteología aplicada*, **7** (3): 207-227.
103. Lu, J. R.; Siu, T. J.; Howlin, B. J.; Thomas, R. K.; Cui, Z F. 1999. Protein adsorption at interfaces (Oxford University), J Penfold, J R P Webster (ISIS) (<http://www.isis.rl.ac.uk/ISIS98>)
104. Manning, M. C.; Patel, K.; Borchardt, R. T. 1989. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm. Res.*, **6** (11): 903- 918.
105. Marcus, F. 1985. Preferential cleavage at Asp-Pro peptide bonds in dilute acid. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **25** (5): 542-546.
106. Martindale. The Extra Pharmacopoeia - 31th ed. 1996. The Pharmaceutical Press, London.
107. Mbah, C. J. 2005. Effect of electrolytes on the partition coefficient of irbesartan. *Pharmazie*, **60** (5): 345-346.
108. Menéndez-Arias, L.; Argos, P. 1989. Engineering protein thermal stability. Sequence statistics point to residue substitutions in alpha-helices. *J. Mol. Biol.*, **206** (2): 397-406.
109. Menkes, D. L. 2005. Pegylated interferon vs standard interferon for chronic hepatitis C. *JAMA*, **293** (11): 1323-1324.
110. Middaugh, C. R. 1990. Biophysical approaches to the pharmaceutical development of proteins. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **16**: 2635-2654.
111. Morgan, D. A.; Ruscetti, F. W.; Gallo, R. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrow. *Science*, **193** (4257): 1007-1008.
112. Morteza-Semnani, K.; Saeedi, M.; Shahnavaz, B. 2003. Comparison of antioxidant activity of extract from roots of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) to commercial

- antioxidants in 2% hydroquinone cream. *J. Cosmet. Sci.*, **54** (6): 551-558.
113. Mozhaev, V. V.; Martinek, K. 1984. Structure-stability relationship in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, **6** (2): 50-59.
114. Na, D. H.; Faraj, J.; Capan, Y.; Leung, K. P.; DeLuca, P. P. 2005. Chewing gum of antimicrobial decapeptide (KSL) as a sustained antiplaque agent: preformulation study. *J. Control Release*, **107** (1): 122-30.
115. Nassar, M. N.; Nesarikar, V. V.; Lozano, R.; Huang, Y.; Palaniswamy, V. 2005. Degradation of a lyophilized formulation of BMS-204352: identification of degradants and role of elastomeric closures. *Pharm. Dev. Technol.*, **10** (2): 227-232.
116. Naughton, C. A.; Duppong, L. M.; Forbes, K. D.; Sehgal, I. 2003. Stability of multidose, preserved formulation epoetin alfa in syringes for three and six weeks. *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, **60** (5): 464-468.
117. Nguyen, T. H.; Shire, S. J. 1996. Stability and characterization of recombinant human relaxin. *Pharm Biotechnol.*, **9**: 247-74.
118. NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control). (<http://immunology.org/links/nibsc.pdf>)
119. Norde, W.; Anusiem, A. C. I. 1992. Adsorption, desorption and re-adsorption of protein on solid surfaces. *Colloids Surf. A*, **66**: 73-80.
120. Oliva, A.; Santovena, A.; Farina, J.; Llabres, M. 2003. Effect of high shear rate on stability of proteins: kinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33** (2): 145-155.
121. Oliyai, C.; Borchardt, R. T. 1993. Chemical pathways. Kinetics, and mechanism of degradation of an aspartyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.*, **10** (1): 95-102.
122. Padrón, G.; Besada, V.; Agraz, A.; Quiñonez, Y.; Herrera, L.; Shimonishi, Y.; Takao, T. 1989. Spectrometric analysis of recombinant human β -2 Interferon. *Anal. Chim. Acta.*, **223**: 361- 369.
123. Pang, K. R.; Wu, J. J.; Huang, D. B.; Tying, S.K.; Baron, S. 2005. Biological and clinical basis for molecular studies of interferons. *Methods. Mol. Med.*, **116**: 1-23.
124. Passot, S.; Fonseca, F.; Alarcon-Lorca, M.; Rolland, D.; Marin M. 2005. Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **60** (3): 335-348.

125. Patel, K.; Borchardt, R. T. 1990. Chemical of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.*, **7** (7): 703-711.
126. Pestka, S.; Baron, S. 1981. Definition and classification of the interferons. *Methods Enzymol.*, **78**: 3-14.
127. Pestka, S.; Langer, J.; Zoon, K.; Samuel, C. 1987. Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**: 727-777.
128. Phillips, J.; Drumm, A.; Harrison, P.; Bird, P.; Bhamra, K.; Berrie, E.; Hale, G. 2001. Manufacture and quality control of CAMPATH-1 antibodies for clinical trials. *Cytotherapy*, **3** (3): 233-242.
129. Pikal, M. J.; Dellerman, K. M.; Roy, M. L.; Riggan, R. M. 1991. The effect of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone. *Pharm. Res.*, **8** (4): 427-436.
130. Prummer, O.; Streichan, U.; Heimpel, H.; Porzolt, F. 1994. Sensitive antiproliferative neutralization assay for the detection of neutralizing IFN alpha and IFN beta antibodies. *J. Immunol. Methods*, **171** (1): 45-53.
131. Quattrocchi, O. A.; de Andrizzi, S. I. A.; Laba, R. F. 2002. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro SA. Buenos Aires.
132. Rajesh, R. S.; Chang, J. Y. 2003. Structural stability of human alpha-thrombin studied by disulfide reduction and scrambling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1651** (1-2): 85-92.
133. Reddy, K. R. 2004. Development and pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegylated interferon alfa-2a (40 kD). *Semin. Liver Dis.*, **24** (Suppl 2): 33-38.
134. Reyes, N.; Ruiz, Ll.; Aroche, K.; Gerónimo, H.; Brito, O.; Hardy, E. 2005. Stability of Ala 125 recombinant human interleukin-2 in solution. *J. Pharm. Pharmac.*, **57** (1): 31-37.
135. Rivero, J.; Limonta, M.; Ramírez, V. M.; González, A. 1990. Long term treatment with recombinant or natural alpha interferon asymptomatic seropositive HIV carriers prolongs the incubation period. *J. Interferon Res.*, **10**: S16.
136. Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. C. 2005. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (22): 8168-8173.
137. Roberts, C. J.; Darrington, R. T.; Whitley, M. B. 2003. Irreversible aggregation of recombinant bovine granulocyte-colony stimulating factor (bG-CSF) and implications for predicting protein shelf life. *J. Pharm. Sci.*, **92** (5): 1095-1111.
138. Rowe, R. C.; Sheskey, P. J.; Weller, P. J. 2003. Handbook of pharmaceutical

