precipitación etanólica aumenta la agregación a partir de un valor de carga igual a 1,6 mg/mL.

Adicionalmente se estudió el comportamiento del funcionamiento de la columna de hidrofobicidad en cuanto a pureza final del eluato para los distintos valores de carga, dando como resultado que los niveles de pureza final no se afectan con los incrementos de carga hasta el valor de 3,2 mg/mL (Fig 3.17).

A partir de la carga 3,2 mg/mL se observó pérdidas de la Epohr en la fracción no absorbida al gel, esto indica que la máxima capacidad del gel de hidrofobicidad es menor a 3,2 mg/mL (Fig 3.17, línea 3).

Figura 3.17. Eiectroforesis SDS-PAGE 15 % realizada a los eiuatos obtenidos para cada valor de carga estudiado. De izquierda a derecha: 1- Peso molecular, 2,4,5,6,7- Eluato de las cargas 3,2; 1,6; 1; 0,4 y 0,2 mg/mL respectivamente, 3-fracción no absorbida carga 3,2 mg/mL, 8- Material de referencia. Se aplicaron volúmenes iguales de muestras..

• Influencia de la concentración de la proteína sobre el recobrado de la precipitación etanólica

Si se quisiera introducir la dilución con etanol al 50 % como solución tecnológica al problema de agregación en el proceso actual, implicaría en primer lugar una dilución excesiva de la muestra a procesar, provocando disminución de la productividad del proceso. Además de mantenerse el paso de precipitación etanólica como método de concentración de la muestra, se podría este afectar por las diluciones realizada, ya que está reportada (Scopes, 1994) la disminución de los recobrados de los procesos de precipitación a medida que disminuye la concentración de la proteína.

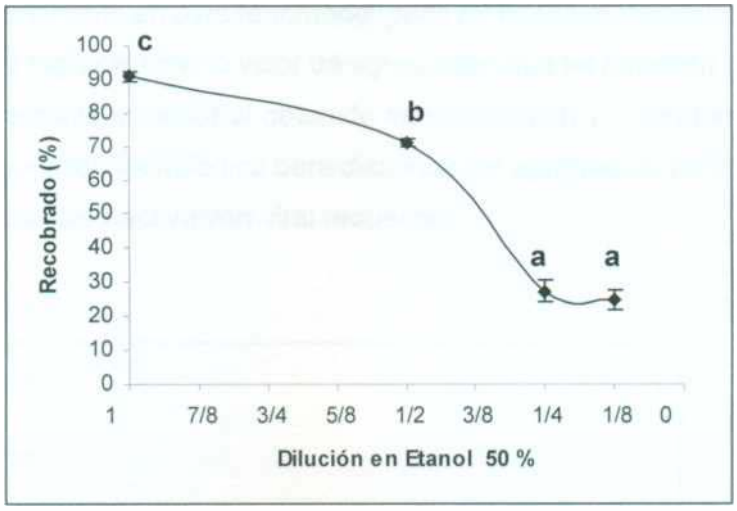

Figura 3.18. Estudio de la influencia de la dilución con etanol al 50 % en el recobrado de la precipitación etanólica. Las diluciones estudiadas fueron 1/2, 1/4 y 1/8. Se compararon los puntos experimentales utilizando el paquete estadístico Statgraphics. Plus. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas (p≥ 0, 05)

Lo antes expuesto se demuestra con los resultados obtenidos en el experimento de precipitación etanólica de cada variante de dilución (Fig 3.18 y Anexo 17). Se obtuvo diferencias significativas de la muestra sin diluir con respecto a las restantes diluciones (p= 0,0001).El recobrado disminuye de un valor inicial de 90 % hasta 25 % para el último valor de dilución. Este resultado imposibilita la aplicación de este cambio tecnológico como vía de solución al problema de agregación. Es también cierto que se podría analizar como paso alternativo de concentración el empleo de membranas de ultrafiltracíón, lo cual ya está siendo aplicado en el proceso de producción.

- ***Estudio de la influencia de la dilución del eluato del gel de Hidrofobicidad con el tampón PBS***

Como estudios adicionales se realizaron experimentos de dilución del eluato del Butilo con el tampón PBS, teniendo como objetivo fundamental analizar y comparar el comportamiento del proceso de agregación al disminuir la concentración de proteínas y la concentración de etanol en las distintas muestras.

Era esperado que la disminución de ambos parámetros conllevaría a una disminución significativa del porciento de agregación para cada dilución comparada con la muestra sin diluir al tiempo 0 min. (Fig 3.19 y Anexo 18) (p= 0,0433). Es suficiente con una dilución de 1/2 para obtener un 0,78 % de agregados. Esto sirve para argumentar que no sólo la concentración de proteína influye sobre este proceso de agregación, sino que el etanol

juega el papel determinante en este fenómeno, pues es necesario realizar una dilución de 1/8 con etanol, para lograr el mismo valor de agregación que se obtienen con el control, el cual es significativamente superior al obtenido con la dilución 1/2 con tampón PBS. Esta sería una posible solución tecnológica para disminuir los agregados, pero esta condición no permite el proceso de inactivación viral requerido.

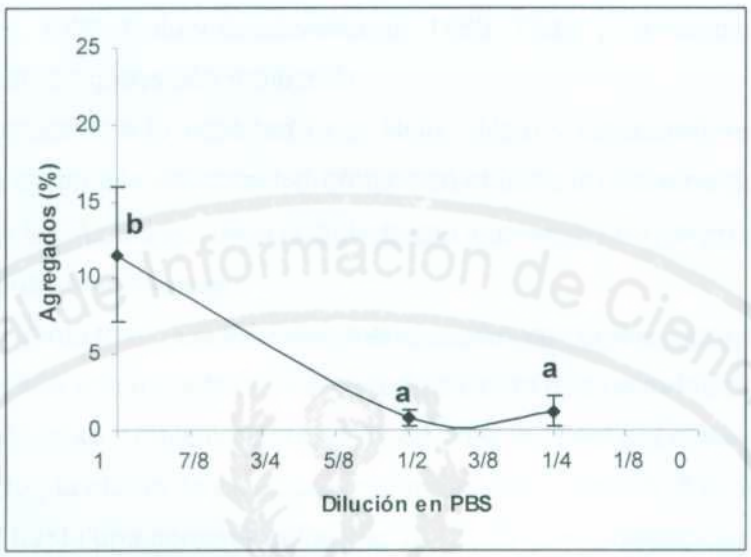

Figura 3.19. Influencia de la dilución del eluato con el tampón PBS sobre la agregación de la Epohr. Se representan las diluciones 1/2, 1/4 en el tampón PBS y el control (con etanol 50%). Todos los valores son representados para tiempo 0 minutos. Se compararon los puntos experimentales utilizando el paquete estadístico Statgraphics.Plus. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p\geq0,05$)

Hasta aquí se ha demostrado que el etanol al 50 % influye de forma determinante sobre el proceso de agregación de la Epohr, lo cual coincide con lo reportado en la literatura para otras proteínas (Renard y colaboradores, 1999; Makarov y colaboradores, 1995; Jirgensons y colaboradores, 1982). Este es el primer reporte de agregación de la Epohr mediante el uso de etanol.

3.2.2 Determinación de la influencia de la columna de hidrofobicidad sobre la agregación de la Eritropoyetina humana recombinante

Como parte de la segunda hipótesis enunciada se plantea que la agregación se pudiera producir por efecto directo del etanol sobre los monómeros de Epohr y/o que el gel de hidrofobicidad interviene también en este efecto. El primer planteamiento fue discutido en

los epígrafes anteriores, evidenciándose claramente que este juega un papel importante en la agregación. También pudiera ocurrir que la interacción de la molécula con la matriz provocara modificaciones conformacionales en la proteína que conllevara a iniciar la agregación. Es posible también un efecto sinèrgico del etanol y la matriz hidrofóbica.

El planteamiento anterior se basa teóricamente en lo reportado en la literatura en cuanto a que la cromatografía de interacciones hidrofóbicas puede introducir algunos cambios conformacionales en las moléculas de proteína (Wu y colaboradores, 1986; Figueroa y colaboradores, 1986; Nelu y colaboradores, 1989; Tibbs y Fernández, 2003), los cuales pudieran iniciar la agregación molecular.

Además de acuerdo a lo reportado por Nelu (Nelu y colaboradores, 1989) cuando se incrementa la carga a la columna hidrofóbica se obtiene un incremento considerable de la agregación de la p-Lactoglobulina A, debido a la interacción de los grupos hidrofóbicos del gel con las zonas hidrofóbicas.

Teniendo en cuenta todos los aspectos mencionados con anterioridad, se realizó un estudio comparativo entre una muestra monomérica de Epohrque no había sido procesada por el gel de hidrofobicidad y cuya concentración de proteína final era similar a la obtenida en el eluato de Butilo y la eluída de este paso cromatogràfico (control). A la primera muestra se le añadió etanol hasta una concentración final del 50 % y se le realizó una cinética similar a la descrita en el epígrafe 3.2.1 a).

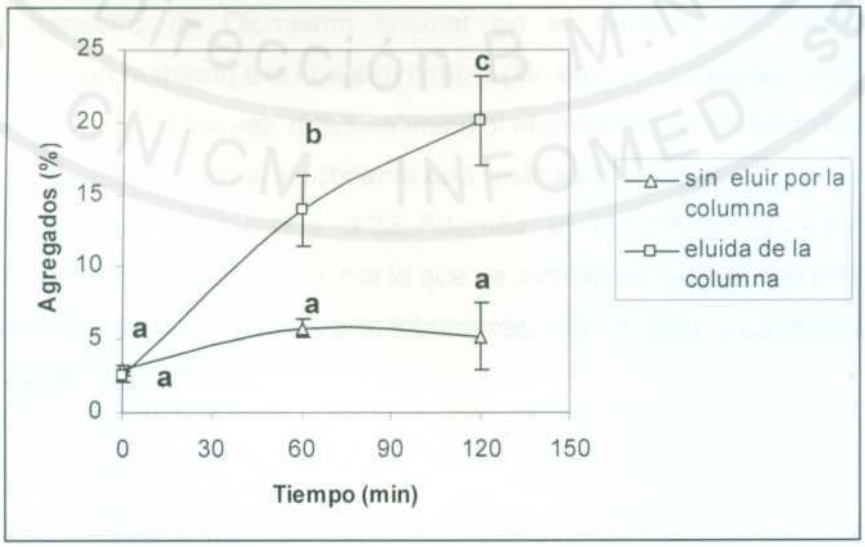

Figura 3.20. Influencia de la columna de Butilo sobre la agregación de la Epohr. Se representan los resultados a tiempos O, 60 y 120 minutos de la muestra eluída por la columna y la muestra sin pasar por la columna A. Se compararon los puntos experimentales utilizando el paquete estadístico Statgraphics.Plus. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas (p≥0,05)

Los resultados obtenidos para dos réplicas experimentales mostraron (Fig 3.20 y Anexo 19) que a partir de los 60 min se observan diferencias entre los valores de agregados de la muestra eluída de la columna y la que no se sometió a esta cromatografía (P= 0,0008). Se puede afirmar por lo tanto que la matriz hidrofóbica tiene un efecto directo en la formación de los agregados y que este efecto se potencia en el tiempo con la presencia del etanol al 50 %.

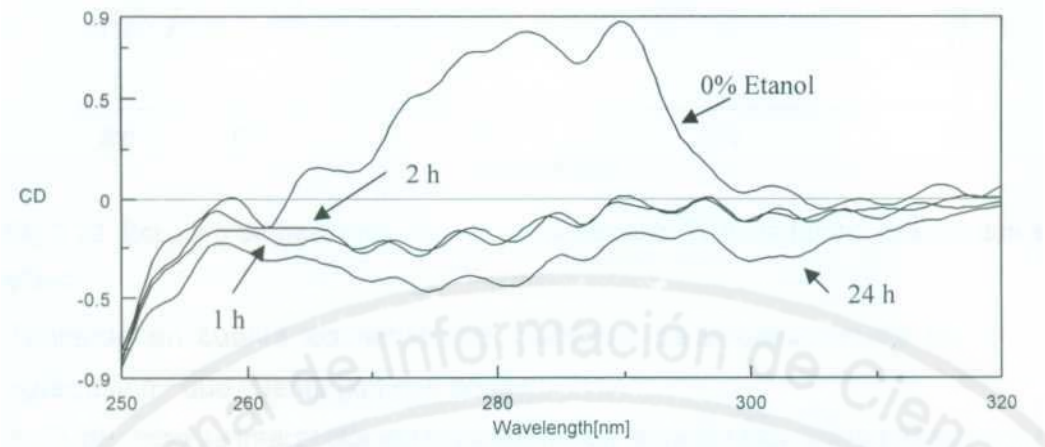

Fig 3.21. Cambio en el espectro de Dicroismo circular en el cercano UV de la Epohr cuando es incubada a diferentes tiempos en presencia del etanol al 50 %.

En la Figura 3.21 se observan la influencia del etanol al 50 % sobre la estructura de la proteína. Cuando la muestra se incuba a diferentes tiempos en presencia de este solvente, su espectro de Dicroismo circular en el cercano ultra violeta cambia apreciablemente con respecto a la muestra control (sin etanol, diluida la misma con agua a la misma concentración). Una vez que se elimina el etanol el espectro de la proteína no se recupera en su totalidad, pero si se observa una restitución comparado con la afectación inicial que provocó el etanol (Fig 3.22).Además la lectura del DC fue realizada inmediatamente eliminado el solvente, por lo que se pudiera esperar que en transcurso del tiempo la estructura se pudiera recuperar totalmente, si tenemos en consideración que la actividad biológica no se afecta.

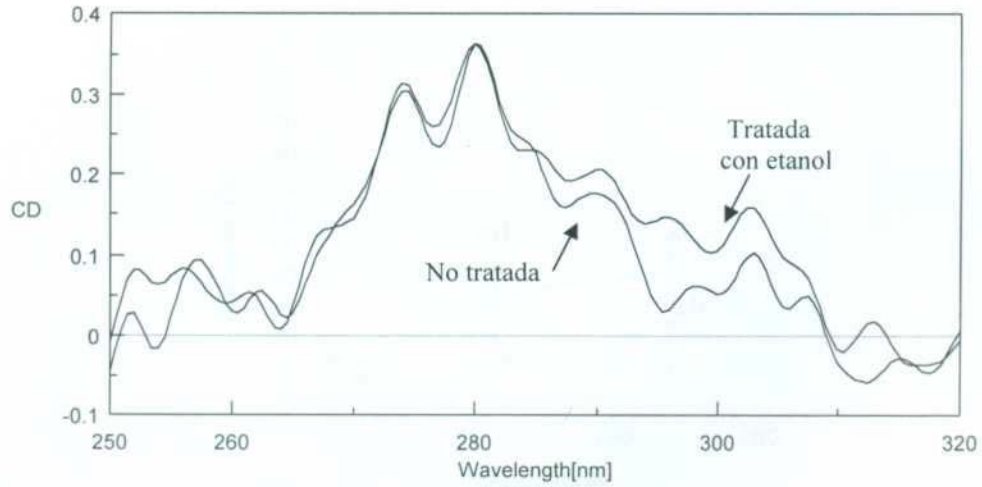

Fig 3.22. Espectro de Dicroismo circular en el cercano UV de la Epohr una vez que se elimina el etanol.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se pudiera pensar en un modelo de agregación que cuenta con dos pasos:

A: El proceso de interacción de la proteina con la matriz hidrofóbica. Durante este proceso la estructura de la proteina cambia de forma tal que más aminoácidos hidrofóbicos interactúan con el ligando de la matriz.

