

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

## Establecimiento de un material de referencia de trabajo para interleucina-2 recombinante

Maribel Vega,<sup>1</sup> Kelly Gorrín,<sup>2</sup> Gerardo García,<sup>1</sup> Haydeé Gerónimo,<sup>3</sup> Galina Moya,<sup>1</sup> Marisel Quintana<sup>4</sup> y Mirta Castiñeira<sup>5</sup>

### Resumen

La interleucina-2 es una glicoproteína humana de 133 aminoácidos que resulta vital para obtener una respuesta inmunológica efectiva. En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología ha podido obtenerse por vía recombinante a partir de una cepa de *Escherichia coli*. Para el control de la calidad de cada lote producido se hizo necesaria la elaboración de un material de referencia de trabajo. En esta publicación se describen los pasos seguidos en la obtención del lote candidato y la preparación del material de referencia como tal. Se demostró que el patrón de trabajo preparado es homogéneo para el uso en las técnicas analíticas de control de calidad de la interleucina-2 y se predijo una pérdida de actividad inferior al 5 % anual mediante un estudio de estabilidad acelerada. Se obtuvieron valores adecuados para la pureza del material de referencia, evaluada por electroforesis y para la actividad biológica, que se estableció con trazabilidad al material de referencia internacional para este producto.

**Palabras clave:** Material de referencia, interleucina-2, material de referencia de trabajo, patrones, estándares.

Las proteínas denominadas citoquinas, dentro de las cuales se encuentran las interleucinas, están involucradas en la patogénesis de muchas enfermedades y pueden también ser utilizadas en su tratamiento. La primera interleucina descubierta y caracterizada fue la interleucina-2 (IL-2), glicoproteína de 133 aminoácidos, con masa molecular entre 13 y 17,5 kDa y puntos isoeléctricos entre 6,6 y 8,2;<sup>1</sup> se conoce que resulta vital para la generación de una respuesta inmunológica efectiva.<sup>2</sup> En 1985 se reportó que la IL-2 desempeñaba una función importante en el tratamiento de tumores sólidos, con lo cual se amplió su utilización en la clínica.<sup>3,4</sup> También puede ser empleada para aumentar la respuesta inmunológica, reparar las deficiencias celulares y/o humorales, en pacientes con enfermedades infecciosas u otros trastornos inmunológicos.<sup>5</sup> Esta proteína se ha obtenido por técnicas de ingeniería genética, aunque la IL-2 recombinante, a diferencia de la proteína humana natural, no es glicosilada; pero esta diferencia no tiene un efecto significativo sobre las funciones biológicas de la proteína.<sup>6,7</sup>

Históricamente, la potencia de las proteínas de uso farmacéutico ha sido determinada mediante el uso de

bioensayos *in vivo* o *in vitro*, seleccionados para monitorear su actividad biológica.<sup>8</sup> Los productos obtenidos por los métodos de recombinación genética exigen la disponibilidad de materiales de referencia (MR) que le ofrezcan a los usuarios un medio para asegurar la precisión y veracidad de los métodos de medición que estos empleen, con el fin de garantizar un mejor control de la calidad de las producciones. En el caso de proteínas, debido a que estas se diferencian entre sí en cuanto a su función, tamaño, actividad, estructura, etc., tienen que ser evaluadas individualmente para determinar los métodos necesarios en cada caso para la caracterización.<sup>9</sup>

Se define como un MR, una preparación con una o más propiedades suficientemente bien establecidas que se utiliza en la calibración de un equipo, la valoración de un método de medición o para asignar valores a otros materiales.<sup>10-12</sup>

Los MR biológicos son establecidos para sustancias de origen biológico o sintético que no pueden ser caracterizadas satisfactoriamente a través de métodos físicos y/o químicos.<sup>13,14</sup> Producir un MR de trabajo es importante para que cualquier compañía productora que necesite evaluar la calidad de materiales biológicos destinados para uso clínico o para la investigación, como única vía de poder asegurar que su producto tiene la estabilidad, actividad y consistencia adecuadas.<sup>13</sup>

Nuestro trabajo tiene como objetivo establecer el MR para las técnicas de control de calidad de la IL-2 liofilizada que se produce en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y realizar su caracterización, el estudio de homogeneidad y de estabilidad.