- excipients. Fourth Edition, Pharmaceutical Press: Grayslake, Illinois.
139. Ruddon, R. W.; Bedows, E. 1997. Assisted protein folding. *J. Biol. Chem.*, **272** (6): 3125-3128.
140. Rupley, J. A.; Careri, G. 1991. Protein hydration and function. *Adv. Protein. Chem.*, **41**: 37-172.
141. Santana, H.; Espino, Y.; Franco, A.; Furrázola, G.; Hardy, E. 1999a. A sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of recombinant human interferon α -2b. *Biotech. Tech.*, **13** (5): 341-346.
142. Santana, H.; Martínez, E.; Sánchez, J. C.; Moya, G.; Sosa, R.; Hardy, E.; Beldarraín, A.; Huerta, V.; González, L. J.; Betancourt, L.; Besada, V.; Brito, R.; Currás, T.; Ferrero, J.; Pujols, V.; Gil, M.; Herrera, L. 1999b. Molecular Characterization of Recombinant Human Interferon Alpha-2b Produced in Cuba. *Biotecnología Aplicada*, **16** (3): 154-159.
143. Sasson A. 1998. Biotecnologías aplicadas a la producción de fármacos y vacunas. Ed. Elfos Scientiae, Ciudad de la Habana.
144. Sebeke, H. K.; Starkuviene, B.; Trepsiene, O. V.; Pauliukonis, A. A.; Bumelis, V. A. 2001. Comparative effects of stabilizing additives on the rates of heat inactivation of recombinant human interferon alpha-2b in solution. *Antiviral Res.*, **50** (2): 117-127.
145. Sekar, V.; Atmar, V.; Joshi, A.; Krim, M.; Kuchn, G. 1983. Inhibition of ornithine decarboxilase in human fibroblast cells by tipe I and tipe II interferons. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **114** (3): 950-954.
146. Selman, E.; Rodríguez, D.; Ugarte, J.; Cepero, M.; Fonseca, J.; Permuy, A. 1989. Treatment of inoperable lung cancer with leukocyte alpha interferon and radiotherapy. *Interferon and neoplasms*, 4-19.
147. Sharma, V. K., Kalonia, D. S. 2004. Polyethylene Glycol-Induced Precipitation of Interferon Alpha-2a Followed By Vacuum Drying: Development of a Novel Process for Obtaining a Dry, Stable Powder. *AAPS PharmSci.*, **6** (1): 1-14.
148. Sigarroa, A. 1985. Biometría y Diseño Experimental, Pueblo y Educación, La Habana.
149. Spassov, V. Z.; Karshikoff, A. D.; Ladenstein, R. 1995. The optimization of protein-solvent interactions: thermostability and the role of hydrophobic interactions. *Protein Sci.*, **4** (8): 1516-1527.
150. St Peter, W. L.; Lewis, M. J.; Macres, M. G. 1998. Pain comparison after subcutaneous

- administration of single-dose formulation versus multidose formulation of epogen in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney. Dis.*, **32** (3): 470-474.
151. Stewart, W. E. 1980. The interferon system. Springer-Verland Wien. New York.
152. Stewart, W. E.; Somer, D. E.; Pierre, M. H. F. 1976. Stabilization of interferon. United States Patent 3981991.
153. Suárez, R.; Selman, E.; García, A.; Rodríguez, M. 1989. Evaluation of combined therapeutic using alpha interferon and radiotherapy in advanced cancer of the esofagus. *Interferon and neoplasms*, 39-45.
154. Tan, L. K.; Thenmozhiyal, J. C.; Ho, P. C. 2003. Stability of extemporaneously prepared saquinavir formulations. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **28** (6): 457-63.
155. Taniguchi, T.; Matsui, H.; Fujita, T.; Takaoka, C.; Kashima, N.; Yoshimoto, R.; Mauro, J. 1983. Structure and expresión of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, **302** (5906): 305-310.
156. Timasheff, S. N. 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophy. Biomol. Struct.*, **22**: 67-97.
157. Timasheff, S. N.; Arakawa, T. 1989. Stabilization of protein structure by solvents. Protein Structure: A practical approach. En: Creighton, T. E., ed. Protein structure: a practical approach. IRL Press. New York.
158. Tomizawa, H.; Yamada, H.; Hashimoto, Y.; Imoto, T. 1995. Stabilization of lysozyme against irreversible inactivation by alterations of the Asp-Gly sequences. *Protein Eng.*, **8** (10): 1023-1028.
159. Tsai, A. M.; van Zanten, J. H.; Betenbaugh, M. J. 1998. II. Electrostatic effect in the aggregation of heat-denatured RNase A and implications for protein additive design. *Biotechnol. Bioeng.*, **59** (3): 281-285.
160. Tsuda, T.; Uchiyama, M.; Sato, T.; Yoshino, H.; Tsuchiya, Y.; Ishikawa, S.; Ohmae, M.; Watanabe, S.; Miyake, Y. 1990. Mechanism and kinetics of secretion degradation in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.*, **79** (3): 223-227.
161. Tzannis, S. T.; Hrushesky, W. J.; Wood, P. A.; Przybycien, T. M. 1996. Irreversible inactivation of interleukin 2 in a pump-based delivery environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93** (11): 5460-5465.
162. UNICORN 4.12. User Reference Manual. Chapter 12-15, appendices 56-3207-97. Edition AA. 2002-05.