B: La interacción de la proteina con el solvente: La presencia del etanol produce un cambio adicional sobre la estructura de la proteína y aumenta aún más la agregación de la misma.

3.2.3 Influencia del Tween 20 sobre la agregación de la Eritropoyetina humana recombinante

Ha sido ampliamente reportado el efecto desagregante de los detergentes sobre los agregados solubles e insolubles (Bam y colaboradores, 1998; Kerwin y colaboradores, 1998, Lotte y colaboradores, 1998). De forma específica se plantean dos alternativas de acción del Tween 20 sobre los procesos de agregación, las cuales incluyen, en primer lugar, la adsorción de este detergente a las moléculas de proteína, evitando la interacción proteina- proteina y la competencia del mismo en la adsorción sobre la interfase aire-líquido o sólido- líquido (Tandon y Horowitz, 1987; Sluzky y colaboradores, 1991; Timasheff, 1994).

En este caso particular se evaluó el posible efecto de adsorción del Tween 20 sobre la molécula de proteína y la posibilidad de que impidiera la formación de los agregados durante el proceso de elusión con etanol, lo cual pudiera ser una alternativa tecnológica adecuada para ser introducida en el proceso productivo, para así reducir los niveles de agregados finales.

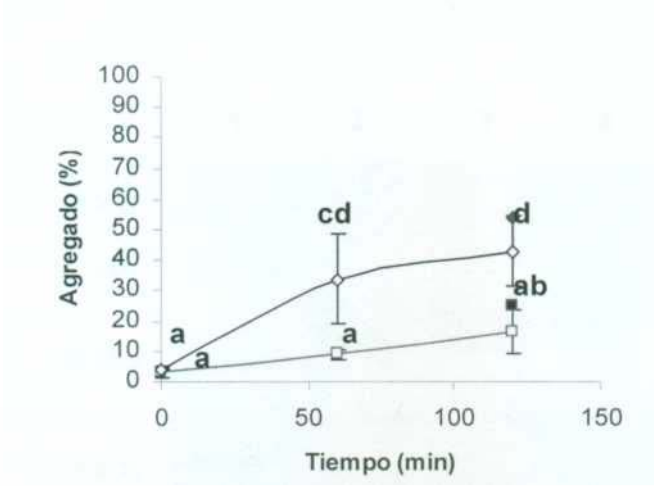

Figura 3.23. influencia del Tween 20 en la agregación de la Epohr. Se representan los porcientos de agregados para O min., 60 min. y 120 min. de la condición eluida con etanol al 50 % O y de la eluida con etanol al 50% + 0,01 % de Tween 20. Los valores ♦ y ■ son los porcientos de agregados después de la precipitación para el control y las variantes experimentales. Se compararon los puntos experimentales utilizando el paquete estadístico Statgraphics. Plus. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas (p≥0,05)

En la Fig 3.23 y el anexo 20 se muestran los resultados de tres réplicas experimentales del proceso de elusión de la Epohr de la cromatografía de hidrofobicidad con etanol al 50 % y 0,01 % de Tween 20. El estudio estadístico evidenció diferencias significativas entre los tiempos 60 min y 120 min (p= 0,0019) en cuanto al porciento de agregación (para 120 min., 26 % disminución de los agregados), lo mismo ocurrió para el precipitado etanólico (p= 0,0017).

La pureza del producto final por SDS-PAGE no se afectó por la presencia del Tween 20, lo cual se puede apreciar en la Fig 3.24. Los otros parámetros de liberación tampoco se afectan debido a que este detergente se emplea a lo largo de todo el proceso de purificación, como constituyente de las diferentes soluciones tampón. Además, la formulación final de este producto contiene también este detergente.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos del estudio anterior se puede plantear que es posible introducir este cambio en el proceso productivo sin producir alteraciones a los resultados de pureza. Se pudieran realizar otros experimentos donde se estudien valores superiores de concentración de este detergente, pero se debe tener en cuenta que si se realiza un paso de concentración por membrana, los valores de concentración del detergente se pueden incrementar tantas veces como se concentre la muestra.

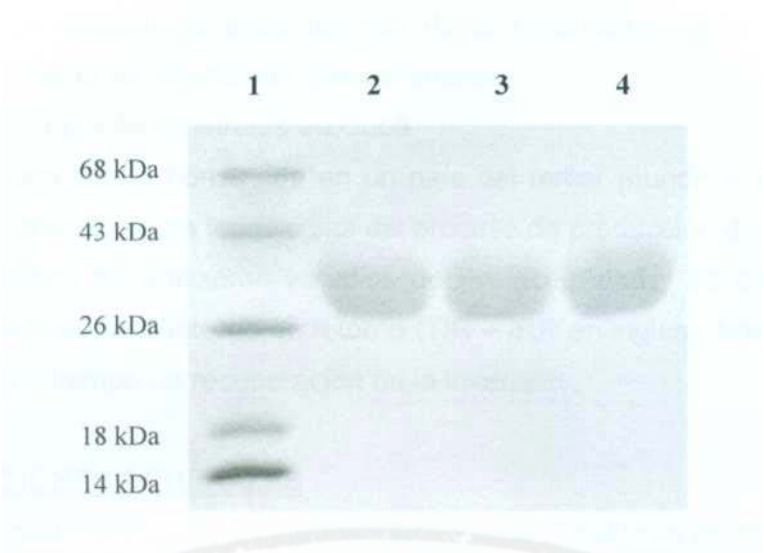

Figura 3.24. Electroforesis SDS-PAGE (12,5%) de la elusión del gel de hidrofobicidad con el etanol al 50% y con etanol al 50 % + 0,01 % de Tween 20:1- Peso molecular, 2- eluato con etanol al 50 %, 3- eluato con etanol al 50 % + 0.01 % de Tween 20 y 4- Material de Referencia. Se aplicaron la misma cantidad total de proteina.

Como resumen de los resultados obtenidos en el estudio de agregación de la Epohr podemos plantear lo siguiente:

1. La agregación se produce durante la elusión de la Epohr de la cromatografía de exclusión molecular.
2. La agregación se produce por interacciones no covalentes entre los monómeros de la Epohr.
3. El proceso de agregación disminuye con la disminución de la concentración de proteína.
4. El recobrado del paso de precipitación etanólica disminuye al disminuir la concentración de proteína de la muestra.
5. El paso de precipitación etanólica incrementa la agregación a partir del valor de 1,6 mg de proteína/mL de carga a la matriz hidrofóbica.
6. La agregación se produce por un efecto sinèrgico entre la interacción de la Epohr con la matriz hidrofóbica y la interacción con el etanol al 50%.
7. El Tween 20 ejerce un efecto desagregante sobre las formas agregadas de la Epohr.

3.3 Estudios de Prefactibilidad de la producción de la Epohr

Para realizar el estudio de prefactibilidad de la producción de la Epohr producida con el proceso desarrollado se analizaron dos escenarios:

Escenario A. Una planta construida en Cuba

Escenario B: Una planta construida en un país del tercer mundo al cual se le ha hecho una transferencia tecnológica del proceso de producción desarrollado.

Para ambos casos se realizaron estudios de Prefactibilidad y se analizaron los indicadores económicos típicos: Tasa interna de retorno (TIR - IRR en inglés), Valor Presente Neto (VPN - NPV en inglés) y tiempo de recuperación de la inversión

CONSIDERACIONES GENERALES

1. Capacidad máxima de producción de la planta: 2 millones de dosis de 2000 UI.
2. Tiempo requerido desde el inicio del proyecto hasta el comienzo de la producción: 2,5 años.
3. El análisis se realizó para un horizonte de 10 años a partir del momento del inicio del proyecto.
4. Se consideró que los costos inicíales de Investigación / desarrollo del proyecto fueron de $4,0 MM USD. Estos se consideraron como costos preliminares, a ser reembolsados durante 15 años de producción.
5. Todos los costos, incluyendo salarios, se consideraron en una sola moneda (USD) para facilitar los análisis posteriores.
6. Costo de transportación del equipamiento a la planta del 10% de su costo.
7. Los gastos de puesta en marcha se consideraron como un 6% de la inversión total y se contabilizaron en el momento de arrancada de la planta.
8. Se consideró que el período de depreciación del equipamiento tecnológico es 10 años, de los sistemas de ingeniería 15 años y de las edificaciones 20 años. Al final del período estudiado (10 años), se tuvo en consideración el valor residual de la inversión.
9. En el primer año de producción (año 2,5 del proyecto), la planta deberá producir 0,5 millones de dosis. Al siguiente año la producción se deberá incrementar hasta 1,5 millones y al siguiente año y en lo adelante deberá producir a su máxima capacidad, esto es, 2 millones de dosis de 2000 UI por año.
10. Se ha considerado que existe mercado para toda la producción.
11. Se consideró un precio deslizante del producto, comenzando a $7,30 la dosis y una disminución anual del 10% del precio del año anterior. Esto es:

Tabla 3.11. Consideración de los precios por año en el estudio de prefactibilidad de la producción de la Epohr.

Año del Proyecto	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Precio en USD	$7,30	$6,60	$5,90	$5,30	$4,80	$3,90	$3,50

12. Se consideró que el costo de producción por concepto de materiales era de $2,00 USD por dosis (Bouyon, 2000) que los costos asociados a la comercialización del producto era de un 3% de las ventas y los costos administrativos de un 5% de las ventas.
13. Finalmente, se consideró una obligación impositiva de un 20% sobre las utilidades.

Consideraciones específicas del escenario A

1. Inversión en equipamiento tecnológico (ex *fábrica)* de $3 MM USD la cual se paga en su totalidad a partir de la firma de los contratos de adquisición.
2. No se considera el pago de aranceles por la importación del equipamiento.
3. Inversión en sistemas y servicios ingenieros de $3 MM USD, distribuidos de la siguiente manera:

   Año 0 del proyecto: $2,0 MM USD

   Año 1 del proyecto: $0,5 MM USD

   Año 2 del proyecto: $0,5 MM USD
4. Costo de edificaciones, incluyendo cuartos limpios, igual a $2 MM USD, distribuidos de la siguiente manera:

   Año 0 del proyecto: $1,0 MM USD

   Año 1 del proyecto: $0,5 MM USD

   Año 2 del proyecto: $0,5 MM USD
5. Se consideró una contingencia del 5% del total de la inversión.
6. El capital de trabajo se consideró como el 50% de los gastos de operación de la planta, disponible a partir del comienzo del tercer año del proyecto, o sea, 6 meses antes de comenzar la producción.
7. Se consideró una nómina anual de $210 000 pesos, lo que equivale a 50 trabajadores con un salario medio de $350 pesos.

A partir de las consideraciones anteriores se realizó el estudio de Prefactibilidad, cuya tabla resumen se muestra en el Anexo 21.

Con los resultados obtenidos se calcularon los siguientes indicadores económicos:

Tasa interna de retorno

Valor presente neto

Período de recuperación de la inversión (Fig 3.25)

Para *las* condiciones analizadas se obtuvo una tasa interna de retorno de un *22%,* un *valor* presente neto a una tasa de descuento anual del 10% de $8,9 MM USD y una período de recuperación de la inversión de 4;4 años.

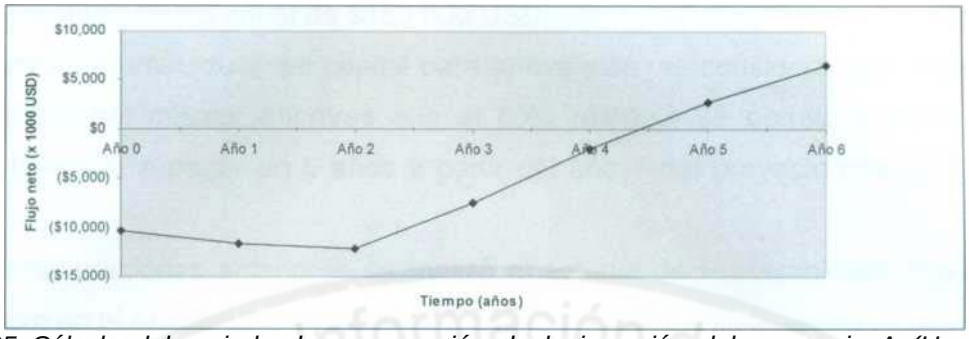

Fig 3.25 Cálculo del periodo de recuperación de la inversión del escenario A (Una planta construida en Cuba)

Consideraciones específicas del escenario B

Se realizó el estudio de Prefactibilidad de la inversión atendiendo a las siguientes consideraciones:

1. Inversión en equipamiento tecnológico *(ex fábrica)* de $3 MM USD, la cual se paga a los suministradores en tres partes iguales durante los años 0, 1 y 2 del proyecto, o sea:

   A la firma del contrato (33%)

   A la terminación de su confección (33%)

   Después de instalados y puestos en funcionamiento (33%)
2. Se considera un pago del 20% de aranceles por la importación del equipamiento.
3. Costo de transportación del equipamiento a la planta del 10% de su costo.
4. Inversión en sistemas y servicios ingenieros de $3 MM USD, distribuidos de la siguiente manera:

   Año 0 del proyecto: $0,5 MM USD

   Año 1 del proyecto: $2,0 MM USD

   Año 2 del proyecto: $0,5 MM USD
5. Costo de edificaciones, incluyendo el terreno, facilidades temporales, obras auxiliares que fueran requeridas y cuartos limpios, igual a $3 MM USD, distribuidos de la siguiente manera:

   Año 0 del proyecto: $2,0 MM USD –

   Año 1 del proyecto: $0,5 MM USD

Año 2 del proyecto: $0,5 MM USD

6. Se consideró una contingencia de $0.5 MM USD disponible desde el año 0 del proyecto.
7. El capital de trabajo durante el tiempo de construcción se consideró como un 15% de la inversión para cada año de trabajo. Una vez iniciada la producción, se consideró como 1/3 de los gastos de operación de la planta.
8. Se consideró una nómina anual de $150 000 USD.
9. Con *respecto* a la *estructura del capital para a inversión, se consideró que la empresa* aportó el 20% del mismo, mientras que el 80% restante se obtuvo a partir de un préstamo bancario a pagar en 5 años a partir del año 1 del proyecto con un 15% de interés.

