

Control de calidad de productos biológicos recombinantes

IBARZ M., María Teresa*

RESUMEN

Los avances en el área de la Biotecnología y especialmente en las técnicas del ADN recombinante han permitido elaborar a gran escala, productos biológicos que hasta el momento eran de difícil obtención, tales como la hormona de crecimiento humano, la insulina humana, interferones, entre otros, significando ventajas adicionales al evitar los riesgos de transmisión de agentes patógenos como el virus HIV. Sin embargo, la aparición de reacciones adversas como el desarrollo de anticuerpos contra el producto recombinante han demostrado la necesidad de estrictos controles de calidad y normas sanitarias específicas para su regulación.

Este trabajo es una exposición actualizada de las técnicas del ADN recombinante, su aplicación a la obtención de productos de utilidad terapéutica, los métodos de control de calidad y las normas nacionales e internacionales que los regulan.

Palabras claves: Normas, Controles, Productos ADN, Biotecnología.

SUMMARY

The biotechnology advances and specially in recombinant DNA techniques have allowed to obtain biological products on a large scale which, until now were hard to obtain as the human growth hormone, human insuline, interferons among others; indicating additional advantages to avoid risks of contagion for pathogen agents of HIV. However, the appearance of adverse reactions as a result of the development of antibodies against the recombinant products have demonstrated the necessity of strict quality controls and specific sanitary rules to its regulation. This work is an updated position about the recombinant DNA techniques, its application to obtain products of therapeutic profit, quality control methods and the national and international rules which control it.

Key words: Norms, Controls, rDNA Products, Biotechnology.

INTRODUCCION

Gracias a la técnica del ADN recombinante se ha logrado la obtención a gran escala, de productos de gran importancia terapéutica.

Su producción requiere de un minucioso sistema de control de calidad y excelentes prácticas de manufactura en cada una de las etapas, con el fin de garantizar la identidad, pureza, potencia y seguridad del producto final.

A una década de su uso clínico, las experiencias han resaltado esta necesidad. El desarrollo de reacciones adversas, tales como las desencadenadas a nivel del sistema inmune, debido a la presencia de contaminantes inmunogénicos o por no ser "copia fiel" de la molécula natural, han despertado el alerta de las autoridades sanitarias de otros países y este hecho no podía pasar inadvertido en nuestro país.

Por tal razón, en 1992, la Junta Revisora de Especialidades Farmacéuticas aprueba las Normas Nacionales para el control de productos ADN recombinantes,

incluidas en el capítulo Biotecnología de las Normas de dicha Junta.

¿En qué consiste la técnica del ADN recombinante?

En primer lugar debe clonarse el gen, es decir, lograr aislamiento del fragmento de ADN que codifica una proteína deseada pero además, las secuencias reguladoras que presenta el ADN y que controlan la síntesis de la proteína deben ser sustituidas por otras más potentes y reconocidas por las enzimas del huésped. Luego, el fragmento aislado y modificado es introducido en un vector de clonación, un virus de colibacilo en el caso de emplear la *E. coli* como huésped. El bacteriófago o plásmido recombinante así obtenido, infecta a los colibacilos transformándolos en productores de la proteína deseada.

La *E. coli* se ha convertido en el "caballito de batalla" de la ingeniería genética, siendo el huésped más utilizado. La razón más importante para ello es que genéticamente ha sido bien estudiada, además de ser fácil de cultivar; sin embargo, también presenta inconvenientes, tales como su potencial patogenicidad y pirogenicidad.

* División de Control Nacional de Productos Biológicos

Otros huéspedes utilizados son el *Bacillus subtilis*, la levadura de cerveza o *saccharomyces cerevisiae*, en la cual se produce la vacuna de hepatitis B, el *aspergillus niger* y células de mamífero tales como fibroblastos.

El proceso a nivel industrial.

En el caso del Interferón-alfa (IFN-A)(ver esquema)

El interferón sintetizado es insoluble e inactivo, por ello el proceso de purificación debe garantizar además, su renaturalización a la forma soluble y activa y además baja obtención de interferón acetilado u oligómeros que pueden dar origen a reacciones adversas al ser administrados al humano.

El proceso a nivel industrial

Donantes humanos → Leucocitos ← Inducción con virus sendai

Obtención del ARNm específico para IFN-alfa

Obtención del gen de IFN-alfa

Inserción en el plásmido ± extremos artificiales

Transformación de la cepa de *E. coli* (K-12)

Primer cultivo semilla

Segundo cultivo semilla

Fermentación (Interferón como agregado celular insoluble)

Ruptura de las células (Ultrasonido, cambios de PH)

Purificación

(Desalinización cromatográfica, cromatografía de alta afinidad con anticuerpos monoclonales anti-IFN-alfa, intercambio catiónico en sistemas de alta resolución)

El control de los productos obtenidos por la técnica del ADN recombinante, se fundamenta en las siguientes interrogantes:

- ¿La célula transformada es estable?
- ¿La estructura y conformación espacial de la proteína obtenida es copia fiel de la molécula original?
- ¿La proteína es activa y estable?
- ¿Hay proteínas del hospedero en el producto final o sustancias producidas por éste, tales como endotoxinas bacterianas?
- ¿Cuál es el contenido de ADN plasmídico en el producto final?
- ¿Hay presencia de otros contaminantes en el producto final, tales como IgG de ratón, provenientes de los anticuerpos monoclonales empleados en el proceso de purificación?
- ¿Presenta algún tipo de toxicidad en animales de experimentación?