163. United States Pharmacopoeia 26, 2003. United States Pharmacopoeia Convention; Inc.: Rockville, MD.
164. Villasana, L.; Selman, E. 1989. Interferon and cancer of the rectus and anus. *Interferon and neoplasms*, 20-31.
165. Vispo, N.; Callejo, M.; Ojalvo, A.; Santos, A.; Chinea, G.; Gavilondo, J.; Araña, M. J. 1997. Displaying human IL-2 on the surface of bacteriophages. *Immunotechnology*, **3** (3): 185-193.
166. Voet, D.; Voet, J. G. 1990. Three-dimensional structure of proteins. 1st ed. Eds. Wiley y Sons. New York.
167. Volkin, D. B.; Klibanov, A. M. 1992. Alterations in the structure of proteins that cause their irreversible inactivation. *Develop. Biol. Standard*, **74**: 73-81.
168. Volkin, D. B.; Mach, H.; Middaugh, R. 1995. Degradative covalent reactions important to protein stability. *Meth. Mol. Biol.*, **40**: 35-63.
169. Volkin, D. B.; Sanyal, G.; Burke, C. J.; Middaugh, C. R. 2002. Preformulation studies as an essential guide to formulation development and manufacture of protein pharmaceuticals. *Pharm. Biotechnol.*, **14**: 1-46.
170. Vorauer-Uhl, K.; Wagner, A.; Katinger, H. 2002. Long term stability of rh-Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD)-liposomes prepared by the cross-flow injection technique following International Conference on Harmonisation (ICH)-guidelines. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **54** (1): 83-87.
171. Wang, W. 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.*, **185** (2): 129-188.
172. Wang, W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.*, **203** (1-2): 1-60.
173. Wang, Y. J.; Hanson, M. A. 1988. Parenteral formulations of protein and peptides: stability and stabilizers. *J. Parental Sci. Tech.*, **42**: S4-S24.
174. WHO. Technical Report Series, No. 771. 1988. Requirements for Human Interferons Made by Recombinant DNA Techniques.
175. WHO. Technical Report Series. 1992. WHO expert committee on Biological Standardization. Forty-second report.
176. Winkelhake, J. L.; Gauny, S. S. 1990. Human recombinant interleukin-2 as an experimental therapeutic. *Pharmacol. Rev.*, **42** (1): 1-28.
177. Won, C. M.; Molnar, T. E.; McKean, R. E.; Spenlehauer, G. A. 1998. Stabilizers against

- heat-induced aggregation of RPR 114849, an acidic fibroblast growth factor (AFGF). *Int. J. Pharm.*, **167** (1-2): 25-36.
178. Wong, D.; Parasrampur, J. 1997. Pharmaceutical excipients for the stabilization of proteins. *BioPharm*, 52-61.
179. Yang, Z.; Wang, J.; Lu, Q.; Xu, J.; Kobayashi, Y.; Takakura, T.; Takimoto, A.; Yoshioka, T.; Lian, C.; Chen, C.; Zhang, D.; Zhang, Y.; Li, S.; Sun, X.; Tan, Y.; Yagi, S.; Frenkel, E, P.; Hoffman, R. M. 2004. PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates. *Cancer Res.*, **64** (18): 6673-6678.
180. Yoshida, R.; Imanishi, J.; Oku, T.; Kishida, T.; Hayaishi, O. 1981. Induction of pulmonary indoleamine 2-3 dioxigenase by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (1): 129-132.
181. Yoshioka, S.; Aso, Y.; Izutsu, K.; Kojima, S. 1994. Is stability prediction possible for protein drugs? Denaturation kinetics of beta-galactosidase in solution. *Pharm Res.*, **11** (12): 1721-1725.
182. Yu, C. D.; Roosdorp, N.; Pushpala, S. 1988. Physical stability of a recombinant alpha 1-antitrypsin injection. *Pharm. Res.*, **5** (12): 800-802.
183. Yuen, P.; Kline, D. 1998. Stable, aqueous alpha interferon solution formulations. United States Patent 5766582.
184. Yuen, P.; Kline, D., 1999. Stable aqueous alpha interferon solution formulations. United States Patent 5935566.
185. Zhao, F.; Ghezzi-Schoneich, E.; Aced. G. I.; Hong, J.; Milby, T.; Schoneich, C. 1997. Metal-catalyzed oxidation of histidine in human growth hormone. Mechanism, isotope effects, and inhibition by a mild denaturing alcohol. *J. Biol. Chem.*, **272** (14): 9019-9029.
186. Zoon, K.; zur Nedden, D.; Enterline, J.; Manischewitz, J.; Dyer, D.; Boykins, R.; Gerrard, T. 1986. Chemical and Biological characterization of natural human lymphoblastoid interferon alphas. *Biology of the interferon system*. Eds., Martenus Nijkoff, Publishers, Dordrecht.

AUTOBIBLIOGRAFÍA

AUTOBIBLIOGRAFÍA

Publicaciones e informes técnicos

- **Ruiz, LI.**, Reyes, N., Duany, L., Franco, A., Aroche, K., Hardy, E. 2003. Long-term stabilization of recombinant human interferon α 2b in aqueous solution without serum albumin. *Int. J. Pharm.*, **264**: 57-72.
- **Ruiz, LI.**; Reyes, N.; Aroche, K.; Tolosa, V.; Simanca V.; Rodríguez, T.; Hardy, E. 2005. The influence of packaging material on the liquid stability of interferon alpha 2b. *J. Pharm. Pharmac. Sci.*, **8** (2): 207-216.
- **Ruiz, LI.**; Reyes, N.; Aroche, K., Báez, R.; Aldana, R.; Hardy, E. 2006. Some factors affecting the stability of Interferon alpha 2b in solution. *Biologicals.*, **34** (2): 15-19.
- **Ruiz, LI.**; Aroche, K., Reyes, N. 2006. The Aggregation of Recombinant Human Interferon Alpha 2b In Solution: A Technical Note. [AAPS PharmSciTech](#). **En prensa**.
- Registro sanitario: Heberon Alfa R 3 M, 5 M, 6 M y 10 M solución para inyección (B -03-014-J05; B -03-015-J05; B -03-016-J05; B -03-017-J05).
- **Ruiz, LI.**, Reyes, N., Hardy, E., Franco, A. 2001. Influencia del material de envase primario en la estabilidad del IFN α 2b en solución. Informe Técnico.
- **Ruiz, LI.**, Reyes, N., Aroche, K., Hardy, E. 2002. Estudio de la Agregación del IFN α 2b en solución. Efecto de las soluciones tampones y los excipientes. Informe Técnico.
- **Ruiz, LI.**, Reyes, N., Aroche, K., Duany, L., Franco, A., Hardy, E. 2002. Comparación de una formulación líquida y sin HSA de IFN α 2b, con productos patentados por otras compañías biotecnológicas. Informe Técnico.

Logros

- Nueva formulación de IFN α -2b líquido libre de albúmina humana. (Logro Institucional, 2001).
- HEBERON ALFA 2B LÍQUIDO: Obtención del registro sanitario de la formulación líquida del IFN α 2b y producción a escala industrial. (Logro Institucional, 2003).
- Metodología para el desarrollo de formulaciones líquidas de proteínas de interés farmacéutico sin albúmina sérica humana como estabilizante. (Logro Institucional, 2004).