A partir de las consideraciones anteriores se realizó el estudio de Prefactibilidad, cuya tabla resumen se muestra en el Anexo 22

Con los resultados obtenidos se calcularon los siguientes indicadores económicos:

Tasa interna de retorno

Valor presente neto

Período de recuperación de la inversión (Fíg 3.26)

Para las condiciones analizadas se obtuvo una tasa interna de retorno de un 20%, un valor presente neto a una tasa de descuento anual del 10% de $8,0 MM USD y un período de recuperación de la inversión de 5 años.

Los resultados obtenido muestran que en ambos escenarios y aún bajo las severas condiciones analizadas, la inversión se puede considerar aceptable, ya que una TIR de un 20 - 22% es superior a la tasa de interés considerada de un 15%, que de por sí es alta. Esto significa que la inversión se puede considerar rentable.

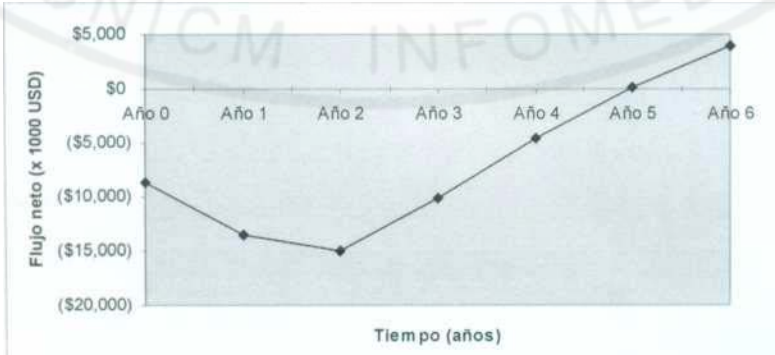

Fig 3.26 Cálculo del periodo de recuperación de la inversión del escenario B (Una planta construida en un país del tercer mundo al cual se le ha hecho una transferencia tecnológica del proceso de producción desarrollado).

El valor presente neto obtenido, para un horizonte de proyecto de 10 años y una tasa de descuento anual del 10%, también se puede considerar bueno para ambos casos y asciende a $ 8 - 9 MM de USD. Su valor representa las ganancias que se pueden esperar de la operación de la planta, recalculadas al valor presente del dinero y considerando una pérdida de un 10% anual de ese valor.

El período de recuperación de la inversión resultó estar en el rango de 4,4 ~ 5 años. Este se puede considerar un poco alto para este tipo de inversión teniendo en cuenta que estos estudios de prefactibilidad pueden tener un variación en exactitud entre un 20-30 %. Normalmente, para las inversiones en el campo de la biotecnología el tiempo de recuperación se puede esperar que sea entre 3 y 5 años. El valor obtenido se pudiera mejorar si fuera posible realizar las obras ingeníeriles en un tiempo menor a los 2,5 previstos, cosa que parece muy poco probable. Otro aspecto a considerar sería alcanzar los niveles de explotación de la máxima capacidad de producción en un tiempo menor al previsto. No debe descartarse la posibilidad de analizar detalladamente los costos de inversión y producción estimados, ya que si se logra su disminución, ya bien sea por ofertas más favorables de los suministradores (sin afectar sus especificaciones de calidad), aumento de la eficiencia de producción, u otros aspectos, todos los indicadores económicos analizados podrían mejorarse.

Como conclusión final de este análisis, se puede establecer que de acometerse esta inversión, se debe ser muy cuidadoso y tomar todas las medidas posibles para realizar el proyecto en el menor tiempo posible, ya que atrasos en las obras de construcción pudieran afectar sensiblemente el tiempo de recuperación de la inversión. No obstante, analizando todos los indicadores, se puede considerar que la inversión, en cualquiera de los dos escenarios analizados, resulta viable desde el punto de vista de prefactibilidad económica.

4. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos trazados en el trabajo y el desarrollo posterior del mismo se puede concluir que:

1. Fue posible desarrollar un proceso escalable y novedoso de purificación de la Epohr capaz de brindar un producto con la calidad requerida.
2. Se pudo identificar un efecto conjunto y reversible del etanol y la cromatografía de interacciones hidrofóbicas sobre la agregación de la Epohr, no reportado en la literatura, el cual se puede revertir.
3. Fue posible implementar mediante el proceso desarrollado una producción económicamente factible de Epohr a escala comercial avalado por un estudio de prefactibilidad económica que permite asegurar el impacto económico y social para el país.

5. RECOMENDACIONES

En este trabajo se plantean las siguientes recomendaciones:

1. Realizar otros estudios adicionales en el paso de precipitación etanólica para el aumento del recobrado del mismo.

2. Introducir en el proceso productivo la elusión con etanol al 50 % suplementado con Tween 20.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

6. BIBLIOGRAFÍA.

Anicetti, V. R., F. Felisken, B.R. Reed, A.B. Chen, P. Moore, M D. Geier y A.J.S. Jones. (1986). Immunoassays for the detection of E .coli proteins in recombinant DNA derived human growth hormone. Jorurnal of Immunological Methods. 91, 213- 224.

Anneli, M., Javher, V., Advani, Basant, G. (1995). Characterization of erythropoietin dimerization. Journal of Pharmaceutical Sciences. 84, 11.

Arthur, J., Sytkowski, Elizabeth, D., Kerry, L., Davis, L., Feldman. (1998). Human erythropoietin dimmers with markedly enhanced in vivo activity. Medical Science. 95, 1184-1188.

Bai, L., Burman, S., Gledhill, L. (2000) Development of ion exchange chromatography methods for monoclonal antibodies. J Pharm Biomed Anal. 22(3), 605-611.

Bam, N.B., Cleland, J.L., Manning, M.C., Carpenter, J.F., Kelley, R.F., Randolph, T.W. (1998). Tween protects recombinant human growth hormone against agitation- induced damage via Hydrophobic interactions. J . Pharm. Sei. (1987). 12, 1554- 1559.

Besada, V., W. Antuch., Rodríguez, L., González, Glay, Ch., y G. Padrón. (1992). Mass Spectrometry in Protein Analysis. Biotecnología Aplicada. 9, 1-15.

Bosissel. J.P., Lee, W.R., Presnell, S R., Cohen, F.E. (1993). Erythropoietin structure- function relationship. J. Biol. Chem. 268, 15983-15993.

Bouyón, R.A (2000). Estudio de las bases para el diseño de una planta de producción de Eritropoyetina recombinante.Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.Tesis de Maestría.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochem. 72, 248-254.

Briggs, J. y P.R. Paufeli. (1991). Quantitation of DNA and Protein Impurities in Biopharmaceuticals. Anal. Chem. 63, 850-859.

Centro Estatal para el Control de Medicamentos(CECMED) (2002). Registro Sanitario Modificado del ingrediente activo de la Eritropoyetina humana recombinante

Chen, A.B., A.A. Championsmith, J. Blanchard, J. Gosell, B. Anupilt, M.M. Federick, J. Formento y V.V. Sinicropi. (1992). Quantitation of E. coli Protein Impurities in

Recombinant Human Interferon Gamma. Applied Biochem. And Biotech. 36, 137-152.

Cheng, YS., Lee, MS., Lai, SY.,Doong, SR., Wang, MY (2001). Separaration of pure and immunoreactive virus-like particles using gel filtration chromatography following immobilized metal ion affinity chromatography. Biotechnol Prog.17, 318-325.

Clemons, G.K., De Manincor, D., Fitzsimmons, S.L., Garcia, J.F. (1987). Inmunoreactive erythropoietin studies in hypoxic rats and the role of salivary glands. Exp. Hematol 15, 18-23.

Cotes, P. M. and Bangham, D. R. (1961) Bio Assay of Erythropoietin in Mice Polycythaemic by Exposure to Air at a Reduced Pressure. Nature. September 9. 4793, 1065-1067.

Cotes, P.M. (1989). Phisiological studies of Erythropoietin in plasma. En: Erythropoietin. Edited by Jelkmann, W and Gross, A.J. Berlin. 57-59.

Committee for Proprietary Medical Products (CPMPa). (1996). Virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit, CPMP/BWP/269/95 Final version-2, 1-13.

Cox, BJ., Bunce, NJ (1999). Gel filtration chromatography method for determination relative binding affinities: rat hepatic estrogen receptor as an example system. Anal Biochem. 267, 357-365.

Darling, RJ.,Kuchibhotla, U.,Glaesner, W.,Micanovic, R..Witcher, DR., Beals. JM (2002).GIycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics:role of electrostatic interactions. Biochem. 41:14524-31.

Davis, JM, Arakawa, T., Strickland, T.W. (1987). Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells Biochemistry 26, 2633- 2638.

Derby, PL., Strickland,TW., Rohde, MF., Stoney, K y Rush, RS (1996). Identification of the residues involved in homodimer formation of recombinant human erythropoietin. Int J Peptide- Protein. Research. 47, 201-208.

Diaz-Rubio, E. (1997). Eritropoyetina en oncología. En: F Valderrabano (ed). Eritropoyetina Humana Recombinante. Capítulo 17. Madrid, biblio stm, 243-256.

Dordal, M.S., Wong, R., GoldWasser, E (1985). Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. Biochemistry . 31, 9871-9876.

Dudkiewicz, WJ, Snycerski, A.,Tautt, J (2002). Application of high performance size exclusion chromatography to the determination of erythropoietin in pharmaceutical preparations. Acta Pol Pharm. 59, 83-86.

Dufour, E., Robert, P., Bertrand, D. y Haertle, T. (1994). Conformation changes of beta- lactoglobulin: an ATR infrared spectroscopic study of effect of pH and ethanol. J. Protein Chem. 13, 143-149.

Egerer, G., Harter, C., Karthaus, M., Ho, AD., Goldschmidt, H (2003).Use of erythropoietin in patients with multiple myeloma.

Erslev, A. J., Wilson, J. y Caro, J. (1987). Erythropoietin titers in anemic, nonuremic patients. Journal Lab. Clin. Medical. 109, 429-433.

European Pharmacopeia. 4 th Edition. (2002). p 1123-1128.

Fava-De-Moraes, F., Zangheri, E.O. y Doine, Al. (1979). Immunohistochemical localization of erythropoietin in the rat and mouse submandibular glands. Histochem. J. 11, 97-102.

Figueroa, A., Wu, S.L., Karger, B.L. (1986). Protein conformational effects in hydrophobic interaction chromatography. Retention characterization and the role of mobile phase additives and statinary phase hydrophobicity. J. Chromatogr. 26, 371, 3-27.

Finney, D. J. (1964). Statistical Methods in Biological Assays. Charlees Griffin and Co. LTD.. 2da Ed.

Food Drug Administration (FDA). (1990). Guideline on General Principles of Process Validation.

Fratantoni, Joseph C and Seamon, Kenneth B (1994). Evaluation of Recombinant Human Erythropoiein as a Therapeutic Agent. Book: Regulatory Practice for Biopharmaceutical Production. Edited by Anthony S. Lubiniecki and Susan A. Vargo.

Fried, W.; Barane-Varelas, J. and Morley, C. (1984). Factor that regulated extrarrenal Erythropoietin production. Blod Cells. 10, 287-304

Fritsch E (1986). Method for the production of erythropoietin. European Patent Office WO 86/03520.

Fukuda, M., Sasaki, H., Fukuda, M. (1989). Survival of recombinant erythropoietin in the circulation, the role of carbohydrates. Blood. 73, 84-89.

Garnick, R.L (1992). Peptide mapping for detecting variants in Protein Product. Develop Bio. Standard 76: 117-130.

Gansewort, R.T., Vaziri, N.D., de Jong, P.E. (1996). Treatament of nephrotic syndrome with recombinant Erythropoietin. Am. J. Kidney. Dis. 28, 274-277.

Gebauer B., Simic, M., Branovic, K..Trescec, A., Benko, B. (1999). Ion - exchange chromatography separation of the detergent and the solvent from immunoglobulins after solvent-detergent treatment . Chromatogr A .852(1),83-86.

Gel Filtration. Principles and Methods. (2001). Pharmacia Biotech. 6th Edition.

Ghanem, A.B., Winchenne, J.J., López, C. (1994). Purification and biological activity of recombinant human erythropoietin produced by lymphoblastid cells. Preparative Biochem, 24, 127-142.

Gatell, J.M. (1997). Eritropoyetina y SIDA. En: F Valderrabano (ed). Eritropoyetina Humana Recombinante. Capítulo 19. Madrid, biblio stm. 89-100.

Goa, Y.G., Guan, Y. X ., Yao, S. J ., Cho M. G. (2003). Lysozyme refolding at high concentration by dilution and size-exclusion chromatography. J Zhejiang Univ Sci .4(2), 136-41.

Goldwassen, E., Kung, C.K, y Elianson, J. (1974) On the mechanism of erythropoietin- induced differentiation. The role of sialic acid in erythropoietin action. J Biol. Chem. 249, 4202-4206.

Guo, X., Condra, M., Kimura., Berth, G., Dautzenberg, H., Dubin, PL.(2003).Determination of molecular weight of heparin by size exclusion chromatography with universal calibration.Anal Biochem. 312(1), 33-39.

Guyton, Arthur, C. (1992). Tratado de fisiología médica. México. Interamericana. 358- 370.

Hallgren, E. (1999) Prediction of protein retention at gradient elution conditions in ion exchange chromatography. Chromatogr A .852(2),351-359.

Hallgren, E., Kalman , F., Farnan, D., Horvath, C., Stahlberg, J. (2000). Protein retention in ion -exchange chromatography : effect of net charge and charge distribution Chromatogr A.877(1-2), 13-24.

Herjentén, S. (1977). Fractionation of proteins by hydrophobic interaction chromatography, with reference to serum proteins. Proceeding Intl. Workshop on Technology for Protein Separation. Reston, Virginia. 410-421.

Hewick, R.N., Seehra, J.S. (1987). Method for purification of erythropoietin and erythropoietin composition. Unites States Patent Number 4677195.

Hokke, C H., Bergwerff, A.A., Van Dedem, G.W.K., Kamerling, J.P. y Vliegenthart, J F.G. (1995). Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate

chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Eur. J. Biochem. 228, 981-1008.