## Métodos

El material de partida para elaborar el material de referencia se obtuvo en el CIGB, de un lote de interleucina obtenido por vía recombinante a partir de *Escherichia coli*.

Antes de liofilizar el material obtenido, procedente de un lote productivo, se realizaron los pasos siguientes:

1. Dilución del material de origen con acetonitrilo al 60 % (solvente en el que se encontraba disuelto), hasta una concentración de proteína aproximada de 0,8 mg/mL.
2. Diálisis durante 46 h, a una temperatura de 4 °C, en 20 L de solución tampón constituida por 28 g de hidrógeno fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 10,8 g de dihidrógeno fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y 1 200 g de manitol, con el objetivo de eliminar el acetonitrilo. La solución fue renovada cada 12 h.
3. Centrifugación del material dializado a una velocidad de 7 000 rpm durante 40 min, para eliminar el contenido de proteína precipitada durante la diálisis.
4. Adición de dodecilsulfato de sodio (SDS), a partir de una solución madre al 10 %, para una concentración final de 0,11 mg de SDS/mL.
5. Filtración esterilizante a través de una membrana de fibra de vidrio y otra de acetato de celulosa

de 0,2  $\mu\text{m}$  de poro, una vez formulado el material centrifugado.

6. Distribución del material en bulbos de tamaño 2R (norma DIN, Alemania) de vidrio neutro y claro de borosilicato con calidad hidrolítica clase 1, con la utilización de una dosificadora automática (BAUSCH-STRÖBEL, Alemania).
7. Estudio de homogeneidad del llenado: durante este paso se pesaron estando vacíos y luego llenos un número de bulbos correspondientes al 1 % del lote preparado. Se determinó el peso del líquido en cada caso y se calculó el coeficiente de variación (desviación típica/media) de esta magnitud que se tomó como coeficiente de variación del llenado.
8. Liofilización del producto
9. Sellado de los bulbos casquillos Flip Tear Off de aluminio.
10. Inspección visual del 100 % de los viales y almacenamiento en cámara fría a  $4 \pm 2$  °C.

Al lote de material candidato a MR se le realizaron diferentes estudios para su certificación como MR:

- Estudio de homogeneidad
- Estudio de caracterización
- Estudio de estabilidad
- Estudio de caracterización del candidato MR

Se efectuó mediante la técnica de RP-HPLC que persigue detectar y cuantificar impurezas, degradaciones y modificaciones que pueda presentar la proteína, a través de la separación de los compuestos según su hidrofobicidad relativa. El estudio se basó en un diseño jerárquico donde se pudieron analizar las diferencias entre las réplicas, los bulbos, los días de ensayo y los analistas.

El procedimiento empleado en la preparación y análisis de las muestras fue el siguiente:

1. Se tomaron aleatoriamente 3 bulbos del producto liofilizado y se reconstituyeron con 200  $\mu\text{L}$  de agua para RP-HPLC. Se dividió el contenido de cada bulbo en 2 submuestras.
2. Se ordenaron aleatoriamente las submuestras.
3. Se determinó la cantidad porcentual de las especies características de la proteína intacta de las 6 submuestras en el orden aleatorio establecido mediante RP-HPLC, según se describe más adelante.
4. Se repitieron los pasos de 1 al 3 durante 6 días.
5. Se analizaron los resultados mediante análisis de varianza con el empleo del estadígrafo F de Fisher y la utilización del programa estadístico “STATISTICA FOR WINDOW”, Versión 4.2 (Statsoft, Inc. EE.UU., 1993).

### **Caracterización del candidato a MR**

Se estudió la actividad biológica por un método de proliferación y la pureza mediante electroforesis, características relevantes del MR candidato.

Para evaluar cada característica se evaluaron no menos de 12 unidades diferentes del material en diferentes ensayos para establecer en cada caso el valor a certificar y la incertidumbre del resultado obtenido.