- Nueva formulación líquida de IFN α 2b hu-rec con estabilidad prolongada en condiciones de vida de estante. (Logro Institucional, 2005).
- Importancia del estudio del material de envase primario en el desarrollo de formulaciones con proteínas (Logro institucional, 2005).

Registros concedidos

- Registro Sanitario del Heberon Alfa R 3 M, 5 M, 6 M y 10 M solución para inyección (B -03-014-J05; B -03-015-J05; B -03-016-J05; B -03-017-J05).

Ensayos clínicos autorizados

- Estudio de bioequivalencia entre una formulación líquida cubana de IFN α -2b y el INTRON A de la compañía Schering Plough.
- Estudio de bioequivalencia entre dos formulaciones líquidas de IFN alfa 2b (solicitado).

Transferencia a producción

- Introducción de la formulación líquida y sin albúmina de IFN α 2b hum-rec en el sistema productivo del Centro Nacional de Biopreparados.
- Transferencia de la formulación líquida y sin albúmina de IFN α 2b hum-rec con parabenos a la Dirección de Producción del CIGB.

Tesis relacionadas

- Tesis de Diploma de Licenciatura en Farmacia: "Estabilidad del IFN α 2b y la IL-2 en solución acuosa. Efecto de la temperatura, la concentración y los excipientes farmacéuticos". (Universitario, 2000). Estudiante: Harold Curiel; Tutor: **Llamil Ruiz**.
- Tesis de Diploma de Técnico en Farmacia Industrial: "Estudio de la agregación del interferón α 2b hr en solución. Efecto de las soluciones tampones y los excipientes". (Técnico medio, 2000). Estudiante: Kethia Aroche; Tutores: **Llamil Ruiz**, Nuria Reyes.
- Tesis de Diploma de Técnico en Química Industrial: "Influencia del Polietilén Glicol en la estabilidad del interferón α 2b hr". (Técnico medio, 2000). Estudiante: Yader

Colao; Tutores: **Llamil Ruiz**, Nuria Reyes.

- Tesis de Diploma de Licenciatura en Farmacia: "Factores que afectan la estabilidad del IFN α 2b y la IL-2". (Universitario, 2001). Estudiante: Katia Pérez; Tutor: **Llamil Ruiz**, Nuria Reyes.
- Tesis de Diploma de Licenciatura en Farmacia: "Influencia de algunas rutas degradativas en la función biológica del Interferón α 2b, la Interleucina-2 y el Factor de Crecimiento Epidérmico". (Universitario, 2002). Estudiante: Misleirys Zurita; Tutores: **Llamil Ruiz**, Eugenio Hardy.

Congresos nacionales e internacionales

En Biotecnología Habana '99. Avances en Biotecnología Moderna. Aplicaciones Biomédicas. (Nov 28-Dec 2, 1999. Habana, Cuba):

- **Ruiz, LI.**, Reyes, N., Curiel, H., González, Y., García, I., Hardy, E. Agregación del IFN α 2b hum-rec.

En XIII Seminario Científico CNIC 2000 (Junio 27-30, 2000. La Habana, Cuba):

- Reyes, N., **Ruiz, LI.**, Muñoz, Y., Franco, A., Duany, L., Sosa, R., González, Y., García, I., Herrera, L., Hardy, E. Estabilidad del IFN α 2b hum-rec en solución.

En el IV Encuentro Iberoamericano de las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias (Junio 26-30, 2000. La Habana, Cuba):

- Reyes, N., **Ruiz, LI.**, Muñoz, Y., Franco, A., Duany, L., Sosa, R., González, Y., García, I., Herrera, L., Hardy, E. Estabilidad del IFN α 2b hum-rec en solución. Influencia de la concentración de IFN y la temperatura.

En Ira Conferencia Internacional de Química (Diciembre 5-8, 2000. Villa Clara, Cuba):

- **Ruiz, LI.**, Curiel, H., Reyes, N., Aroche, K., González, Y., García, I., Hardy, E. Efecto de las soluciones tampones y los agente estresantes en la agregación del IFN α 2b hum-rec.

- **Ruiz, LI.**, Reyes, N., Franco, A., Duany, L., Moya, G., González, Y., García, I., Mestre, M., García, A., Herrera, L., Hardy, E. Desarrollo de una nueva formulación líquida de IFN α -2b hum-rec. Comparación con bases de formulaciones comerciales mediante estudios de estabilidad.

En Simposio Internacional de Interferón y Citoquinas (Diciembre 2–5, 2001. La Habana, Cuba):

- Hardy, E., **Ruiz, LI.**, Reyes, N. Desarrollo de una formulación de IFN α 2b hum-rec libre de ASH para uso clínico (Conferencia).

En Hepatología 2002 (Marzo 5-7, 2002. La Habana, Cuba):

- Lemus, N., **Ruiz, LI.**, Aroche, K., Duany, L., Fanco, A., Hardy, E. Desarrollo de formulaciones de IFN α 2b hum-rec más seguras, para el tratamiento de hepatitis virales. Parte 1.

En IV Congreso Nacional de Farmacología y terapéutica (Octubre, 2002. La Habana, Cuba):

- **Ruiz, LI.**, Reyes, N., López, M., Aroche, K., Sotolongo, J., Santana, E., Hardy, E. Seguridad de algunas de las formulaciones farmacéuticas evaluadas en el Departamento de Desarrollo de Formulaciones del CIGB.

En VI Encuentro Iberoamericano de las Ciencias Farmacéuticas y Alimenticias (Junio, 2004. La Habana, Cuba):

- Ruiz, LI., Rodríguez, I., Lezcano, F., Vega, J. L., Ferrero, J., Ojeda, Y., Díaz, Y., Hernández, J. M., Alderete, Y., Vega, M., Costa, L., Herrera, L. The stability of the HSA-free parenteral liquid formulation of rhIFN- α 2b guarantees the treatment of ophthalmic pathologies. (Tema libre).

En XXIX Congreso de la Federación de Farmacéuticos de Centroamérica y el Caribe y IX Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas (Noviembre, 2005. La Habana, Cuba):

- Ruiz, LI., Reyes, N., Aroche, K., Hardy, E. The influence of packaging material on the stability of interferon alpha 2b in solution (Tema libre).

Concursos

En X EXPO Provincial forjadores del Futuro (Diciembre 1–6, 2002. La Habana, Cuba):

- Hardy, E., **Ruiz, LI.**, Reyes, N., García, I., Herrera, L., Valenzuela, C. y col. Desarrollo de una formulación de IFN α 2b hum-rec libre de ASH para uso clínico. (Premio en el nivel provincial).