Holm, J,. Hansen, S. I., Hoier-Madsen, M. (2002) A combination of cation exchange and ligand -affinity chromatography for purification of two molecular species of the folate Binding protein in human milk, one equipped with a hydrophobic glycosyl phosphatidylinositol tail: characterization of hydrophobicity and electrical charge. Biosci Rep.22(3-4), 443-54.

Hydrophobic Interaction. Principles and Methods (2001).Pharmacia Biotech.6th Edition.

Ion Exchange Principles and Methods (2001).Pharmacia Biotech.6th Edition.

International Conference on Harmonization (ICH). ICH. (1997) Tripartite Guideline. Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Viral safety evaluation of biotechnology products.

Janson, J., Ryden, L. (1998). Protein Purification. Principles, high resolution. Methods, and aplications.Second Edition. Wiley-Liss.

Jelkmann, W. (1986). Renal Erythropoietin: Properties and Production. Rev. Phisiol. Biochem. Pharmacol. 104, 139-215.

Jelkmann, W., Wolf, M. y Fandrey, J. (1990). Serum Erythropoietin levels; Relationship to blood hemoglobin concentration and erythrocitic activities of the bone marrow. Klin. Wochenschr. 68, 403-407.

Jirgensons, B., Ross, D.L. (1982). Circular dichroism studies on conformational transitions of phytohemagglutinins effected by some alcohols. Int. J. Pept. Protein Res. 20, 110-114.

Jobby M. K., Sharma Y. (2003). Rapid purification of recombinant betaB2-crystallin using hydrophobic interaction chromatography. Protein Expr Purif. 28(1), 158-164.

Kaersgaard, P y Barington, KA (1998). Isolation of the factor VII von Willebrand factor complex directly from plasma by gel filtration. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 715, 357-367.

Kato Y., Nakatani S., Nakamura K., Kitamura T., Moriyama H., Hasegawa M., Sasaki H. (2003). Hidrophobicity gradient columns for the separation of trypsin inhibitor by hidrophobic interaction chromatography at low salt concentration. J Chromatogr A. 986(1), 83-88.

Keighly, G. y Cowy, P.LL. (1995). Chemistry and Purification of erythropoietin. Blood 269-293.

Kent, U. M. (1999).Purification of antibodies using ion -exchange chromatography. Methods Mol Biol . 1 1 5 , 9-22 .

Kerwin, B.A., Heller, M.C., Levin, S.H. y Randolp, T.W. (1998). Effects of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20 degrees C of a recombinant hemoglobin. J. Pharm Sci. 87, 1062-1068.

Kim, U. J., Kuga, S. (2001).Ion -exchange Chromatography by dicarboxyl cellulose gel. Chromatogr A. 919(1), 29-37.

Knudsen, H. I ., Fahrner, R. L., Xu, Y., Norling, L. A., Blank, G. S. (2001). Membrane ion -exchange chromatography for process-scale antibody purification. 907(1-2), 145-154.

Krystal, G., Pankratz, H.R., Farber, N.M. y Smart, J.E. (1986). Purification of human erythropoietin to homogeneity by rapid five-step procedure. Blood. 67, 71-79.

Kunitani, M.G., Cunico, R.L. y Staats, S.J. (1988). Reversible subunit dissociation of tumor necrosis factor during hydrophobic interaction chromatography. J. Chromatogr. 29, 205-220.

Laemmli, N.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly by bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

Lai, P.H., Strickland, T.W. (1987). Erythropoietin purification. Unites States Patent Number 4667016.

Lai, P H., Everett, R., Wanggt, F. F., Arakawn, T. y Goldwasser, E. (1995). Estructural Characterization of human erythropoietin . Journal of Biological Chemistry. 85, 315-320.

Lee, HS (1980). A new preparative method for isolation of human erythropoietin hydrophobic interaction chromatography. Blood.56,620-624.

Levison, P. R., Badger, S. E., Hathi, P., Davies, M. J., Bruce, I. J., Grimm, V. (1998) New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography. Chromatogr A. 827(2),337-44.

Levison, P. R., Hopkins, A. K., Hathi, P. (1999). Influuence of column design on process - scale ion - exchange chromatography. Chromatogr A .865(1-2),3-12

Leyland, JB (2003). The future of breast cancer therapy: Erythropoietin as an integral component. Clin Breast Cancer. 3(6), 417-420.

Li, M., Zhang, G., Su, Z., (2002). Dual gradient ion - exchange chromatography improved refolding yield of lysozyme. Chromatogr A. 959(1-2), 113-20

Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, T.C., Chen, K.K , Fox, G.M., Marlin, F., Stabinisky. Z., Badrawi, S.M., Lai, P H. y Goldwasser, E. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7580-7584.

Lombardero, J., A.M. Cinza, M. Quintana, R. Perez y A. Lage. (1988). Purificación del Factor de Crecimiento Epidérmico. Su escalado. Revista CENIC. 19, 102-109

Lotte K., Theodore WR„ Sven F(1998). Effect of Tween 20 on freeze-thawing and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XII. J. Pharm. Sci. vol 87, No. 12. 1597-603.

Lowry, D.H., N.J. Rosembrough, A.L. Farr y R.J. Randal. (1951). Protein measurements with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-269.

Makarrov, A.A., Protasevich II, Grishina, I B., Lobachev, V.M., Bazhulina, N.P. (1995) Ethanol on denaturation of pepsinogen. Mol. Bio. 28, 1346-1353.

Merrifield, E.H. (1990). Purification of Erythropoietin. European Patent office. 0 358 463.

Mercuriali, F. (1997). Donación preoperatoria de sangre Autóloga. En: F Valderrabano (ed.). Eritropoyetina Humana Recombinante. Cap. 19. Madrid. Biblio. stm. 271 - 293.

Miyake, T., Kung, C.K.H., Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin J. Biol. Chem. 251, 5558.

Misaizu, T., Matsuki, S., Strickland, T.W., Takeuchi, M., Kobata, A., Takasaki, S. (1995). Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. Blood. 1, 4097-4104

Morimoto, K., Tsuda, E., Said, A.A., Uchida, E., Hatakeyama, S., Ueda, M., Hayakawa, T. (1996). Biological and physicichemical characterization of recombinant human erythropoietins fractinated by Mono Q colum chomatogrphy and their modification with sialtransferase. Glycoconj. J. 6, 1013-1020.

Multiphor II Electroforesis System. User Manual. (1998). Electroforesis using ExcelGel SDS and buffer strip. Cap 5. Sweden: Amersham Pharmacia Biotech. 20-25.

Multiphor II Electroforesis System. User Manual. (1998). Electroforesis using ExcelGel SDS and buffer strip. Capítulo 5. Sweden: Amersham Pharmacia Biotech. 30-34.

Multiphor II Electroforesis System. User Manual. (1998). Electroforesis using ExcelGel SDS and buffer strip. Capítulo 5. Sweden: Amersham Pharmacia Biotech. 40-49.

Murray PD (1990).Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology. Vol: 182.

Nelu Grinberg, Blanco, R. y Yarmush, D M. (1989). Protein aggregation in high- performance liquid chromatography: hydrophobic interaction chromatography of (3- lactoglobulin A. Anal. Chem. 61, 514-520.

Oette, H., Riess, H., Raguse, JD., Bier, J., Gath HJ (2001).Recombinant human erythropoietin in the treatment of head and neck tumour anaemia.Int Oral Maxillofac Surg.30(2),148-55.

Owers, L., Arakawa, T., Aoki, K.H., Elmore, R., Rohde, M.F., Boone, T. y Strickland, T.W. (1991). The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. J Biol Chem. 266, 23022-23026.

Páez, R. Garcia del Barco, Di. Martinez, A. Gomez, E. Fuente, J. Leonar, R. Pilar, Rodriguez (1996). Oficina Cubana de Patente.CU81/96.

PDA Biotechnology Task Force on purification and scale-up. (1992). Industry perspective on the validation of column-based separation Processes for the purification of proteins. Technical Report No. 14. Parenteral Drug Association, Bethesda, MD.

Petrides, D P. Calandranis, J. and Cooney, C.L (1996). Bioprocess Optimization Via CAPD and Simulation for Product Commercialization. Genetic Engineering News. 16, 24-40.

Petrides D P. Koulouris, A and Lagonikos P T (2002). The Role of Process Simulation in Pharmaceutical Process Development and Product Commercialization. Pharmacaeutical Engineering. 1, 1-8.

Radtke, H.W., Claassner, A. y Erbers, P.M. (1979). Serum erythropoietin concentrations in chronic renal failure: Relationship to degree of anemia and excretory renal function. Blood. 54, 817-840.

Renard, D., Lefebvre, J., Robert, P., Llamas, G. y Dufour, E. (1999). Structural investigation of beta-lactoglobulin gelation in ethanol/water solutions. Int. J. Biol. Macromol. 26, 35-44.

Rich, I N., Heit, W. y Kubanek, B. (1982). Extrarenal erythropoietin production by macrophages. Blood. 60, 1007-18.

Rodger, A y Ismail, MA. (2000). Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: a practical approach.ed.MG.Gove. Oxford.

Sánchez, R., Iglesias, P., Fernández, M.J. y Álamo, C. (1997). Diabetes Mellitus y eritropoyetina. En: F Valderrabano (ed). Eritropoyetina Humana Recombinante. Cap 15. Madrid, biblio stm. 221-231

Sanz, D. y Botella, J. (1997). Optimización del tratamiento con eritropoyetina. En: F Valderrabano (ed.). Eritropoyetina Humana Recombinante. Cap. 19. Madrid: biblio stm. 89-100.

Sauter, SR., Diekmann, S., Braun, V (2003). Two-step purification of the outer membrane transporter and activator protein ShlB from Escherichia coli using internally His(6)-tagged constructs.J Chromatogr B Analyst Tecnol Biomed Life Sci.786(1-2), 33-37.

Scopes, K. R: (1994). Protein Purification. Principles and practice. Second Edition.

Sieber, E. y Iscore, W. (1977). Chromatography of human urinary *erythropoietin.* Biochemical et Biophysica Acta. 496, 146-154.

Se, Pu. (1998). Purification of recombinant erythropoietin by reversed phase high performace liquid chromatography (RP-HPLC).China Medical University report. 16, 263-264.

Sluzky, V., Tamada, J.A. y Klibanov, A.M. (1991). Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A,88,9377-81.

Sofer, G. y Nyström, L. (1991). Process Chromatography: A guide to validation. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovish, Publishers, U.K.

Sofer, G. (1996). Validation: Ensuring the Accuracy of Scaled-Down Chromatography Models. BioPharm, 9, 51-54.

Sofer, G. y Hagel, L. (1997). Handbook of process chromatography: A guide to *optimization, scale-up and validation. Academic Press, Harcourt Brace* Jovanovish, Publishers U.K.

Spivak, J.L. y Hogans, B.B. (1989). The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. Blood. 73, 90-99.

Statgraphics Plus for Window 2.1. Copyright. (1994-1996).

Sutherland, J.C., A. Emrick, L.I., France, D.C. Monteleone, y J. Trink. (1992). Circular Dichoism user Facility at the National Syndrotron Ligrit Source. Estimation of protein secondary Structure. Biotechniques. 13, 588-590.

Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyasaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibe, N. y Kobata, A (1988). Comparative study of the asparagine linked sugar chains of human erythropoietin purified from urine and culture medium of recombinant chínese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. 263, 3657-3663.

Takeuchi, M. Takasaki, S. Shimada, M. Kobata, A. (1990). Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erithtropoietin produced in Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. J Biol Chem. 265, 12131-12134.

Tandon, S. y Horowitz, P.M. (1987) Detergent-assisted refolding of guanidinium chloride-denatured rhodanese. J. Biol. Chem. 262, 4486-4491.

The united Stated Pharmacopeia (USP). XXIV Revision. (2002). United States Pharmacopeial Convention. Inc.

Tsuda E. The role of carbohidrate in recombinant human erythropoietin (1990). Eur J Biochemistry. 188: 405-411.

Tibbs, JT y Fernandez, EJ (2003). Alpha-lactalbumin tertiary structure changes on hydrophobic interaction chromatography surfaces. J Colloid Interface Sci. 259 (1), 27-35.

Timasheff, S.N. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22, 67-97.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. Proceeding of Natural Academy of Science. 76, 4350.

Toyoda, T.,Arakawa, T.,Yamaguchi, H (2002). N-glycan stabilize human erythropoietin through hydrophobic interactions with the hydrophobic protein surface:studies by surface plasmon resonance analysis. J Biochem. 131, 511-5.

Unesco (1986).Manual for Evaluation of Industrial Projects.

Urban, A., Ansmant, I., Motorin, Y. (2003). Optimisation of expression and purification of the recombinant Yo1066 (Rib2) protein from Sacaromyces cerevisiae. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci . 786(1-2),187-95.

Vogt, C., Pentz, S. y Rich, I.N. (1989). A role for the macrophage in normal hemopoiesia: III. In vitro and in vivo erythropoietin gene expression in macrophages detected by in situ hybridization. Exp. Hemato. 17, 391-397.

Vranlx, R.P.H.L. (1983). Potency *test for Hepatitis B Virus Vaccines in Laboratory* Animals. Decelop. Biol. Standard. 54, 63-70.

White, E.M., J.B. Grun, C.S. Sun y A.F. Sito. (1991). Process Validation for virus removal and inactivation. Biopharm. 4, 34-39.

Word Health Organization (WHO). (1990). Guidelines for the preparation, characterization and establishment of international and other standards and reference reagent for biological substances. Technical report Serie No 800.

World Health Organization (WHO). (1992). Viral inactivation of blood and blood products. Global Blood Safety Initiative. WHO/LBS/92-5, 1-34.

Wu, S.L., Benedek, K. y Karger, B.L. (1986). Thermal behavior of proteins in high- performance hydrophobic-interaction chromatograhic characterization. J. Chromatogr. 359, 3-17.

Xia F., Nagrath D., Cramer S. M. (2003). Modeling of adsorption in hydrophobic interaction chromatography systems using a preferential interaction quadratic isotherm. J Chromatogr A. 989(1), 47-54.

Yamamoto, S., Miyagawa E. (1999). Retention behavior of very large biomolecules in ion exchange chromatography . Chromatogr A. 852(1), 25-30.

Yanagawa, S., Hirade, K., Ohnota, H., Sasaki, R., Chiba, H., Ueda, M. y Goto, M. (1984). Isolation of human erythropoietin with monoclonal abtibodies. J. Bio. Chem. 10; 2707-2710.

Yoshiyuki, E., Hiroshi, N., Yoshihiko, W., Kiyoshige O. y Tosio, T. (1992). Heat-induced aggregation of recombinant erythropoietin in the intact and degycosilated states as monitored by gel permation chromatography combined with a low-angle laser light scattering technique. J. Biochem. 112, 700-706.