Estas interrogantes son cubiertas con los siguientes controles:

- a) Validación de los clones celulares:
 - Análisis de la secuencia nucleotídica del segmento clonado empleando mapas peptídicos con enzimas de restricción.
 - Caracterización del vector de expresión.
 - Estudio del genotipo y fenotipo de la célula huésped empleada.
 - Evaluación de la estabilidad de las células huésped, vector de expresión y secuencia nucleotídica que codifica por el producto.
- b) Control del banco de células productoras:
 - Control de pureza.
 - Determinación de agentes adventicios: bacterias, hongos, levaduras, virus (incluyendo retrovirus) y micoplasmas.
- c) Una vez que el producto ha sido purificado.
 - 1) Caracterización físico-química:
 - Mapa peptídico
 - Composición de aminoácidos.
 - Electroforesis en gel de poliacrilamida y punto isoelectrónico.
 - Análisis cromatográfico: HPLC, cromatografía de afinidad.
 - Espectrometría de masas.
 - Microscopía electrónica.
 - Discoísmo circular.
 - 2) Caracterización biológica:
 - Métodos "in vivo".
 - Métodos "in vitro".

3) Pruebas de estabilidad.

4) Pruebas para contaminantes:

- Determinación de pirógenos.
- Contaminación viral.
- Presencia de ácido nucleico.
- Otros posibles contaminantes derivados del método de obtención y producción.

Todos estos controles de calidad deben ser realizados en cada ciclo de producción y en las diferentes etapas del proceso. Debe recordarse que el sistema de producción son células vivas que pueden sufrir mutaciones que alteren las propiedades de la proteína a obtener, con consecuencias potencialmente adversas para el paciente. En una población de células mutantes producen una considerable cantidad de proteínas alteradas e incrementan su representación en la población después de múltiples generaciones.

La aplicación de las diferentes pruebas de control de calidad permite determinar de manera oportuna las posibles alteraciones, por ejemplo:

Mutaciones en las que existe conservación de aminoácidos, pueden no ser detectadas al realizar un mapa peptídico e incluso esa alteración puede no afectar la actividad "in vitro" pero puede significar cambios importantes en la actividad "in vivo" del producto.

Las experiencias actuales han llevado a la necesidad de la aplicación de métodos de caracterización, control biológico y toxicológico, pero además análisis del ácido nucleico, lo cual permite determinar las mutaciones sufridas por la célula que pudieran haber afectado al producto obtenido.

En los productos terminados, el análisis del ácido nucleico puede realizarse después de ser amplificado utilizando la reacción de polimerasa en cadena (PCR).

Otro punto importante en el control de un biológico recombinante, es demostrar su similitud con el producto de origen natural, cuando se trate de insulina, hormona de crecimiento, interferones, entre otros. Para ello es necesario la comparación de los resultados analíticos con respecto a un patrón natural. La finalidad es evitar el desarrollo de anticuerpos contra el producto en los pacientes que lo reciban. Además de este control, se exigen los resultados de estudios clínicos de eficacia del producto, en los cuales se evalúe la formación de anticuerpos.

Controles a nivel de las autoridades sanitarias

Las actuales normas nacionales para el control de los productos ADN recombinantes permiten evaluar los métodos de obtención, producción, purificación, controles de calidad, estudios de farmacocinética, farmacodinamia y

toxicología preclínica y clínica de cada producto sometido a registro, así como el análisis del producto final y cuando se considere necesario, la evaluación de muestras de la sustancia activa purificada.

El nivel de exigencia es comparable al de las normas internacionales (Organización Mundial de la Salud, Food and Drugs Administration y la Comunidad Europea) y han permitido garantizar la calidad de los productos ADN recombinantes que penetran al mercado terapéutico venezolano. Sin embargo, estas normas deben ser continuamente evaluadas y actualizadas conforme a los avances en esta área, con el fin de asegurar que el balance riesgo-beneficio entre un producto ADN recombinante y un producto natural se incline siempre hacia esta revolucionaria tecnología que aporta múltiples beneficios al ser humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amgen Laboratory, Amgen Research, 4, 1993.
2. Amgen Laboratory, Helix, 1 (2), 1992.
3. Anicetti V., Keyt B., and Hancock W. *Tibtech*, 7:342-48, 1989.
4. Antonelli G., Currenti M., Turriziana O., and Diazani F. *JID*, 163:882-885, April 1991.
5. Biopharm, Biotechnology Division, Feb. 1991.
6. Commission of the European Communities, *Tibtech*, 5 Dic. 1987.
7. Davies Julian, *Mundo Científico*, 71 (7): 704-713.
8. Food and Drug Administration, Draft, April 1985.
9. FDA, Federal Register, 51 (88), 1986.
10. FDA, 18, Nov. 1987.
11. FDA Supplement, April 6, 1992.
12. Frederic M. Richards, *Scientific American*, January 1991.
13. Gaillardin C., and Heslot H. *Mundo Científico*, 71 (7): 716-727.
14. Grander D., Oberg K., Lundqvist M., Janson E., Erickson B., and Einhorn S., *The Lancet*, 336:337-340.
15. Holliger, Lennon and Margolis, Williams and Wilkins, 643-645, 1991.
16. Hugo W.B., and Russell A.D. *Pharmaceutical Microbiology* 438-451, 1986.
17. Léveque F. *Mundo Científico*, 100 (10): 277-285.
18. Lubiniecki A.S. Academic Press, 1988.
19. Maurice John. *Mundo Científico*, 100 (10): 277-285.
20. Sauer F. *Journal of Biological Standardization*, 17: 203-213, 1989.
21. World Health Organization, *Bulletin*, 61 (6): 897-911, 1983.
22. WHO, 68, 1986.
23. WHO, Technical Report Series, 747, 1987.
24. WHO, *Pharm.* 89, 542/Bs. 89, 1609, 1988.
25. WHO, The International Task Force on Hepatitis E Immunization, Republic of Camerouns, 1991.