En XIV FORUM de Ciencia y Técnica en el nivel de base (Junio 24–28, 2002. La Habana, Cuba).

- Hardy, E., **Ruiz, LI.**, Reyes, N., García, I., Herrera, L., Valenzuela, C. y col. Desarrollo de una formulación de IFN α 2b hum-rec libre de ASH para uso clínico. (Premio relevante en el nivel de base).

En XXV Concurso Nacional Científico-Técnico Juvenil (Marzo, 2005. La Habana, Cuba)

- **Ruiz, LI.**, Reyes, N. y col. Desarrollo de formulaciones líquidas de IFN α 2b hum-rec e IL-2 hum-rec. Nuevas alternativas para la Salud Pública Cubana. (Premio Nacional; Premio Provincial al Impacto Económico). (Exposición oral).

ANEXOS

ANEXO I: Especificaciones de calidad del ingrediente farmacéutico activo de IFN α 2b hum-rec.

Especificaciones de calidad requeridas para la liberación del ingrediente farmacéutico activo de IFN α 2b hum-rec.

Ensayo	Referencia	Límite de aceptación
Características Organolépticas	PPO 4.09.140.98* BP 98	Líquido incoloro transparente, libre de partículas en suspensión
Actividad Específica	P.P.O. 4.09.008.91* P.P.O. 4.09.002.91* P.P.O. 4.09.307.96*	$\geq 1,4 \times 10^8$ UI/mg
Proteínas contaminantes de <i>E. coli</i>	P.P.O. 4.09.066.93*	≤ 100 ng/dosis
Inmunoidentificación, método de ELISA	P.P.O. 4.09.036.91*	Identificado
Determinación de ADN contaminante por Dot-Blot	P.P.O. 4.09.080.91*	≤ 10 pg/dosis
Determinación de pureza por RP-HPLC	P.P.O. 4.09.020.91*	Pico mayoritario correspondiente al IFN α 2b Hu-r en el tiempo de retención esperado
Determinación de pureza por SDS/PAGE	P.P.O. 4.09.004.91*	≥ 98 %; ≤ 2 % agregaciones moleculares sin degradación
Pirógenos	PNO 07.002** USP 27	Pasa la prueba
Esterilidad	P.P.O. 4.09.028.92 * USP 27	Pasa la prueba

* Procedimientos patrones de operaciones del CIGB

** Procedimientos normalizados de operaciones del Centro Nacional de Biopreparados

ANEXO II: Especificaciones de calidad de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec con parabenos como preservos.

Especificaciones de calidad requeridas para la liberación de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec con metil y propil parabenos como preservos.

Ensayo	Referencia	Límite de aceptación
Características Organolépticas	Método visual PPO 4.09.140.98*	Líquido incoloro, transparente y libre de partículas en suspensión
Pirógenos	PNO 07.002** USP 27 Dosis Conejo 150 000 UI/Kg PNO 07.001**	Pasa la prueba
Seguridad General	BP 98 Dosis 600 000 UI/animal	Pasa la prueba
Actividad Biológica	PPO 4.09.230.94*	De 6,4 a 15,6 x 10 ⁶ UI/mL
Inmunoidentificación	ELISA PPO 4.09.036.91*	Identificado
Pureza	HPLC-RP PPO 4.09.020.91*	≥ 95%
Esterilidad	Método filtración por membrana PPO 4.09.274.94* USP 27	Pasa la prueba
pH	PPO 4.09.068.92* USP 27	De 7,2 a 7,4
Volumen	PNO 01.028** USP 27	No menor de 1 mL
Contenido de polisorbato 80	PPO 4.09.063.01*	De 0,005 a 0,015 %

* Procedimientos patrones de operaciones del CIGB

** Procedimientos normalizados de operaciones del Centro Nacional de Biopreparados

ANEXO III: Especificaciones de calidad de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec con alcohol bencílico como preservos.

Especificaciones de calidad requeridas para la liberación de la formulación líquida de IFN α 2b hum-rec con acohol bencílico como preservos.

Ensayo	Referencia	Límite de aceptación
Características Organolépticas	Método visual PPO 4.09.140.98* PNO 07.002**	Líquido incoloro, transparente y libre de partículas en suspensión
Pirógenos	USP 27 Dosis Conejo 150 000 UI/Kg PNO 07.001**	Pasa la prueba
Seguridad General	BP 98 Dosis 600 000 UI/animal	Pasa la prueba
Actividad Biológica	PPO 4.09.230.94*	De 6,4 a 15,6 x 10 ⁶ UI/mL
Inmunoidentificación	ELISA PPO 4.09.036.91*	Identificado
Pureza	HPLC-RP PPO 4.09.020.91*	≥ 95%
Esterilidad	Método filtración por membrana PPO 4.09.274.94* USP 27	Pasa la prueba
pH	PPO 4.09.068.92* USP 27	De 7,2 a 7,6
Volumen	PNO 01.028** USP 27	No menor de 1 mL
Determinación de alcohol bencílico	PPO 4.09.149.03*	De 0,8 a 1,2 %
Contenido de polisorbato 80	PPO 4.09.063.01*	De 0,005 a 0,015 %

* Procedimientos patrones de operaciones del CIGB

** Procedimientos normalizados de operaciones del Centro Nacional de Biopreparados

ANEXO IV: Flujo de caja para cada uno de las variantes analizadas

Flujo de caja para el caso base.

Años	Volumen Venta (bbos)	Ventas (\$)	Costos (\$)	Ganancias (\$)	Impuestos (\$)	Factor de descuento	Inversión (\$)	Ganancia neta (\$)	Flujo efectivo descontado (\$)	NPV (\$)
0	-	\$0	\$0	\$0	0	1	\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710
1	100 000	\$ 395 000	\$ 199 800	\$ 195 200	93696	0,909091	\$ 0	\$ 101 504	\$ 92 276	-\$ 164 434
2	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,826446	\$ 0	\$ 203 008	\$ 167 775	\$ 3 342
3	300 000	\$ 1 185 000	\$ 599 400	\$ 585 600	281088	0,751315	\$ 0	\$ 304 512	\$ 228 784	\$ 232 126
4	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,683013	\$ 0	\$ 406 016	\$ 277 314	\$ 509 440
5	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,620921	\$ 0	\$ 406 016	\$ 252 104	\$ 761 544
6	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,564474	\$ 0	\$ 406 016	\$ 229 185	\$ 990 730
7	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,513158	\$ 0	\$ 406 016	\$ 208 350	\$ 1 199 080
8	300 000	\$ 1 185 000	\$ 599 400	\$ 585 600	281088	0,466507	\$ 0	\$ 304 512	\$ 142 057	\$ 1 341 137
9	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,424098	\$ 0	\$ 203 008	\$ 86 095	\$ 1 427 232
10	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,385543	\$ 0	\$ 203 008	\$ 78 268	\$ 1 505 501

Volumen de venta máximo	400 000 bulbos
Precio	\$3,95
Costo unitario	\$2,00
Inversión	\$256 710
Interés	10%
Tasa impositiva	48 %

Flujo de caja para una disminución de las ventas del 50 %.