Zanette D., Soffientini A., Sottani C., Sarubbi E. (2003). Evaluation of phenylboronate agarose for industrial-scale purification of erythropoietin from mammalian cell cultures. J Biotechnol. 101(3), 275-287.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

7. AUTOBIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS

PATENTES, PUBLICACIONES, EVENTOS Y TESIS DE DIPLOMA RELACIONADOS CON LA TESIS.

Patente.

'Establecimiento de un proceso de purificación de Eritropoyetina que produce una molécula con una actividad biológica superior. CU-81/96, (Patente concedida en Cuba y Colombia

Publicaciones.

1. Documento de registro sanitario de la Epo producida en el CIGB 2002.

Todas las informaciones técnicas de este trabajo han sido consideradas secretas por contener información tecnológica.

Eventos Nacionales e Internacionales.

1. Obtención de la Eritropoyetina humana recombinante expresada en Células de Ovario de Hamster Chino. (Biotecnología Habana 97).
2. Purification and characterisation of the recombinant human Erytropoietin expressed in Chinese Hamster Ovary Cells (Primer simposium Internacional de investigación y desarrollo de medicamentos, Habana Cuba 98)
3. Purification and characterisation of the recombinant human Erytropoietin expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. International Glysosimposium. Braunschweig 98. Germany.
4. Estrategia para el desarrollo de proteínas recombinantes para uso en humanos. Experiencia en el CIGB. (VIII Seminario Internacional de Producción Química- Farmacéutica, 1999)

5. Strategies for development of recombinant proteins for humans use CIGB experience (Biotecnología Habana 99).
6. Estrategia para el desarrollo de proteínas recombinantes en la fase de Investigación - desarrollo con vistas a ensayos Clínicos en humanos (VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamiericano de Biotecnología y Bioingeniería. Septiembre 13-17. Mexico,2002)
7. Hydrophobic Chromatography interaction and ethanol induce aggregation of recombinant erythropoietin as monitored by gel permeation chromatography.
   Sanchez, J and Páez, R (IV Congreso Internacional de Química. Xfff Conferencia del Caribe de Química e Ingeniería Química. 16-20 abril 2001 .habana Cuba)
8. Simple purification process and scale up of the recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. R. Páez, P.Rodriguez, Ruiz. O, Peña. M, Cremata.J, Brito J.E, Izquierdo. M, Marcelo. J.L, L. Costa.(IV Congreso Internacional de Química. XIII Conferencia del Caribe de Química e Ingeniería Química.16-20 abril 2001.habana Cuba)
9. A new development experience with a recombinant Chinese Hamster Ovary Cells line (CHO) cultivate from stationary Flasks to automatic Rollers Botle system. M. Pilar, M. Perez, O. Ruiz, C. Tamara, A. Martinez, and R. Páez(The 17 Esact Meeting. Sweden. 10-14 june.2001-06-20).

Logros institucionales y de la Academia de Ciencia de Cuba.

1. Establecimiento de un proceso de purificación para la producción de la Eritropoyetina humana recombinante expresada en Células de Ovario de Hámster Chino. **Logro del CIGB 1996.**

2. Establecimiento de la producción de la Eritropoyetina humana recombinante **Logro CIGB 2001.**

Forum de ciencia y técnicas.

1- Establecimiento de un proceso de purificación para la producción de la ertropoyetina humana recombinante expresada en Células de Ovario de Hámster Chino. **Relevante CIGB, Municipio Destacada.**

Trabajos de Diplomas.

1. Estudio de la agregación de la Eritropoyetina humana recombinante durante el proceso de producción del CIGB.
   Autor: Jorge Sánchez Romeu
   Trabajo de Diploma, Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la Habana Tutores: Rolando Páez.

Otros:

Trabajo: Establecimiento de una tecnología de obtención de la Eritropoyetina humana recombinante en el CIGB.

1. Premio **destacado** en el evento de la BTJ del CIGB, 2002.
2. Premio **destacado** en el evento de la BTJ municipal, 2002
3. Premio al trabajo **de mayor Rigor científico** en el evento de la BTJ provincial, 2002.
4. Premio al trabajo de **mayor rigor científico** en el evento de la BTJ Nacional, 2002.

8. AUTOBIBLIOGRAFÍA NO RELACIONADA CON LA TESIS.

Publicaciones

1. Empleo de la Cromatografía de Interacciones Hidrofobias (CIH) para la eliminación de ADN en la purificación de el HBsAg recombinante (1992), Avances de la Biotecnología Moderna. Vol 1, 21.2. Short Reports. Biotecnología Habana 92.
2. The recovery of the Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) from a Recombinant P. pastoris Strain. Disruption and precipitation Studies. Acta Biotechnological 13 (1993) 2, 117-122.
3. Immunoaffinity purification of recombinant hepatitis B surface antigen from yeast using a monoclonal antibody. Journal of Chromatography a, 672(1994)25-33.
4. Bioseparationstechnik,GBF,Wissenshftlicher Ergebnisbericht, 1994, 227-235.
5. Single-chain Fv Antibody fragment for the immunoaffinity purification of a recombinant hepatitis B virus surface antigen particle. Minerva Biotec. 1997, 9:68- 75.
6. Two streptokinase genes are expressed with different solubility in Escherichia coliW3110. Biotechnology Letters Vol.21, N.12.December 1999.
7. A recombinant envelope protein from Dengue virus purified by IMAC is bioequivalent with its immune-affinity chromatography purified counterpart. L.Hermida, R Rodríguez, L Lazo, C, López, G. Marques, R.Páez, C. Suárez. R .Espinosa. J. García. G. Guzmán, G. Guillén. J Biotecnology 94 (2002) 213-216

Patentes.

1- Method for obtaining recombinant surface antigen of hepatitis B virus (HEP B) of higher immunogenic capacity and use thereof in a vaccine preparation.

2- Patente presentada: proceso de purificación de Polipeptídos multíepitopicos (MEPS). N.S: 48/98.Cuba.

3- Establecimiento de un proceso de purificación de Eritropoyetina que produce una molécula con una actividad biológica superior. CU-81/96, fecha de presentación 3- 10-96, fue además presentada en Brasil, Argentina, Venezuela, México, Chile, Colombia.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

9. ANEXOS

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Anexos

ANEXO 1. Representación hipotética de la interacción entre un gel y la superficie hidrofóbica de una proteína

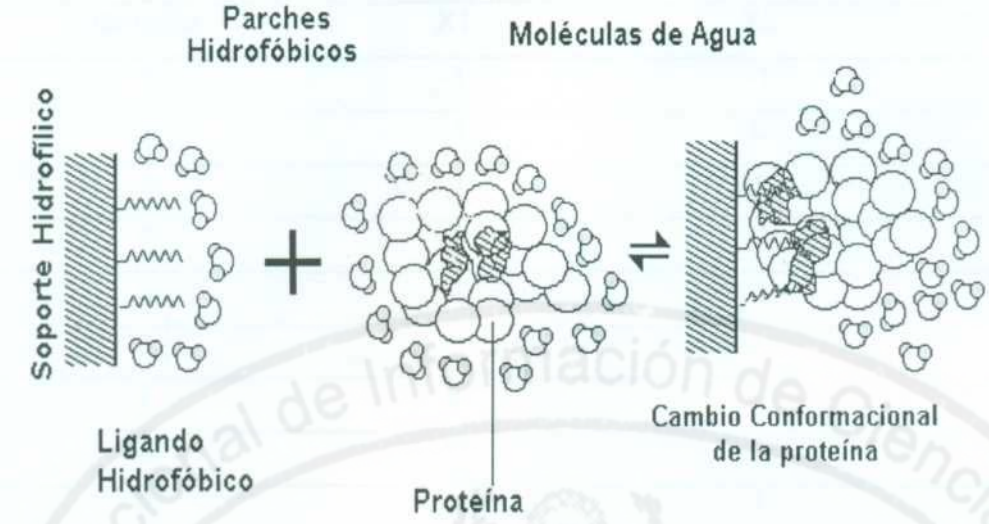

Figura 9.1. Representación hipotética de la interacción entre un gel y la superficie hidrofóbica de una proteína

Dirección B M.N
CNICM INFOMED

ANEXO 2. Resultados de las corridas experimentales del estudio de las condiciones de operación de la cromatografía de exclusión molecular.

Tabla 9.1. Resultados de las corridas experimentales del estudio de las condiciones de operación de la Cromatografía de Exclusión Molecular (Sephasex G-25) en el proceso de purificación de la Eritropoyetina humana recombinate.

Corrida	X1	X2	Recobrado (%)
1	-1	-1	62,5
2	-1	0	74,0
3	-1	1	55,5
4	-1	-1	61,0
5	-1	0	70,0
6	-1	1	50,3
7	0	-1	46,8
8	0	0	87,5
9	0	1	82,0
10	0	-1	46,0
11	0	0	88,4
12	0	1	75,0
13	1	-1	58,6
14	1	0	93,7
15	1	1	52,0
16	1	-1	63,0
17	1	0	95,7
18	1	1	47,9

La variable X, *corresponde a la velocidad lineal y* X_2 *a la carga de la columna.*

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas Dirección B.M.N. CNICM INFOMED

ANEXO 3. Resultado estadístico del diseño experimental! 3^2 del estudio de las condiciones de trabajo del Cromatografía de Exclusión Molecular

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

ANEXO 3. Resultado estadístico del diseño experimental! 3^2 del estudio de las condiciones de trabajo del Cromatografía de Exclusión Molecular

Múltiple Regression Analysis
Dependent variable : Var 1

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
CONSTANT	88.6167	6 .17687	14.3465	0.0000
Factor A	3.13333	3 . 38321	0.926143	0.3726
Factor B	2.06667	3 .38321	0.61086	0.5527
Factor A*Factor A	-5.6	5 .85989	-0.95565	0.3581
Factor B*Factor B	-26.5	5 .85989	-4.52227	0.0007
Factor A*Factor B	-0.5	4 .14357	-0.120669	0.9060

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	3105.51	5	621., 101	4.52	0.0150
Residual	1648.24	12	137. . 353		
Total (Corr.)	4753.74	17			

R-squared = 65.3276 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 50.8807 percent Standard Error of Est. = 11.7198 Mean absolute error = 8.11481 Durbin-Watson statistic = 1.47707

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between Var_l and 5 independent variables. The equation of the fitted model is

Var_l = 88.6167 + 3.13333*Factor_A + 2.06667*Factor_B –
5 . 6*Factor_A*Factor_A - 26.5*Factor_B*Factor_B - 0.5*Factor_A*Factor_B

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.05, there is a statistically significant relationship between the variables at the 95% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 65.3276% of the variability in Var_l. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 50.8807%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 11.7198. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Reports option from the text menu. The mean absolute error (MAE) of 8.11481 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the DW value is greater than 1.4, there is probably not any serious autocorrelation in the residuals.

In determining whether the model can be simplified, notice that the highest P-value on the independent variables is 0.9060, belonging to Factor_A*Factor_B. Since the P-value is greater or equal to 0.10, that term is not statistically significant at the 90% or higher confidence level. Consequently, you should consider removing Factor_A*Factor_B from the model.

ANEXO 4. Establecimiento del proceso de purificación de la Epohr a escala analítica Datos primarios.

Tabla 9.2 .Proceso de purificación de la Epohr a escala analítica. Réplica 1.

Muestra	**Volumen (mL)**	**Conc. (mg/mL)**	**Prot.total (mg)**	**Pureza** (%)	**Epo (mg)**	**Recobrados** (%)
1	250,0	0,13	32,5	0,10	3,70	100,0
2	320,0	0,10	32,0	0,10	3,60	98,0/98,0
3	325,0	0,04	13,0	-	-	-
4	23,0	0,12	2,56	-	-	-
5	43,0	0,08	3,44	87,0	2,30	63.8/62,0
6	45,0	0,01	0,45	-	-	-
7	10,0	0,01	0,10	-	-	-
8	3,70	0,48	1,77	100,0	1,77	77,0/47,8
9	2,50	0,30	0,75	100,0	0,75	42,0/20,2

El primer valor de recobrado representa el recobrado del paso y el segundo el acumulado. La concentración de la Epohr en la muestra 1 fue estimada de 15 pg/mL. Muestra 1. Aplicado a la G-25, 2: Eluato de la G-25, 3: Fracción no absorbida al Intercambio Iónico, 4: Lavado del Intercambio Iónico, 5: Eluato del Intercambio Iónico, 6: Fracción no absorbida de la matriz de hidrofobicidad, 7: *Lavado de la matriz de hidrofobicidad, 8: Elusión de matriz de hidrofobicidad, 9: Producto de de la precipitación etanólica.*

Tabla 9.37. Proceso de purificación de la Epohr a escala analítica. Réplica 2.

Muestra	**Volumen (mL)**	**Conc. (mg/mL)**	**Prot.total (mg)**	**Pureza** (%)	**Epo (mg)**	**Recobrados** (%)
1	250,0	0,16	40,0	0,10	3,70	100,0
2	350,0	0,11	38,5	0,10	3,56	96,0/96,0
3	375,0	0,03	11,2	-	-	-
4	53,00	0,10	5,30	-	-	-
5	55,00	0,04	2,20	90	2,00	57,0/54,0
6	58,00	0,00	0,00	-	-	-
7	6,00	0,02	0,12	-	-	-
8	4,50	0,32	1,44	100,0	1,44	72,0/39,0
9	2,00	0,40	0,80	100,0	0,80	55,0/21,0

ANEXO 4. Establecimiento del proceso de purificación de la Epohr a escala analítica. Datos primarios.

Tabla 9.4. Proceso de purificación de la Epohr a escala analítica. Réplica 3.

Muestra	Volumen (mL)	Conc. (mg/mL)	Prot.total (mg)	Pureza (%)	Epo (mg)	Recobrados (%)
1	250,0	0,12	30,0	0,10	3,70	100,0
2	320,0	0,09	28,8	0,10	3,55	96,0/96,0
3	325,0	0,04	13,0	-	-	-
4	23,00	0,12	2,76	-	-	-
5	43,00	0,08	3,44	87,0	2,90	82,0/78,0
6	45,00	0,01	0,45	-	-	-
7	10,00	0,01	0,10	-	-	-
8	3,70	0,48	1,77	100,0	1,77	61,0/45,0
9	2,60	0,30	0,78	100,0	0,78	44,0/21,0

El primer valor de recobrado representa el recobrado del paso y el segundo el acumulado. La concentración de la Epohr en la muestra 1 fue estimada de 15 pg/mL. Muestra 1. Aplicado a la G-25, 2: Eluato de la G-25, 3: Fracción no absorbida al Intercambio Iónico, 4: Lavado del Intercambio Iónico, 5: Eluato del Intercambio Iónico, 6: Fracción no absorbida de la matriz de hidrofobicidad, 7: Lavado de la matriz de hidrofobicidad, 8: Elusión de matriz de hidrofobicidad, 9: Producto de de la precipitación etanólica.