Como estimador de la potencia biológica se empleó la media geométrica sopesada de los diferentes resultados de cada ensayo, con el empleo como coeficiente de peso el inverso de la varianza de cada uno de ellos. La medida de la incertidumbre utilizada para la potencia fue el intervalo de confianza de la media para un nivel de probabilidad del 95 %.

Para estimar el valor de la propiedad de pureza por electroforesis se aplicó el procedimiento recomendado por la Comisión de la Comunidad Europea.<sup>15</sup> Según este, se estudia la concordancia entre los valores reportados por los laboratorios participantes mediante un análisis de varianza y de acuerdo con los resultados obtenidos se calculan la media y el intervalo de confianza. En este caso el valor de la característica se evaluó a partir de los resultados individuales de cada ensayo de los distintos laboratorios que participaron en el estudio colaborativo, ya que no se encontró diferencia entre ellos. La incertidumbre para este valor se expresó como el intervalo de confianza para un nivel de probabilidad del 95 %.

## **Estudio de estabilidad**

Se realizó según el procedimiento propuesto por *Kirkwood* y colaboradores.<sup>16,17</sup> Se colocaron viales del MR en incubadoras a  $37 \pm 2$ ,  $45 \pm 2$  y  $58 \pm 2$  °C, hasta 54 días. Se evaluó la variación ocurrida en las especies características de la IL-2 detectadas por cromatografía de fase reversa en sistema de HPLC, tomando como referencia los valores obtenidos en cada corrida para una muestra almacenada a 4 °C, que es la temperatura recomendada para el almacenamiento del producto. La predicción de la estabilidad se realizó mediante el programa “Predic1” (CIGB, Cuba).

Se estudió también la estabilidad del material reconstituido mediante el análisis en diferentes días de 6 submuestras que fueron reconstituidas al mismo tiempo y evaluadas por RP-HPLC con 1 h de diferencia entre una y otra. Para la evaluación de la estabilidad en este caso se empleó un análisis de regresión de los resultados de cada día.

## **Determinaciones analíticas**

**Actividad biológica.** La actividad biológica de la IL-2 fue determinada por estimulación de la proliferación dependiente de IL-2 de la línea murina CTLL-2. Se realizaron diluciones seriadas dobles de las preparaciones de material candidato de IL-2 y del Primer Patrón Internacional establecido en 1987 por la OMS, código 86/504, en un medio RPMI 1640 sin aditivos, en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano. Las células CTLL, previamente incubadas en ausencia de IL-2 y lavadas con medio sin suero, fueron añadidas a cada pocillo y la placa fue incubada durante 46 h a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Para la estimación de la estimulación proliferativa mínima y máxima se incluyeron pocillos que contenían solo células y medio sin IL-2, y un exceso de IL-2 respectivamente. Una vez terminado el tiempo de incubación, se añadió a cada pocillo una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; 5 mg/mL). Posteriormente, la placa fue nuevamente incubada durante 4 h en las mismas condiciones, luego se añadió a cada pocillo una solución de isopropanol. Por último, se determinaron los valores de absorbancia a 750 nm de cada pocillo.

Los resultados de la actividad biológica fueron evaluados mediante el método de líneas paralelas<sup>18,19</sup> y combinados como se recomienda en la USP 23. Como primer paso, se demostró que no existen discrepancias entre los resultados de los distintos ensayos realizados mediante una prueba de chi cuadrado. Luego se obtuvo el valor medio y el intervalo de confianza según la misma recomendación.

**Pureza.** Fue evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 % en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). Las muestras fueron tratadas con tampón de tratamiento durante 10 min a 95 °C y posteriormente centrifugadas. Se aplicaron 20 µg para tinción con Coomassie G-250 y 10 µg para tinción con nitrato de plata, en condiciones reducidas y no reducidas. La cantidad en tanto por ciento que representa la banda de IL-2, que se reportó como pureza, se determinó con ayuda de un procesador de imágenes y a través del Programa Análisis Molecular versión 1.4.1 (BioRad, UK). Las determinaciones de pureza se realizaron en 2 laboratorios, cada uno de los cuales efectuó 5 ensayos.