Años	Volumen Ventas (bbos)	Ventas (\$)	Costos (\$)	Ganancias (\$)	Impuestos (\$)	Factor de descuento	Inversión (\$)	Ganancia neta (\$)	Flujo efectivo descontado (\$)	NPV (\$)
0	-	\$ 0	\$ 0	\$ 0	0	1	\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710
1	50 000	\$ 197 500	\$ 99 900	\$ 97 600	46848	0,90909091	\$ 0	\$ 50 752	\$ 46 138	-\$ 210 572
2	100 000	\$ 395 000	\$ 199 800	\$ 195 200	93696	0,82644628	\$ 0	\$ 101 504	\$ 83 888	-\$ 126 684
3	150 000	\$ 592 500	\$ 299 700	\$ 292 800	140544	0,7513148	\$ 0	\$ 152 256	\$ 114 392	-\$ 12 292
4	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,68301346	\$ 0	\$ 203 008	\$ 138 657	\$ 126 365
5	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,62092132	\$ 0	\$ 203 008	\$ 126 052	\$ 252 417
6	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,56447393	\$ 0	\$ 203 008	\$ 114 593	\$ 367 010
7	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,51315812	\$ 0	\$ 203 008	\$ 104 175	\$ 471 185
8	150 000	\$ 592 500	\$ 299 700	\$ 292 800	140544	0,46650738	\$ 0	\$ 152 256	\$ 71 029	\$ 542 214
9	100 000	\$ 395 000	\$ 199 800	\$ 195 200	93696	0,42409762	\$ 0	\$ 101 504	\$ 43 048	\$ 585 261
10	100 000	\$ 395 000	\$ 199 800	\$ 195 200	93696	0,38554329	\$ 0	\$ 101 504	\$ 39 134	\$ 624 395

Volumen de venta máximo	200 000 bulbos
Precio	\$3,95
Costo unitario	\$2,00
Inversión	\$256 710
Interés	10%
Tasa impositiva	48 %

Flujo de caja para una disminución del precio del 50 %.

Años	Volumen Ventas (bbos)	Ventas (\$)	Costos (\$)	Ganancias (\$)	Impuestos (\$)	Factor de descuento	Inversión (\$)	Ganancia neta (\$)	Flujo efectivo descontado (\$)	NPV (\$)
0	-	\$ 0	\$ 0	\$ 0	0	1	\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710
1	100 000	\$ 197 500	\$ 199 800	-\$ 2 300	-1104	0,90909091	\$ 0	-\$ 1 196	-\$ 1 087	-\$ 257 797
2	200 000	\$ 395 000	\$ 399 600	-\$ 4 600	-2208	0,82644628	\$ 0	-\$ 2 392	-\$ 1 977	-\$ 259 774
3	300 000	\$ 592 500	\$ 599 400	-\$ 6 900	-3312	0,7513148	\$ 0	-\$ 3 588	-\$ 2 696	-\$ 262 470
4	400 000	\$ 790 000	\$ 799 200	-\$ 9 200	-4416	0,68301346	\$ 0	-\$ 4 784	-\$ 3 268	-\$ 265 737
5	400 000	\$ 790 000	\$ 799 200	-\$ 9 200	-4416	0,62092132	\$ 0	-\$ 4 784	-\$ 2 970	-\$ 268 708
6	400 000	\$ 790 000	\$ 799 200	-\$ 9 200	-4416	0,56447393	\$ 0	-\$ 4 784	-\$ 2 700	-\$ 271 408
7	400 000	\$ 790 000	\$ 799 200	-\$ 9 200	-4416	0,51315812	\$ 0	-\$ 4 784	-\$ 2 455	-\$ 273 863
8	300 000	\$ 592 500	\$ 599 400	-\$ 6 900	-3312	0,46650738	\$ 0	-\$ 3 588	-\$ 1 674	-\$ 275 537
9	200 000	\$ 395 000	\$ 399 600	-\$ 4 600	-2208	0,42409762	\$ 0	-\$ 2 392	-\$ 1 014	-\$ 276 552
10	200 000	\$ 395 000	\$ 399 600	-\$ 4 600	-2208	0,38554329	\$ 0	-\$ 2 392	-\$ 922	-\$ 277 474

Volumen de venta máximo	200000 bulbos
Precio	\$1,98
Costo unitario	\$2,00
Inversión	\$256 710
Interés	10%
Tasa impositiva	48 %

Flujo de caja para un aumento de los costos del 50 %.

Años	Volumen Ventas (bbos)	Ventas (\$)	Costos (\$)	Ganancias (\$)	Impuestos (\$)	Factor de descuento	Inversión (\$)	Ganancia neta (\$)	Flujo efectivo descontado (\$)	NPV (\$)
0	-	\$ 0	\$ 0	\$ 0	0	1	\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710
1	100 000	\$ 395 000	\$ 299 700	\$ 95 300	45744	0,90909091	\$ 0	\$ 49 556	\$ 45 051	-\$ 211 659
2	200 000	\$ 790 000	\$ 599 400	\$ 190 600	91488	0,82644628	\$ 0	\$ 99 112	\$ 81 911	-\$ 129 748
3	300 000	\$ 1 185 000	\$ 899 100	\$ 285 900	137232	0,7513148	\$ 0	\$ 148 668	\$ 111 696	-\$ 18 052
4	400 000	\$ 1 580 000	\$ 1 198 800	\$ 381 200	182976	0,68301346	\$ 0	\$ 198 224	\$ 135 390	\$ 117 338
5	400 000	\$ 1 580 000	\$ 1 198 800	\$ 381 200	182976	0,62092132	\$ 0	\$ 198 224	\$ 123 082	\$ 240 419
6	400 000	\$ 1 580 000	\$ 1 198 800	\$ 381 200	182976	0,56447393	\$ 0	\$ 198 224	\$ 111 892	\$ 352 312
7	400 000	\$ 1 580 000	\$ 1 198 800	\$ 381 200	182976	0,51315812	\$ 0	\$ 198 224	\$ 101 720	\$ 454 032
8	300 000	\$ 1 185 000	\$ 899 100	\$ 285 900	137232	0,46650738	\$ 0	\$ 148 668	\$ 69 355	\$ 523 387
9	200 000	\$ 790 000	\$ 599 400	\$ 190 600	91488	0,42409762	\$ 0	\$ 99 112	\$ 42 033	\$ 565 420
10	200 000	\$ 790 000	\$ 599 400	\$ 190 600	91488	0,38554329	\$ 0	\$ 99 112	\$ 38 212	\$ 603 632