Centro Nacional de Investigaciones Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

ANEXO 5. *Resultados de la validación viral del proceso de purificación de la Eritropoyetina humana recombinante.*

Tabla 9.3. Resultados de la validación viral del proceso de purificación de la Eritropoyetina humana recombinante

ETAPAS	**Parvovirus**	**Poliovirus**	**VDVB**	**VIH-1**
Inactivación				
ETOH (A)	<1	<1	4	4
Remoción				
CII (B)	2	1	2	6
Butyl (C)	2	2	**<1**	3
HPLC (D)	2	2	**1**	4
Totales	6	5	7	17

A: *Inactivación por etanol al 50 % durante 2 h.*

B: Remoción por la columna de intercambio aniónico

C: Remoción por la columna de hidrofobicidad (TSK butyl)

D: HPLC: Remoción por la columna de Gel filtración -HPLC.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

ANEXO 6. Resultado de los proceso de purificación a escala piloto de la Epohr.

Tabla 9.4. Resultados de las diferentes corridas del la escala piloto del proceso de purificación de la Epohr.

Análisis/corrida	**Corrida No.1**	**Corrida No2**	**Corrida No3**	**Corrida No4.**
Pureza por SDS- PAGE	100,0 %	100,0%	100,0%	100,0%
Pureza por Filtración en Gel	97,1%	94,3	97,7	98,7%
Contenido de ácido Siálico Actividad específica	10,0 mol AS/mol prot. 84 458 Ul/mg	9,0 mol AS/mol prot. 198 720UI/mg	10,0 mol AS/mol prot. 124 959 Ul/mg	11,0 mol AS/mol prot 172 412 Ul/mg.

AS: Acido siálico

ANEXO 7. Material de Referencia de la Eritropoyetina humana recombinante.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

DIRECCION DE CALIDAD

MATERIAL	**Material de Referencia para la Eritropoyetina Humana Recombinante**	
PREPARADO POR	**Grupo de Desarrollo**	**FECHA DE PREP 31/01/2001**
CODIGO	**EPO-02-0101**	**YOL. POR VIAL 400 iiL**

ORIGEN:

Procede de los lotes de producción 46. MPA.009(30/6/01), y 46. MPA.010 (18/7/01) de Eritropoyetina, los cuales fueron obtenidos en el CIGB por vía recombinante

DESCRIPCION: Líquido transparente, sin precipitados ni partículas en suspensión.

USO

Se utilizará en:

-Determinación de pureza por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. -Número de isoformas en la zona de corrida por Isoelectroenfoque.

. -Determinación de contaminantes de la cepa hospedera por inmunodot.

. -Inmunoidentificación de la EPO por Western- blot.

-Determinación de la concentración de EPO por ELISA.

-Determinación de la relación molar siálico/proteína por el método de Peryodato-Resorcinol. -Determinación de la Actividad Biológica de la EPO por el método de Actividad Biológica.

INSTRUCCIONES DE ESTABILIDAD, TRANSPORTACION Y ALMACENAMIENTO

El análisis de estabilidad acelerado predice una pérdida de actividad de 0% por año cuando se almacena a -20°C. Por este motivo se recomienda almacenar a -20°C. No se garantiza que sean conservadas sus propiedades en caso de que el material sufra congelaciones y descongelaciones sucesivas.

La estabilidad del material de referencia será evaluada en el Control Sistemático y cualquier cambio en las propiedades se le notificará a los usuarios.

ESTADO DE LA HOMOGENEIDAD

El estudio de homogeneidad se realizó con 12 unidades del material de referencia que fueron escogidas aleatoriamente y subdivididas en dos partes ¡guales. A las 24 muestras resultantes se le asignó un orden de manera aleatorio para analizarlas. Se realizaron 6 ensayos donde se montaron 4 muestras por ensayo a las cuales se les evaluó pureza por GF-HPLC. Estadísticamente no se encontraron diferencias entre las 12 unidades por lo que se concluyó que el MR es homogéneo.

INSTRUCCIONES DE USO

Cada muestra deberá ser descongelada en el momento en que se utilizará en el ensayo que corresponda.

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

DIRECCION DE CALIDAD

MATERIAL	**Material de Referencia para la Eritropoyetina Humana Recombinante**

VALORES DE PROPIEDAD Y SU INCERTIDUMBRE

Característica certificada	**Valor**	**Unidades**	**Incertidumbre**		**Método de análisis**
			Lím. inferior	**Lím. superior**	
Actividad Biológica	**54301**	**UI/mL**	**49108**	**60043**	*** Actividad Biológica en ratones normocíticos y policitémicos**
Concentración de proteínas totales	**0.59**	**mg/mL**	**0.49**	**0.69**	**** Absorbancia a 280nm**
Pureza	**99.92**	**%**	**98.94**	**99.79**	**SDS-PAGI:**
N° de isoforma en la zona de corrida	**Se identifican de 6 a 8 isoformas ácidas en la zona de corrida.**				**Isoelectroenfoque**
Inmunoidentificación	**El lote fue identificado por el anticuerpo monoclonal (CB-EPO, observándose la banda correspondiente a la EP0 y no se observó degradación)**				**Western-blot**
Determinación de contaminantes de la cepa hospedera	**<0.25**	**%**	**0**	**0.25**	**Inmuno-dot**
Concentración de EPO	**0.327**	**mg/mL**	**0.304**	**0.352**	*****ELISA**
Relación Molar Siálico/Proteína	**12.83**	**mol/mol**	**10.80**	**14.86**	**l'eryodato-Rcsorcinol**

OBSERVACIONES

♦Actividad Biológica tomando como referencia la preparación de referencia para Eritropoyetina de la Farmacopea Europea (El515000, Erythropoietin BPR).

**** La Absorbancia a 280nm fue determinada usando como coeficiente de extinción 7.43% reportado por European Pharmacopeia-Supplement 1999, 464-467.**

*****ELISA tomando como referencia el lote de MPA 46MPA003.**

ANEXO 8. Especificaciones de Calidad de la Eritropoyetina humana recombinante.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología	SIC-033	PPO 4.10.046.92
	Edición 03	Pág. 1 de 2

Especificación de Producto Intermedio

Nombre: Materia Prima Activa de Eritropoyetina Humana Recombinante (EPO-rec)	NP 4254 Edición 02

Datos generales

Apariencia física:	Líquido transparente, libre de partículas en suspensión
Condiciones de almacenamiento:	-20 ± 2 °C
Formas de envase:	Frascos de vidrio despirogenizados
Tiempo de vencimiento:	3 meses almacenada a -20°C (datos preliminares)*
Condiciones de esterilización:	Por filtración con membranas de acetato de celulosa de 0,2 µm
Tamaño de la muestra:	1 frasco que contiene entre 30 y 50 mL de MPA de EPO-rec
Tamaño de la muestra de retención:	16 bulbos de 0,1 mL
Precauciones en la manipulación:	Manipúlese con cuidado

Composición por mL

Proteína de Eritropoyetina humana recombinante contenida en el siguiente tampón fosfato (NP 6429): dihidrogenofosfato de sodio dihidratado (NP 119) 4,68 mg/mL, hidrogenofosfato de sodio (NP 225) 9,93 mg/mL, cloruro de sodio (NP 023) 2,9 mg/mL y Tween 20 (NP 215) 0,2 g/L, pH 7,0 ± 0,2.

Pruebas que se realizan	Referencia	Límites de aceptación
Características organolépticas	PPO 4.09.140.98	Líquido transparente, libre de partículas en suspensión
Pureza por SDS-PAGE	PPO 4.09.004.91	Banda principal entre 30 y 40 kDa con una pureza ≥ 95%
Pureza por Gel filtración	PPO 4.09.284.95	Área bajo la curva del pico principal ≥ 95 % Área de los picos anteriores al pico principal < 2 %

Realizado por:	**Ing. Rebeca Bouyón Albarrán**	**Firma:**	
Departamento:	**Producción de EPO recombinante**		
Aprobado por:	**Dra. Marisel Quintana Esquivel**	**Firma:**	
Cargo:	**Directora de Calidad CIGB**	**Fecha:**	6/3/07

CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología	SIC-033	PPO 4.10.046.92
	Edición 03	Pág. 2 de 2

Especificación de Producto Intermedio

Nombre: **Materia Prima Activa de Eritropoyetina Humana Recombinante (EPO-rec)** — **NP 4254 Edición 02**

Pruebas que se realizan	Referencia	Límites de aceptación
Cuantificación de proteína total	PPO 4.09.057.92	≥ 0,1 mg/mL
pH	PPO 4.09.068.92	Entre 6,5 y 7,5
Identidad antigénica	Western Blot**	Identificación de una banda de 30 a 40 kDa
Determinación de proteínas contaminantes del hospedero	Dot Blot PPO 4.09.022.91	≤ 0,4 % de contaminantes del hospedero
Determinación de trazas de ADN del hospedero (células de ovario de hámster chino)	Hibridización por Dot Blot PPO 4.09.087.00	≤ 100 pg por cada 20 µg de EPO
Contenido de ácido siálico	PPO 4.09.053.01	≥ 10 moles/mol Proteína
Punto isoeléctrico	PPO 4.09.097.99	De 6 a 8 isoformas en el rango de pH de 2,5 a 5,0
Mapeo Peptídico	RP-HPLC de los péptidos derivados de la proteólisis PPO 4.09.012.91	Conforme al material de referencia
Actividad específica (Actividad biológica /proteínas cuantificadas por D.O) (U/mg)	Ratones policitémicos o normocitémicos	≥ 40 000 UI/mg
Esterilidad	PPO 4.09.274.94	Pasa la Prueba
Pirógenos	PNO 07.002	Pasa la Prueba

Observaciones: *Se encuentran en curso estudios de estabilidad.
** No existe código de PPO para EPO

Realizado por: Ing. Rebeca Bouyón Albarrán — **Firma:**

Departamento: Producción de EPO recombinante

Aprobado por: Dra. Marisel Quintana Esquivel — **Firma:**

Cargo: Directora de Calidad CIGB — **Fecha:** 6 / 3 / 07

ANEXO 9. Estudio de estabilidad de la Eritropoyetina humana recombinante.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE ESTABILIDAD REAL DE LA MPA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

- OBJETIVOS **DEL ESTUDIO:** Estudiar la estabilidad de la Materia Prima activa de Eritropoyetina Humana Recombinante '(EPOhr), producida en el CIGB, cuando es almacenada a - 20 °C, durante 12 meses.

LOTES ESTUDIADOS

Las características de los lotes estudiados, las especificaciones de calidad del producto así como la composición de esta MPA se muestran en las tablas Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3. El material dé envase utilizado fueron bulbos de vidrio 2R calidad hidrolítica 1.

Tabla 1: Características de los lotes estudiados.

Lote -	Fecha de fabricación	Escala de producción	Lotes de producto a que dieror. origen
46.MPA.902	31/6/99	Establecimiento	46. PF. 2002
46.MPA.903	20/7/99	Establecimiento	46. PF. 3003
46.MPA.904	24/7/99	Establecimiento	46. PF. 4004

Tabla 2: Especificaciones de calidad del producto estudiadas.

Especificación	**Límite de aceptación**
Pureza (Gel filtración)	≥ 95%
Pureza (SDS-PAGE)	≥ 95%.
C. Organolépticas	Líquido transparente libre de partículas en suspensión
Absorbancia (280 nm)	≥ 0.1 mg/mL.
Western Blot	Identificación de una banda de 30-40 kDa
Acido Siálico	≥ 10 moles/mol de proteína
Punto isoeléctrico	De 6-8 isoformas en un rango de pH de 2.5 a 5.0
Actividad específica	≥ 40 000 UI/mg

Tabla 3: Composición del buffer de MPA estudiada.

Componentes	Composición por dosis 1mL	Función
Cloruro de sodio	50 mM	Isotonizante
Fosfato de sodio dibásico	70mM	Regulador de pH
Fosfato de sodio monobásico dihidratado	30 mM	Regulador de pH
Tween 20	0.2 g/L	Estabilizante, evita adsorción inespecífica.

METODOLOGÍA GENERAL

El estudio de la MPA de EPOhr se llevó a cabo a través de una estabilidad en tiempo real, a una temperatura controlada de -20 ±2 ^{0} C, por un período de tiempo de 12 meses. Este estudio se desarrolló siguiendo un cronograma de muestreo que se estableció con anterioridad y se evaluaron en el tiempo las especificaciones de calidad antes mencionadas.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el tiempo para los diferentes lotes se muestran a continuación Lote 46.MPÁ.902

			Tiempo (meses)		
Análisis	**0**	3	**6**	**9**	**12**
Western - blot de identificación	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado
SDS PAGE (%)	100	98	100	100	100
Gel filtración (%)	94.3	100	100	98.1	97.5
Acido siálico (moles/mol de proteína)	10	9	11	15	7
Punto Isoeléctrico (isoformas)	8	-	8	-	7
Actividad Específica (Ul/mg)	198720	××	××	××	1 18191

Lote 46.MPA.903

			Tiempo (meses)		
Análisis	0	3	6	9	**12**
Western - blot de identificación	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado
SDS PAGE (%)	100	96	100	100	100
Gel filtración (%)	97.7	100	100	97.3	96.1
Acido siálico (moles/mol de proteína)	10	14	12	8	7
Punto Isoeléctrico (isoformas)	8	-	8	-	7
Actividad Específica (Ul/mg)	124959	××	××	××	115740

Lote 46.MPA.904

	Tiempo (meses)				
Análisis	0	3	6	9	12
Western - blot de identificación	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado
SDS PAGE (%)	100	100	100	100	100
Gel filtración (%)	98.7	99.8	100	97.4	94
Ácido siálico (moles/mol de proteína)	11	15	13	12	11
Punto Isoelectrico (isoformas)	7	-	8	-	7
Actividad Específica (UI/mg)	172412	78800	xx	xx	58130

xx. No se pudo cumplir con los resultados. - no corresponde hacer análisis

Durante todo el estudio el producto se conservó estéril, tamoién se observó, en el análisis organoléptico, un líquido transparente y libre de partículas en suspensión, acorde a lo especificado. El producto no tuvo problemas de pirógenos ni de proteínas contaminantes de la cepa hospedera. En todos los casos se obtuvo una absorción a 280 nm que cumplía con el límite de especificación.