Para estimar el valor de la propiedad de interés (pureza por electroforesis), se aplicó el procedimiento recomendado por la Comisión de la Comunidad Europea. Como no se encontraron diferencias entre los resultados de los 2 laboratorios participantes en el estudio, se tomó como estimador para esta característica la media aritmética de todos los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que no existieron diferencias entre los laboratorios participantes. Además se calcularon los límites del intervalo de confianza de la media para el 95 % de probabilidad, que se consideró la incertidumbre de la medición.

**Evaluación de las especies características de la IL-2 mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa en un sistema de HPLC.** Se aplicó de cada una de las muestras una cantidad de 50 µL a una columna de separación Baker C4 de 4,6/250 mm con un flujo de 0,8 mL/min. La detección de la señal se realizó a 226 nm. Con esta técnica se cuantificó la cantidad porcentual que representan los picos correspondientes a las especies de la proteína en relación con el total de especies que expone el cromatograma, calculando para ello el área bajo la curva con ayuda del programa BioCROM (CIGB, Cuba). Los resultados obtenidos fueron utilizados para evaluar la homogeneidad del MR.

**Determinación de la humedad relativa por el método de Karl Fisher.** El principio del método empleado es una titulación iodométrica. La oxidación de azufre por yodo en presencia de agua se expresa a través de una serie de reacciones en equilibrio. Manteniendo el pH entre 5,5 y 8,0 se asegura la presencia del intermediario que se forma entre el metanol y el SO<sub>2</sub>, el cual reacciona con el yodo en presencia del agua presente en la masa liofilizada o en la muestra líquida de que se trate.

**Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.** El método utilizado se basa en la reacción alcalina del reactivo de Biuret, que contiene iones cúpricos, formando un complejo con los enlaces peptídicos. Se reduce el  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ , en los sitios de acomplejamiento dentro de las moléculas de proteínas y ocurre la intensificación de color azul púrpura del complejo proteína-cobre, por residuos de tirosina y triptofano, cuando se adiciona el reactivo Folin-Ciocalteu. Además, con la precipitación cuantitativa de la proteína presente en la muestra utilizando deoxicolato de sodio y ácido tricloroacético, se garantizó que no existiera interferencia de algún solvente en la determinación.

## Resultados

El lote de MR preparado cuenta con 1 022 viales de IL-2 en solución tampón liofilizados. La humedad residual del lote fue del 0,2 %. El estudio de homogeneidad del llenado reporta un coeficiente de variación de 0,94 %.

La cantidad de proteínas se calculó a partir de 4 determinaciones. El valor obtenido es de 0,18 mg por bulbo con un intervalo de confianza para el 95 % de probabilidad de 0,16 a 0,19 mg.

## Estudio de homogeneidad

Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza. En cada día se analizaron un total de 6 muestras provenientes de 3 bulbos, con 2 grados de libertad para la varianza entre ellos, de manera que en los 6 días del experimento se obtuvo 12 grados de libertad para la varianza entre bulbos. De esta forma queda fijada automáticamente la cantidad de grados de libertad para la varianza entre réplicas que fue 18 grados de libertad. Como cada analista realizó la prueba la mitad de los días, el número de grados de libertad para la varianza entre días fue cuatro y para los analistas uno. La significación que se obtuvo para el efecto de los bulbos es de 0,202.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos por la técnica de RP-HPLC como parte del estudio de homogeneidad se muestra en la tabla 1.

TABLA 1. Análisis de varianza para los resultados de la pureza por RP-HPLC

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Significación
Analistas	13,92	1	13,08	11,09	0,029
Días	13,89	4	1,18	1,02	0,426
Bulbos	4,71	12	1,16	1,50	0,202

Réplicas	13,08	18	0,77
Total	45,62		

## Caracterización

**Actividad biológica.** El valor de la media geométrica sopesada de los resultados de las determinaciones realizadas es de 973 583 UI/bulbo y el intervalo de confianza de la media se extiende desde 86 7315 hasta 1 092 871 UI/bulbo. Teniendo en cuenta que el bulbo contiene 0.18mg de proteína, la actividad específica del producto resulta en este caso  $5,41 \times 10^6$  UI/mg.