Volumen de venta máximo	400 000 bulbos
Precio	\$3,95
Costo unitario	\$3,00
Inversión	\$256 710
Interés	10%
Tasa impositiva	48 %

Flujo de caja para un aumento del interés del 50 %.

Años	Volumen Ventas (bbos)	Ventas (\$)	Costos (\$)	Ganancias (\$)	Impuestos (\$)	Factor de descuento	Inversión (\$)	Ganancia neta (\$)	Flujo efectivo descontado (\$)	NPV (\$)
0	-	\$ 0	\$ 0	\$ 0	0	1	\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710	-\$ 256 710
1	100 000	\$ 395 000	\$ 199 800	\$ 195 200	93696	0,86956522	\$ 0	\$ 101 504	\$ 88 264	-\$ 168 446
2	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,75614367	\$ 0	\$ 203 008	\$ 153 503	-\$ 14 942
3	300 000	\$ 1 185 000	\$ 599 400	\$ 585 600	281088	0,65751623	\$ 0	\$ 304 512	\$ 200 222	\$ 185 279
4	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,57175325	\$ 0	\$ 406 016	\$ 232 141	\$ 417 420
5	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,49717674	\$ 0	\$ 406 016	\$ 201 862	\$ 619 282
6	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,4323276	\$ 0	\$ 406 016	\$ 175 532	\$ 794 814
7	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,37593704	\$ 0	\$ 406 016	\$ 152 636	\$ 947 450
8	300 000	\$ 1 185 000	\$ 599 400	\$ 585 600	281088	0,32690177	\$ 0	\$ 304 512	\$ 99 546	\$ 1 046 996
9	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,28426241	\$ 0	\$ 203 008	\$ 57 708	\$ 1 104 703
10	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,24718471	\$ 0	\$ 203 008	\$ 50 180	\$ 1 154 884

Volumen de venta máximo	400 000 bulbos
Precio	\$3,95
Costo unitario	\$2,00
Inversión	\$256 710
Interés	15%
Tasa impositiva	48 %

Flujo de caja para un aumento de la inversión del 50%.

Años	Volumen Ventas (bbos)	Ventas (\$)	Costos (\$)	Ganancias (\$)	Impuestos (\$)	Factor de descuento	Inversión (\$)	Ganancia neta (\$)	Flujo efectivo descontado (\$)	NPV (\$)
0	-	\$ 0	\$ 0	\$ 0	0	1	\$ 385 065	-\$ 385 065	-\$ 385 065	-\$ 385 065
1	100 000	\$ 395 000	\$ 199 800	\$ 195 200	93696	0,90909091	\$ 0	\$ 101 504	\$ 92 276	-\$ 292 789
2	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,82644628	\$ 0	\$ 203 008	\$ 167 775	-\$ 125 013
3	300 000	\$ 1 185 000	\$ 599 400	\$ 585 600	281088	0,7513148	\$ 0	\$ 304 512	\$ 228 784	\$ 103 771
4	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,68301346	\$ 0	\$ 406 016	\$ 277 314	\$ 381 085
5	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,62092132	\$ 0	\$ 406 016	\$ 252 104	\$ 633 189
6	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,56447393	\$ 0	\$ 406 016	\$ 229 185	\$ 862 375
7	400 000	\$ 1 580 000	\$ 799 200	\$ 780 800	374784	0,51315812	\$ 0	\$ 406 016	\$ 208 350	\$ 1 070 725
8	300 000	\$ 1 185 000	\$ 599 400	\$ 585 600	281088	0,46650738	\$ 0	\$ 304 512	\$ 142 057	\$ 1 212 782
9	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,42409762	\$ 0	\$ 203 008	\$ 86 095	\$ 1 298 877
10	200 000	\$ 790 000	\$ 399 600	\$ 390 400	187392	0,38554329	\$ 0	\$ 203 008	\$ 78 268	\$ 1 377 146

Volumen de venta máximo	400 000 bulbos
Precio	\$ 3,95
Costo unitario	\$2,00
Inversión	\$385 065
Interés	10 %
Tasa impositiva	48 %

Flujo de caja para la combinación de todas las variantes.

Años	Volumen Ventas (bbos)	Ventas (\$)	Costos (\$)	Ganancias (\$)	Impuestos (\$)	Factor de descuento	Inversión (\$)	Ganancia neta (\$)	Flujo efectivo descontado (\$)	NPV (\$)
0	-	\$ 0	\$ 0	\$ 0	0	1	\$ 385 065	-\$ 385 065	-\$ 385 065	-\$ 385 065
1	50 000	\$ 98 750	\$ 149 850	-\$ 51 100	-24528	0,86956522	\$ 0	-\$ 26 572	-\$ 23 106	-\$ 408 171
2	100 000	\$ 197 500	\$ 299 700	-\$ 102 200	-49056	0,75614367	\$ 0	-\$ 53 144	-\$ 40 184	-\$ 448 356
3	150 000	\$ 296 250	\$ 449 550	-\$ 153 300	-73584	0,65751623	\$ 0	-\$ 79 716	-\$ 52 415	-\$ 500 770
4	200 000	\$ 395 000	\$ 599 400	-\$ 204 400	-98112	0,57175325	\$ 0	-\$ 106 288	-\$ 60 771	-\$ 561 541
5	200 000	\$ 395 000	\$ 599 400	-\$ 204 400	-98112	0,49717674	\$ 0	-\$ 106 288	-\$ 52 844	-\$ 614 385
6	200 000	\$ 395 000	\$ 599 400	-\$ 204 400	-98112	0,4323276	\$ 0	-\$ 106 288	-\$ 45 951	-\$ 660 336
7	200 000	\$ 395 000	\$ 599 400	-\$ 204 400	-98112	0,37593704	\$ 0	-\$ 106 288	-\$ 39 958	-\$ 700 293
8	150 000	\$ 296 250	\$ 449 550	-\$ 153 300	-73584	0,32690177	\$ 0	-\$ 79 716	-\$ 26 059	-\$ 726 353
9	100 000	\$ 197 500	\$ 299 700	-\$ 102 200	-49056	0,28426241	\$ 0	-\$ 53 144	-\$ 15 107	-\$ 741 460
10	100 000	\$ 197 500	\$ 299 700	-\$ 102 200	-49056	0,24718471	\$ 0	-\$ 53 144	-\$ 13 136	-\$ 754 596