DISCUSION

La actividad específica de todos los lotes se mantiene por encima oei limite de $\backslash h$ especificación establecido, no obstante se observa una tendencia a disminuir con e! tiempo de almacenamiento. El lote 46 MPA 904 mostró la mayor perdida de actividad en el tiempo En este lote la pureza determinada por gel filtración se encuentra por debajo de! límite inferior de la especificación a los 12 meses. La determinación de ácido siálico del lote 46 MPA 902 se encuentra fuera de límite a los 12 meses y ei lote 4 6 MPA 903 desde los 9 meses de estudio, no obstante estos valores muestran un comportamiento muy variable en el tiempo lo que dificulta el análisis desde el punto de vista de la estabilidad del producto.

CONCLUSIONES

Las especificaciones de identificación por Western - blot, pureza por SDS PAGE, cantidad de isoformas por Isoelectroenfoque, y Actividad Específica (UI/mg) se mantienen dentro de los límites establecidos hasta los 12 meses cuando la MPA es almacenada a - 20 °C. La pureza del lote 46 MPA. 904 por Gel Filtración de HPLC también cumple con los límites establecidos hasta los 9 meses, pero cae ligeramente por debajo del límite al final del estudio. Los valores de ácido siálico se comportan con cierta variabilidad en el tiempo por lo que no se tienen en cuenta en este caso en el análisis de estabilidad

Teniendo en cuenta estos resultados proponemos un tiempo de almacenamiento a - 20 °C para la MPA de EPOhr de 6 meses. Este tiempo se establece para la MPA formulada en

tampón fosfato salino y conservada en un envase de vidrio calidad hidrolítica I, y con un sistema de cierre que logre la hermeticidad, semejante al bulbo de vidrio 2R empleado en este estudio.

RECOMENDACIONES

1. Comenzar un nuevo estudio con lotes de producción reciente.

Realizado por: Niurmys Martínez González

Analista del Grupo de Desarrollo

Revisado por: Maribel Vega Simón

J' del grupo de desarrollo

Aprobado por: Lourdes Costa

Jefe del Departamento Analítico

Fecha : 25/1/02

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas Dirección CNICM INFOMED

ANEXO 10. Planillas de liberación de lotes producido a escala piloto de la Eritropoyetina humana recombinante.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

CENTRO DE
INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
SUBDIRECCION DE CALIDAD
INFORME DE ANALISIS PARA LA MATERIA PRIMA ACTIVA

NOMBRE Y DIRECCION DEL PRODUCTOR:
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
Ave. 31 y 158, Cubanacán, Playa. Ciudad de la Habana, Cuba. P.O.Box: 6162.

NOMBRE DEL PRODUCTO: *Eritropoyetina Humana recombinante.*

FECHA DE FABRICACION: 19/6 /99 | LOTE: 46.MPA.901

PRUEBAS	LIMITE DE ACEPTACION Y METODO	RESULTADOS
Características organolépticas	Líquido transparente, libre de partículas en suspensión. PPO: 4.09.140.98	Pasa la prueba
Determinación de pureza	a)Banda principal con una pureza ≥ al 95 %. PPO: 4.09.004.91 PPO: 4.09.006.91 PPO: 4.09.005.91 Por electroforesis (SDS-PAGE) b) Área bajo la curva del pico principal del 90 % Por gel filtración	100 % 97,1%
Cuantificación de proteína total	≥ 0,1mg/ml. DO a 280nm	0,29 mg/ml
Contenido de ácido siálico	De 9 a 13 moles/mol proteína Método colorimetrico	10 moles/mol proteína
Punto isoeléctrico	De 6 a 8 isoformas en el rango de pH de 2,5 a 5 Isoelectroenfoque	6 isoformas
Determinación de la identidad antigénica	Identificación de una banda de 35 a 37 kDa. Western Blot	Identificado
Determinación de proteínas contaminantes del hospedero	< 0,4 % de contaminantes de CHO Dot Blot	< 0,3 %
Determinación de ácidos nucleicos contaminantes	< 100 pg por cada 16,8 ug de EPO. Hibridación por Dot Blot.	< 100 pg
Mapeo peptídico	RP-HPLC de los péptidos derivados de la proteólisis, conforme al material de referencia	Conforme
Potencia (Actividad específica)	> 40 000 UI/mg. Prueba en ratones hipóxicos.	84458 UI/mg
Pirógenos	USP 23	Pasa la prueba
Esterilidad	USP 23	Pasa la prueba

CERTIFICAMOS QUE EL LOTE 46.MPA.901 DE MATERIA PRIMA ACTIVA DE LA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE, *SATISFACE* LOS REQUERIMIENTOS ESTABLECIDOS.

Lic Lourdes Costa

Cargo: Jefe de División Analítica	Firma:	Fecha: 24/2/00

BIOTECNOLOGIA

CENTRO DE
INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
SUBDIRECCION DE CALIDAD
INFORME DE ANALISIS PARA LA MATERIA PRIMA ACTIVA

NOMBRE Y DIRECCION DEL PRODUCTOR:
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
Ave. 31 y 158, Cubanacán, Playa. Ciudad de la Habana, Cuba. P.O.Box: 6162.

NOMBRE DEL PRODUCTO: *Eritropoyetina Humana recombinante.*

FECHA DE FABRICACION: 31/6/99 | LOTE: 46.MPA.902

PRUEBAS	LIMITE DE ACEPTACION Y METODO	RESULTADOS
Características organolépticas	Líquido transparente, libre de partículas en suspensión. PPO: 4.09.140.98	Pasa la prueba
Determinación de pureza	a)Banda principal con una pureza ≥ al 95 %. PPO: 4.09.004.91 PPO: 4.09.006.91 PPO: 4.09.005.91 Por electroforesis (SDS-PAGE)	100 %
	b)Area bajo la curva del pico principal del 90 % Por gel filtración	94.3%
Cuantificación de proteína total	≥ 0,1mg/mL DO a 280nm	0,35 mg/ml
Contenido de ácido siálico	De 9 a 13 moles/mol proteína Método colorimetrico	9 moles/mol proteína
Punto isoeléctrico	De 6 a 8 isoformas en el rango de pH de 2,5 a 5 Isoelectroenfoque	7 isoformas
Determinación de la identidad antigénica	Identificación de una banda de 35 a 37 kDa. Western Blot	Identificado
Determinación de proteínas contaminantes del hospedero	≤ 0,4 % de contaminantes de CHO Dot Blot	≤ 0,3 %
Determinación de ácidos nucleicos contaminantes	≤ 100 pg por cada 16,8 ug de EPO. Hibridación por Dot Blot.	≤ 100 pg
Mapeo peptídico	RP-HPLC de los péptidos derivados de la proteólisis, conforme al material de referencia	Conforme
Potencia (Actividad específica)	≥ 40 000 UI/mg. Prueba en ratones hipóxicos.	198720 U I mg
Pirógenos	USP 23	Pasa la prueba
Esterilidad	USP 23	Pasa la prueba

CERTIFICAMOS QUE EL LOTE 46.MPA.902 DE MATERIA PRIMA ACTIVA DE LA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE, *SATISFACE* LOS REQUERIMIENTOS ESTABLECIDOS.

Lic Lourdes Costa

Cargo: Jefe de División Analítica	Firma:	Fecha: 24/2/03

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección de Información
CNICM INFOMED

CENTRO DE
INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA SUBDIRECCION DE CALIDAD INFORME DE ANALISIS PARA LA MATERIA PRIMA ACTIVA		
NOMBRE Y DIRECCION DEL PRODUCTOR: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 y 158, Cubanacán, Playa. Ciudad de la Habana, Cuba. P.O.Box: 6162.		
NOMBRE DEL PRODUCTO: *Eritropoyetina Humana recombinante.*		
FECHA DE FABRICACION:20/7 /99	LOTE: 46.MPA.903	
PRUEBAS	LIMITE DE ACEPTACION Y METODO	RESULTADOS
Características organolépticas	Líquido transparente, libre de partículas en suspensión. PPO: 4.09.140.98	Pasa la prueba
Determinación de pureza	a)Banda principal con una pureza ≥ al 95 %. PPO: 4.09.004.91 PPO: 4.09.006.91 PPO: 4.09.005.91 Por electroforesis (SDS-PAGE) b)Area bajo la curva del pico principal ≥ del 90 % Por gel filtración	100 % 97,7%
Cuantificación de proteína total	≥ 0,1mg/mL DO a 280nm	0,32 mg/mL
Contenido de ácido siálico	De 9 a 13 moles/mol proteína Método colorímetrico	10 moles/mol proteína
Punto isoeléctrico	De 6 a 8 isoformas en el rango de pH de 2,5 a 5 Isoelectroenfoque	8 isoformas
Determinación de la identidad antigénica	Identificación de una banda de 35 a 37 kDa. Western Blot	Identificado
Determinación de proteínas contaminantes del hospedero	≤ 0,4 % de contaminantes de CHO Dot Blot	≤ 0,3 %
Determinación de ácidos nucleicos contaminantes	≤ 100 pg por cada 16,8 ug de EPO. Hibridación por Dot Blot.	≤ 100 pg
Mapeo peptídico	RP-HPLC de los péptidos derivados de la proteólisis, conforme al material de referencia	Conforme
Potencia (Actividad específica)	≥ 40 000 UI/mg. Prueba en ratones hipóxicos.	124959 UI/mg
Pirógenos	USP 23	Pasa la prueba
Esterilidad	USP 23	Pasa la prueba
CERTIFICAMOS QUE EL LOTE 46.MPA.903 DE MATERIA PRIMA ACTIVA DE LA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE, *SATISFACE* LOS REQUERIMIENTOS ESTABLECIDOS.		
Lic Lourdes Costa		
Cargo: Jefe de División Analítica	Firma:	Fecha: 24/3/99

BIOTECNOLOGIA

CENTRO DE
INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
SUBDIRECCION DE CALIDAD
INFORME DE ANALISIS PARA LA MATERIA PRIMA ACTIVA

NOMBRE Y DIRECCION DEL PRODUCTOR:
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
Ave. 31 y 158, Cubanacán, Playa. Ciudad de la Habana, Cuba. P.O.Box: 6162.

NOMBRE DEL PRODUCTO: *Eritropoyetina Humana recombinante.*

FECHA DE FABRICACION:24/7 /99 | LOTE: 46.MPA.904

PRUEBAS	LIMITE DE ACEPTACION Y METODO	RESULTADOS
Caracteristicas organolépticas	Liquido transparente, libre de particulas en suspensión. PPO: 4.09.140.98	Pasa la prueba
Determinación de pureza	a)Banda principal con una pureza ≥ al 95 %. PPO: 4.09.004.91 PPO: 4.09.006.91 PPO: 4.09.005.91 Por electroforesis (SDS-PAGE)	100 %
	b) Area bajo la curva del pico principal ≥ del 90 % Por gel filtración	98.7%
Cuantificación de proteina total	≥ 0.1mg/mL DO a 280nm	0.33 mg/ml
Contenido de ácido siálico	De 9 a 13 moles/mol proteina Método colorimetrico	11 moles/mol proteina
Punto isoeléctrico	De 6 a 8 isoformas en el rango de pH de 2,5 a 5 Isoelectroenfoque	7 isoformas
Determinación de la identidad antigénica	Identificación de una banda de 35 a 37 kDa. Western Blot	Identificado
Determinación de proteinas contaminantes del hospedero	< 0.4 % de contaminantes de CHO Dot Blot	< 0,3 %
Determinación de ácidos nucleicos contaminantes	100 pg por cada 16.8 ug de EPO. Hibridación por Dot Blot.	< 100 pg
Mapeo peptidico	RP-HPLC de los péptidos derivados de la proteólisis, conforme al material de referencia	Conforme
Actividad biológica	≥ 40 000 UI/mg. Prueba en ratones hipóxicos.	172412 UI/mg
Pirógenos	USP 23	Pasa la prueba
Esterilidad	USP 23	Pasa la prueba

CERTIFICAMOS QUE EL LOTE 46.MPA.904 DE MATERIA PRIMA ACTIVA DE LA ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE. *SATISFACE LOS REQUERIMIENTOS ESTABLECIDOS.*

Lic Lourdes Costa

Cargo: Jefe de División Analítica	Firma:	Fecha: 24/2/01

ANEXO 11. Diagrama de flujo del proceso de purificación de la Epohr

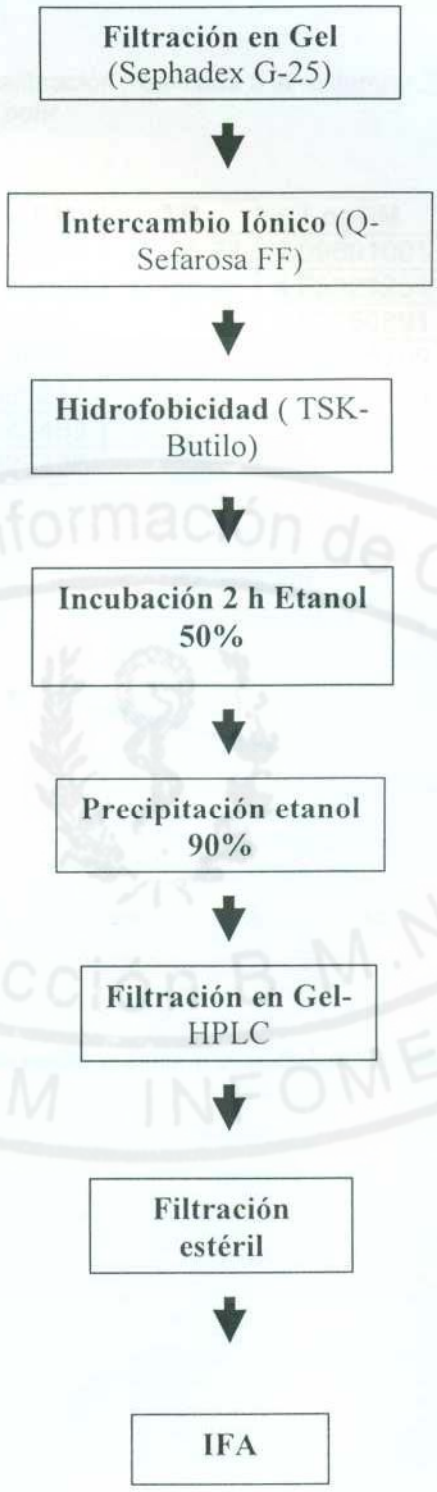

Fig 9.2. Diagrama de bloque del proceso de purificación Epohr. IFA: Ingrediente farmacéutico Activo.