**Pureza por SDS-PAGE.** Los resultados de las determinaciones realizadas por la técnica de electroforesis se sometieron a un análisis de varianza (tabla 2). El estudio de los valores reportados por los laboratorios participantes demostró que no existen diferencias significativas entre los 2 juegos de valores, por lo que se calculó el valor de pureza como la media aritmética de todos los resultados obtenidos. El valor de pureza obtenido es de 99,92 % con un intervalo de confianza que se extiende desde el 99,50 hasta el 100 %.

TABLA 2. Análisis de varianza para los resultados de pureza por SDS-PAGE

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	Significación	F crit
Entre grupos	0,4	1	0,4	0,620752	0,453478	5,317645
Dentro de grupos	5,15504	8	0,64438			
Total	5,55504	9				

## Estudio de estabilidad

Los resultados que reportó la técnica de RP-HPLC para el estudio de estabilidad del material liofilizado se indican en la tabla 3. La pureza relativa es la relación de la pureza de la muestra sometida a calentamiento con respecto a la muestra de 4 °C.

TABLA 3. Valores relativos de las especies determinados por RP-HPLC en el estudio de estabilidad

Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Cantidad relativa de las especies características de la IL-2
4	54	1,00
45	25	0,90
58	25	0,85
45	54	0,82
58	54	0,70

Mediante el programa “Predic1” se predice una pérdida del 2,92 % por año.

A partir de los resultados del estudio de homogeneidad también se analiza la estabilidad del material reconstituido. En la tabla 4 se presentan estos resultados de las submuestras en función del tiempo que estuvieron reconstituidas antes de realizarse el ensayo de RP-HPLC. A los resultados de cada día se les aplicó un análisis de regresión pero en ningún caso esta es significativa.

TABLA 4. Resultados de la estabilidad del material reconstituido en función del tiempo

Tiempo (horas) que la muestra permanece reconstituida	Analista 1			Analista 2		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
0	91,3	88,7	91,2	93,5	92,5	92,7
1	91,0	91,1	90,6	91,4	92,0	92,6
2	92,2	91,1	91,6	91,9	92,7	91,8
3	91,8	91,1	89,9	91,9	92,4	92,9
4	92,0	93,0	88,9	93,0	92,9	89,6



5	91,7	91,5	90,5	91,8	92,1	93,2
---	------	------	------	------	------	------

## Discusión

El valor del coeficiente de variación del llenado, inferior al 1 %, es menor que la variación de cada técnica en la cual se empleará el MR. Esto unido al bajo nivel de humedad del material fueron premisas para continuar el proceso de caracterización.

En el estudio de homogeneidad se empleó un diseño jerárquico debido a que en el experimento se deseaba conocer además de la homogeneidad de los bulbos, otras características como la variabilidad de los resultados en diferentes días y las diferencias entre los analistas que realizaron las técnicas. Este diseño proporciona ventajas de precisión con respecto a lo propuesto en la literatura, ya que disminuye la varianza del efecto entre los bulbos y entre las réplicas, además de aumentar significativamente el número de grados de libertad de la varianza entre réplicas. Evidentemente el costo del estudio es mayor, pero esto se compensa con la información adicional que se puede obtener del diseño: efecto de días y analistas. La cantidad de bulbos utilizados en el estudio estuvo de acuerdo con las recomendaciones dadas por la IUPAC.<sup>20</sup>

El hecho de obtener una significación para el efecto entre bulbos mayor que 0,05 permitió concluir que el material es homogéneo, lo cual es un requerimiento imprescindible para el empleo de un MR.

Del estudio de homogeneidad también se pudo concluir que no existe diferencia significativa debida al efecto de los días, aunque sí entre los analistas (tabla 1). No obstante, estas diferencias no tienen relación ni afectan la homogeneidad del lote.