Volumen de Venta máximo	200 000 bulbos
Precio	\$ 1,98
Costo unitario	\$3,00
Inversión	\$385 065
Interés	15 %
Tasa impositiva	48 %

ANEXO V: Certificado de la firma de una empresa mixta entre Cuba y la República Popular China.

Nº 0032392



中华人民共和国外商投资企业
批准证书

CERTIFICATE OF APPROVAL
FOR ESTABLISHMENT OF ENTERPRISES WITH FOREIGN
INVESTMENT IN THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

电脑编号 2201000382
NUMBER IN COMPUTER

批准号 外经贸 长府外资字[2003] 0102 号
APPROVAL NUMBER

进出口企业代码 2201748448227
CODE FOR IMPORT AND EXPORT ENTERPRISE

批准日期 二〇〇三 年 十二月 三日
DATE OF APPROVAL YEAR / MONTH / DAY

发证日期 二〇〇三 年 十二月 一日
DATE OF ISSUE YEAR / MONTH / DAY



企业名称 NAME OF ENTERPRISE	中文 CHINESE	长春海伯尔生物技术有限责任公司	
	英文 ENGLISH	ChangChun Heber Co., Ltd.	
企业地址 ADDRESS	长春东湖生态经济开发区 CHANGCHUN DONGHU BIOECONOMICAL TECHNOLOGY DEVELOPING ZONE		
企业类型 TYPE OF BUSINESS	中外合资企业 JOINT VENTURE	经营年限 DURATION OF OPERATION	拾年 10Y
	投资总额 TOTAL INVESTMENT		
注册资本 REGISTERED CAPITAL		壹亿壹仟肆佰贰拾捌万伍仟柒佰壹拾肆元人民币 RMB114, 285, 714. 00	
经营范围 BUSINESS SCOPE		伍仟柒佰壹拾肆万贰仟捌佰伍拾柒元人民币 RMB 57, 142, 857. 00	
经营范围 BUSINESS SCOPE		研发、生产、销售生物制品。 RESEARCH, MANUFACTURE AND SALE BIOLOGICAL PRODUCTS	
投资者名称 (中、英文) NAME OF INVESTORS (IN CHINESE AND ENGLISH)	注册地 PLACE OF REGISTRATION	出资额 CAPITAL CONTRIBUTION	
甲方: 吉林省宝邑生物技术有限责任公司 PART A: JILIN BOYCE BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO. LTD	中国	出资3714. 2857 万元人民币 RMB37, 142, 857. 00	
乙方: 长春生物制品研究所 PART B: CHANGCHUN INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS	中国	出资285. 7143万 元人民币 RMB2, 857, 143. 00	
丙方: 古巴海伯尔生物技术公司 PART C: HEBER BIOTECH S. A. CUBA	古巴	出资1714. 2857 万元人民币 RMB17, 142, 857. 00	

副本 2

ANEXO VI: Primera página de García-García y col., 2004.

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Drug Inf. J. 2004; 40: 271-282

10.1191/0964646003di100120d

© 2004 Adis Data Information B.V. All rights reserved.

Bioequivalence of Two Recombinant Interferon α -2b Liquid Formulations in Healthy Male Volunteers

Idrién García-García,¹ Carlos Alberto González-Delgado,² Carmen Valenzuela-Silva,¹ Francisco Hernández-Bernal,¹ Joel Ferrero-Bibilonis,¹ Ramon Soto-Hernández,² Majel Cernautes-Llano,¹ Jorge Ducange,⁴ Armando Correa-Fernández,² Lourdes Olivares-Ruano³ and Pedro Lopez-Seuán¹

1 Clinical Trials Division, Center for Biological Research, Havana, Cuba

2 National Center for Toxicology, 'Carlos J. Finlay' University Hospital, Havana, Cuba

3 Center for Medical-Surgical Research, Havana, Cuba

4 University of Havana, Institute of Pharmacy and Food, Havana, Cuba

Abstract

Objective: Interferon (IFN) α -2b is a protein with antiviral, antiproliferative and immunoregulatory properties that is approved for several clinical indications. A new liquid, albumin-free, IFN α -2b formulation has recently been developed. This study aimed to evaluate the equivalence of the pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety properties of the new formulation with a reference one in healthy male volunteers.

Methods: A randomized, crossover, double-blind study with a 3-week washout period was performed in which Heberon Alfa B® (formulation A) and Viraferon® (formulation B) were compared. A single 20×10^6 IU IFN α -2b dose was administered subcutaneously to 14 apparently healthy male subjects. Serum IFN level was measured over 48 hours by enzyme immunoassay (EIA) and by antiviral activity titration. Clinical and laboratory variables were determined, as were pharmacodynamic and safety criteria.

Results: Groups were homogeneous with regard to all demographic and baseline variables. Pharmacokinetic comparison by EIA did not show differences between the formulations: area under the curve (AUC) 2572 versus 2561 ng \cdot h/L, maximum plasma concentration (C_{max}) 318 versus 354 ng/L, time to C_{max} (t_{max}) 8.2 versus 8.5h, elimination half-life ($t_{1/2}$) 5.87 versus 6.08h, terminal elimination rate (λ) 0.122 versus 0.118h⁻¹, and mean residence time (MRT) 10.9 versus 12.0h for formulations A and B, respectively. The differences never reached 20%, which is the clinically significant threshold. The 90% confidence interval of the ratio between them was in all cases within the 0.8, 1.25 range. The two formulations were clinically equivalent with regard to serum IFN antiviral activity titration (0.8, 1.25 criterion) regarding their pharmacokinetic parameters. There were no significant differences with respect to the pharmacodynamic variables: serum β_2 -microglobulin and temperature increase. Heart rate and blood pressure changes did not differ either. Both products provoked similar haematological count