ANEXO 12. Estudio de identificación de las distintas formas de la Epohr obtenida en la elusión de la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Tabla 9.5. Resultados de la calibración realizada a la columna *TSK 3000 PW, 7,5 x 600 mm para la identificación de la Epohr*

PM	LogPM	TR	LogPM	Protema
12500	4,09691	35,77	4,09691001	Citocromo C
45000	4,653213	31,67	4,65321251	Ovoalbumina
68000	4,832509	30,7	4,83250891	Albúmina
158000	5,198657	30,01	5,19865709	Aldolasa
240000	5,380211	29,61	5,38021124	Catalasa
440000	5,643453	27,57	5,64345268	Ferritina
669000	5,825426	25,5	5,82542612	Tiroglobulina

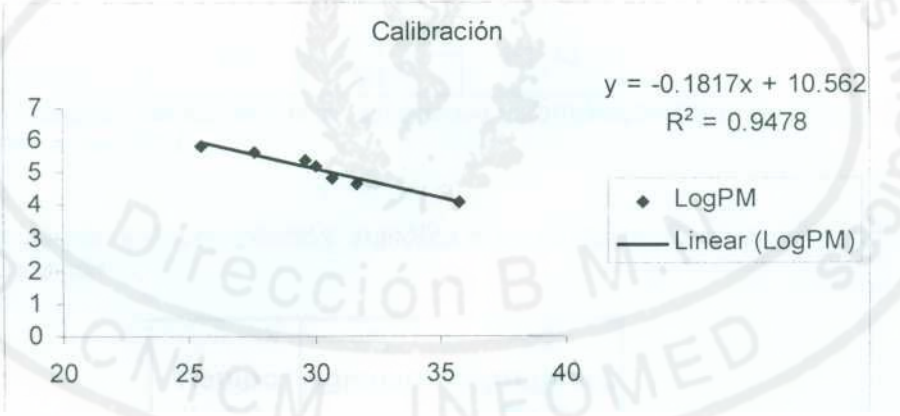

Fig 9.3. Resultados de la calibración realizada a la columna TSK 3000 PW, 7,5 x 600 mm para la identificación de la Epohr

ANEXO 13: Influencia del tiempo de reposo sobre la agregación de la Epohr eluída de la Cromatografía de hidrofobicidad

Tabla 9.6. Datos primarios del estudio de la cinética de agregación de la Epohr durante la elusión de la Cromatografía de Interacciones hidrofóbicas.

Tiempo (min)	% Agregados	% Agregados Media
0	14,7	11,8
	8,44	
30	55, 9	48,15
	40,41	
60	61,05	50,91
	40,77	
90	67,0	58,88
	50,76	
120	66,72	61,46
	56,2	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Tabla 9.7. Resultados de la precipitación etanólica a los diferentes tiempos del estudio de la cinética de agregación.

Tiempo (min)	% Agregados	% Agregados Media
0	28,24	19,78
	11,33	
30	54,83	48,31
	41,70	
60	66,72	54,91
	43,25	
90	69,5	60,36
	51,22	
120	79,58	70,12
	60,66	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC de la muestra precipitada con etanol y resuspendida en tampón PBS.

ANEXO 14: Influencia de la concentración de la proteína sobre la agregación de la Epohr.

Tabla 9.8. Estudio de la dilución del eluato de la Cromatografía de hidrofobicidad con etanol al 50 % (Tiempo 0 min)

Dilución en Etanol	% **Agregados**	% **Agregados Media**
1	14,7	11,8
	8,44	
1/2	12,3	9,87
	7,44	
1/4	11,8	9,7i
	7,4	
1/8	17,5	12,5
	7,5	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Tabla 9.9. Estudio de la dilución del eluato de la Cromatografía de hidrofobicidad con etanol al 50 % (Tiempo 120 min)

Dilución en Etanol	**% Agregados**	**% Agregados Media**
1	40,41	40,04
	30,67	
1/2	32,05	25,05
	ig,86	
1/4	27,1	21,0
	14,g	
1/8	14,7	13,40
	12,2g	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

ANEXO 15. Influencia de la concentración de la proteína sobre la agregación de la Epohr.

Tabla 9.10. Resultados del estudio de la influencia de la carga déla Cromatografía Hidrofóbica en la agregación. Valores obtenidos para el tiempo de Omin.

Carga de la columna (mg / mL)	**% Agregados**	**% Agregados Media**
0,2	11,37	9,78
	8,2	
0,4	11,06	10,35
	8,75	
1	14,7	11,8
	8,44	
1,6	22,23	19,19
	17,75	
3,2	47,8	44,77
	43,32	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Tabla 9.11. Resultados del estudio de la influencia de la carga de la Cromatografía de hidrofobicidad en la agregación. Valores obtenidos para el tiempo de 120 min.

Carga de la columna (mg / mL)	**% Agregados**	**% Agregados Media**
0,2	13,77	11,34
	8,01	
0,4	16,g6	13,41
	g,86	
1	40,41	40,04
	30,67	
1,6	42,7g	45,26
	47,73	
3,2	63,27	71,07
	78,87	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

ANEXO 16. Influencia de la concentración de la proteína sobre la agregación de la Epohr.

Tabla 9.12. Resultados del estudio de la influencia de la carga de la Cromatografía de hidrofobicidad en la agregación. Valores obtenidos para el producto de la precipitación etanólica.

Carga de la columna (mg / mL)	**% Agregados**	**% Agregados Media**
0,2	12,95	10,2
	7,46	
0,4	15,97	12,5
	9,11	
1	43,25	49,35
	55,46	
1,6	60,77	60,11
	59,45	
3,2	85,42	85,63
	85,84	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

ANEXO 17. Influencia de la concentración de la proteina sobre el paso de precipitación etanólica de la Epohr.

Tabla 9.13. Influencia de la concentración de la proteina sobre el recobrado de la precipitación etanólica.

Dilución en Etanol	**% Recobrado**	**% Recobrados Media**
1	92,0	90,0
	89,8	
1/2	72,0	71,0
	70,0	
1/4	30,0	27,0
	25,0	
1/8	27,0	25,0
	23,0	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

ANEXO 18. Influencia de la concentración de la proteína sobre la agregación de la Epohr.

Tabla 9.14. Resultados de la Influencia de la dilución del eluato de la Cromatografía de hidrofobicidad con el tampón PBS

Dilución en PBS	% Agregados	% Agregados Media
1	14,7	11,8
	8,44	
1/2	0,37	0,78
	1,19	
1/4	0,53	1,24
	1,95	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

ANEXO 19. Determinación de la influencia de la cromatografía de hidrofobicidad sobre la agregación de la Epohr.

Tabla 9.15. Cinética de agregación de la muestra que no fue aplicada a la Cromatografía de Hidrofobicidad.

Tiempo (min)	**% Agregados**	% **Agregados Media**
0	3,24	2,89
	2,54	
60	6,46	5,79
	5,12	
120	2,95	5.22
	7,5	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Tabla 9.16. Cinética de agregación de la muestra que fue aplicada a la Cromatografía de Hidrofobicidad.

Tiempo (min)	**% Agregados**	**% Agregados Media**
0	2,21	2,46
	2,71	
60	12,21	13,9
	1,6	
120	17,87	20,05
	22,23	

Los resultados muestran los porcientos de agregados determinados por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

ANEXO 20. Influencia del Tween 20 sobre la agregación de la Epohr

Tabla 9.17. Resultados de estudio de la influencia del Tween 20 sobre la agregación de la Epohr

	A		**B**	
Tiempo (min)	**% Agregados**	**% Agregados Media**	**% Agregados**	**% Agregados Media**
0	4,98 1,18 3,17	3,11	3,83 4,74 4,07	4,21
60	8,17 7,7 10,8	8,89	50,76 27,4 23,33	33,83
120	10,3 15,2 24,31	16,6	56,2 39,67 33,34	43,07

A: Muestra eluída del gel de TSK-Butilo con etanol y 0,01% de Tween 20. B: Muestra eluída del gel de TSK-Butilo con etanol (control)
Los resultados muestran los porcientos de agregados determinado por la Cromatografía de Exclusión Molecular en HPLC.

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

ANEXOS 21. Estudio de prefactibilidad económica de la producción de la Eritropoyetina humana recombinante (escenario A).

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

TABLE 8. INTEGRATED FINANCIAL ANALYSIS

(Thousands of US Dollars)

ESCENARIO A

Item		Year									
		t0	*t1*	*t2*	*t3*	*t4*	*t5*	*t6*	*t7*	*t8*	*t9*
Basic Information	**1. *Investment* (table 1, row 6)**	**$10,300**	**$1,350**	**$2,360**							
	Initial investment										
	2. *Operating cost*			**$2,472**	**$5,097**	**$6,077**	**$5,957**	**$5,857**	**$5,757**	**$5,677**	**$5,677**
	2.1 Cash expenses excluding interest (table 5, row 4)			$1,575	$4,200	$5,180	$5,060	$4,960	$4,860	$4,780	$4,780
	2.2 Depreciation (table 2, row 4)			$897	$897	$897	$897	$897	$897	$897	$897
	2.3 Interest on loan (table 7, row 1)										
	3. *Income* (table 4)			**$3,650**	**$9,900**	**$11,800**	**$10,600**	**$9,600**	**$8,600**	**$7,800**	**$15,133**
	3.1 Sales revenue (row 1)			$3,650	$9,900	$11,800	$10,600	$9,600	$8,600	$7,800	$7,800
	3.2 Subsidies (row 2)										
	3.3 Residual value (row 3)										$7,333
Investment profitability analysis	***4. Net cash earnings***										
	4.1 Taxable profit (3 - 2)			$1,178	$4,803	$5,723	$4,643	$3,743	$2,843	$2,123	$2,123
	minus taxes (20 % on profit)			$236	$961	$1,145	$929	$749	$569	$425	$425
	4.2 Net profit after taxes and interest			$943	$3,843	$4,579	$3,715	$2,995	$2,275	$1,699	$14,708
	plus interest on loan (row 2.3 above)										
	4.3 Net profit before interest and after taxes			$943	$3,843	$4,579	$3,715	$2,995	$2,275	$1,699	$14,708
	plus depreciation (row 2.2 above)			$897	$897	$897	$897	$897	$897	$897	$897
	minus replacement (table 2, row 4)										
	Total			$1,839	$4,739	$5,475	$4,611	$3,891	$3,171	$2,595	$15,605
	5. Net cash flows (4 -1)	**($10,300)**	**($1,350)**	**($520)**	**$4,739**	**$5,475**	**$4,611**	**$3,891**	**$3,171**	**$2,595**	**$15,605**
Financial analysis	***6. Financial sources (table 6)***	**$10,300**	**$1,350**	**$2,360**							
	6.1 Equity (row 2.1)	$2,060	$270	$472							
	6.2 Loans (row 2.2)	$8,240	$1,080	$1,888							
	6.3 Others (row 2.3)										
	7. Financial obligations (table 7)		$2,242	$2,242	$2,242	$2,242	$2,242				
	7.1 Repayment instalments (row 1)										
	7.2 Interest charges (row 1)										
	7.3 Dividends (row 2)										
	8. Net cash balance (5 + 6 - 7)		**($2,242)**	**($402)**	**$2,498**	**$3,234**	**$2,370**	**$3,891**	**$3,171**	**$2,595**	**$15,605**
	9. Cumulative net cash balance of row 8				**$2,498**	**$5,732**	**$8,101**	**$11,993**	**$15,164**	**$17,759**	**$48,969**

IRR= 22%

ANEXOS 22. Estudio de prefactibilidad económica de la producción de la Eritropoyetina humana recombinante (escenario B).

Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas
Dirección B M.N
CNICM INFOMED

TABLE 8. INTEGRATED FINANCIAL ANALYSIS

(Thousands of US Dollars)

Item		Year t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9
Basic information	**1. *Investment* (table 1, row 6)**	**$8,715**	**$4,830**	**$3,544**							
	Initial investment										
	2. *Operating cost*		**$410**	**$2,882**	**$5,507**	**$6,547**	**$6,427**	**$5,917**	**$5,817**	**$5,737**	**$5,737**
	2.1 Cash expenses excluding interest (table 5 row 4)			$1,515	$4,140	$5,180	$5,060	$4,960	$4,860	$4,780	$4,780
	2.2 Depreciation (table 2, row 4)			$957	$957	$957	$957	$957	$957	$957	$957
	2.3 Interest on loan (table 7, row 1)		$410	$410	$410	$410	$410				
	3. *Income* (table 4)			**$3,650**	**$9,900**	**$11,800**	**$10,600**	**$9,600**	**$8,600**	**$7,800**	**$17,692**
	3.1 Sales revenue (row 1)			$3,650	$9,900	$11,800	$10,600	$9,600	$8,600	$7,800	$7,800
	3.2 Subsidies (row 2)										
	3.3 Residual value (row 3)										$9,892
Investment profitability analysis	***4. Net cash earnings***										
	4.1 Taxable profit (3 - 2)		($410)	$768	$4,393	$5,253	$4,173	$3,683	$2,783	$2,063	$2,063
	minus taxes (20 % on profit)		($82)	$154	$879	$1,051	$835	$737	$557	$413	$413
	4.2 Net profit after taxes and interest		($328)	$615	$3,515	$4,203	$3,339	$2,947	$2,227	$1,651	$17,280
	plus interest on loan (row 2.3 above)		$410	$410	$410	$410	$410				
	4.3 Net profit before interest and after taxes		$82	$1,025	$3,925	$4,613	$3,749	$2,947	$2,227	$1,651	$17,280
	plus depreciation (row 2.2 above)			$957	$957	$957	$957	$957	$957	$957	$957
	minus replacement (table 2, row 4)										
	Total		$82	$1,981	$4,881	$5,569	$4,705	$3,903	$3,183	$2,607	$18,236
	5. Net cash flows (4 -1)	**($8,715)**	**($4,748)**	**($1,563)**	**$4,881**	**$5,569**	**$4,705**	**$3,903**	**$3,183**	**$2,607**	**$18,236**
Financial analysis	***6. Financial sources (table 6)***	**$8,715**	**$4,830**	**$3,544**							
	6.1 Equity (row 2.1)	$1,743	$966	$709							
	6.2 Loans (row 2.2)	$6,972	$3,864	$2,835							
	6.3 Others (row 2.3)										
	7. Financial obligations (table 7)		$3,144	$3,144	$3,144	$3,144	$3,144				
	7.1 Repayment instalments (row 1)										
	7.2 Interest charges (row 1)										
	7.3 Dividends (row 2)										
	8. Net cash balance (5 + 6 - 7)		($3,062)	($1,163)	$1,737	$2,425	$1,561	$3,903	$3,183	$2,607	$18,236
	9. Cumulative net cash balance of row 8				$1,737	$4,162	$5,723	$9,626	$12,810	$15,417	$51,890

IRR= 20%
NPV= $8,052

Centro Nacional de Información Científica Médicas
Dirección Bibliográfica
CNICM INFOMED