El hecho de que el MR haya resultado homogéneo mediante la técnica de RP-HPLC, garantizó que también lo sea para las técnicas en las cuales se empleará. Esto se debe a que mientras mayor es el grado de precisión del método por el que se evalúa la homogeneidad, mayor rigor tiene la conclusión del análisis. Si no se encuentra variación entre los viales utilizando un método muy preciso, esta tampoco será detectada por métodos de mayor variabilidad.

En el proceso de caracterización la actividad biológica del MR quedó evaluada utilizando el MR internacional, lo cual es importante para los trabajos de normalización de la técnica analítica. El valor de actividad específica obtenido fue del mismo orden que el de otras preparaciones comerciales de IL-25,<sup>21</sup> como, por ejemplo, la Proleukin (Cetus-Chiron). El MR preparado queda entonces caracterizado de forma apropiada para ser empleado como referencia en el ensayo de actividad biológica.

La elevada pureza obtenida mediante análisis electroforético permitió utilizar el MR como referencia para la técnica de electroforesis y está en concordancia con los valores recomendados para este uso.<sup>20,21</sup>

El estudio de estabilidad realizado por RP-HPLC detectó modificaciones en la molécula que no se observaron por electroforesis. El valor de pérdida anual obtenido en el estudio de estabilidad acelerado fue inferior en magnitud al rango de variación de las técnicas de actividad biológica. Según este resultado se espera que el material pueda ser empleado durante 3 años como se previó. No obstante, como parte del sistema de control establecido para los MR en el CIGB, los resultados durante el uso del MR en cada técnica analítica se evalúan sistemáticamente para corroborar el resultado obtenido en este estudio de estabilidad y tomar las medidas necesarias en caso de que no se mantengan los valores asignados al MR durante la caracterización.

Las variaciones en la pureza de las muestras reconstituidas responden a inestabilidad de la muestra en estas condiciones, ya que en ningún caso la regresión con respecto al tiempo de almacenamiento resultó significativa. Esto permite establecer que un vial de MR puede ser empleado en sucesivas aplicaciones que se realicen en un tiempo no mayor de 5 h.

En conclusión, el MR que se preparó puede emplearse como referencia para la evaluación de la actividad biológica de la IL-2 y en la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. Con la caracterización de este lote de MR se asegura la rigurosidad de los análisis y la normalización de las técnicas analíticas empleadas para el control de calidad de la IL-2, por lo que se pueden obtener valores de actividad biológica trazables al MR primario o internacional certificado por la OMS.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen la contribución de los técnicos Makis Torres y Rubén López, cuyo trabajo fue imprescindible para la culminación de este artículo.

## **Summary**

### **Establishment of a working reference material for recombinant interleukin-2**

Interleukin-2 is a human glycoprotein with 133 aminoacids that is crucial for attaining an effective immunological reaction. In the Center of Genetic Engineering and Biotechnology this protein has been obtained as a recombinant product from *Eschericia coli* bacteria. For the quality control of every batch produced, it was necessary to establish a working reference material. In this paper we describe the steps taken to obtain a candidate batch and the preparation of the working material as such. It was proved that the working pattern obtained is homogenous for its use in the analytical techniques of quality control of interleukin-2. A loss of activity lower than an annual 5 % was predicted by an accelerated stability study. Adequate values were attained for the purity of the reference material, evaluated by electrophoresis, and for the biological activity that was established with traceability to the international reference material for this product.

**Key words:** Reference material, interleukin-2, working reference material, patterns, standard.

## Referencias Bibliográficas

1. Nadeau RW, Oldfield NF, Garland WA, Liberato DJ. Quantification of recombinant Interleukin 2 in human serum by a specific immunobioassay. *Anal Chem.* 1989;15(61):1732-6.
2. Smith Kendall A. Interleukin-2. The First Hormone of the immune system to be recognized. *Sci Am.* 1990;March:26-53.
3. Tsuji Takashi, Ryusuke Nakagawa, Nobuyuki Sukimoto, Ken-Ichi Fukuhara. Characterization of disulfide bonds in recombinant proteins: reduced human Interleukin 2 in inclusion bodies and its oxidative refolding. *Biochemistry.* 1987;11(26):3129-34.
4. Cohen FE, Kosen PA, Kuntz ID, Epstein LB, Ciardelli TL, Smith KA. Structure-activity studies of Interleukin-2. *Sci Reports.* 1986;(234):349-53.
5. Hora MS, Rana RK, Cynthia L, Wilcox N, Katre V, Hirtzer P, et al. Development of lyophilized formulation of Interleukin 2. *International Symposium on Biological Freeze-Drying. Dev Biol Stand (Bethesda).* 1991;(74):295-306.
6. Tsuji Takashi, Ryusuke Product Nakagawa, Nobuyuki Sukimoto, Ken-Ichi Fukuhara. Characterization of Disulfide bonds in recombinant proteins: reduced human Interleukin 2 in inclusion bodies and its oxidative refolding. *Biochemistry.* 1987;11(26):3129-34.
7. Sano Chiaki, Kohki Ishikawa, Nobuya Tagashima, Takashi Tsuji, Tetsuya Kawakita, Ken-Ichi Fukuhara, et al. Crystallization and preliminary x ray studies of human recombinant Interleukin-2. *J Biol Chem.* 1987;10(262):4766-9.
8. Riggin RMR, Farid NA. Analytical chemistry of therapeutic proteins. *Anal Biotech.* 1990:113-26.
9. Federici MM, Garnick RL. A perspective on Reference Standard and Reference Material requirements in Biotechnology-derived pharmaceutical protein products. *Pharmacopeial Forum.* 1991;2683-7.
10. Mesley RJ, Pocklington WD, Walker RF. Analytical Quality Assurance. *Analyst.* 1991;(116):975-990.
11. ISO Guide 35. Certification of Reference Materials. General and Statistical Principles. 2nd ed. 1989.
12. Gullberg M. Structural analysis of high-versus low-affinity Interleukin-2 receptors by means of selective expression of distinct receptor classes. *EMBO J (Oxford).* 1986;9(5):2171-8.
13. OMS. Pautas para la preparación, caracterización y establecimiento de patrones internacionales y de otra índole y de reactivos internacionales de referencia para sustancias biológicas. Serie de Informes Técnicos 800. Anexo 4. 1990.
14. Bangham DR. Control of new biologicals in the United Kingdom: Personal views from a biologist. 1986. p. 279-91.
15. Marchandise M. Commission of European Communities. Community Bureau of Reference. New Reference Materials improvement of methods of measurement. 1985. p. 81-6.
16. Tydeman MS, Kirwood TBL. Design and analysis of accelerated degradation test for the stability of biological standards I. Properties of maximum likelihood estimators. *J Biol Stand.* 1984; (12):195-206.
17. \_\_\_\_\_. Design and analysis of accelerated degradation test for the stability of biological standards II. A flexible computer program for data analysis. *J Biol Stand.* 1984;

(12):207-14.

18. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP. 23. NF. 18. Rockville: Mack Printing; 1995.
19. Finney DJ. Statistical Methods in Biological Assays. 2da ed. Charles Griffin & Cia; 1964.
20. WHO. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Technical Report Series (Geneva) Report. 1982;28:681.
21. Cohen FE, Kosen PA, Kuntz ID, Epstein LB, Ciardelli TL, Smith KA. Structure-activity studies of Interleukin-2. Sci Reports. 1986;(234):349-53.

Recibido: 10 de febrero de 2005. Aprobado: 10 de marzo de 2005.

MC. *Maribel Vega*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, municipio Playa, Apartado Postal 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba.

**1**  
**Master en Ciencias.**

**2****Licenciada en Ciencias Farmacéuticas**

**3****Licenciada en Bioquímica**

**4****Doctora en Ciencias. Profesora Auxiliar.**

**5****Doctora en Ciencias. Profesora Titular.**