

On the challenges in developing competitive technologies

Jorge L Vega, ✉ José A Buxadé

Center for Genetic Engineering and Biotechnology, CIGB
Ave. 31 / 158 and 190, Playa, PO Box 6162, Havana 10600, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: jose.acosta@cigb.edu.cu

The search for new molecular entities (NME) to satisfy unmet medical needs is a very expensive task with a very low rate of success. The discovery of a useful molecule is, by nature, an event that depends on the complexity of the disease under investigation, research planning and management, time and other less predictable dependent variables. Drug development, from the laboratory to regulatory approval for commercialization, usually takes more than 7 years and costs hundreds of millions of dollars. The low productivity and high risk of research and development (R&D) in the biotechnology industry suggests that more attention must be paid to innovation on new pharmaceutical formulations, more efficient and economic technologies, and new medical applications for existing products with a well-known efficacy and generally recognized as safe. Results of these innovative efforts will be found in the Abstracts, following this paper, which were presented at the 15th edition of the CIGB's Scientific Workshop, held in June 2004.

These Abstracts describe the kinetics and scaling up of plantibody production and the consistency of several manufacturing processes. They also show the downstream process for manufacturing a DNA molecule, such as a potentially active pharmaceutical ingredient, for gene therapy and recent innovations in the upstream process by using microbial and mammalian cells.

Recent advances in the development of new technologies and medical applications at the CIGB have been recognized by the mainstream journals. Prestigious scientists from the Leicester Royal Infirmary (United Kingdom), the Imperial College Faculty of Medicine (United Kingdom) and the CIGB conducted a well-designed clinical trial on mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis with the Epidermal Growth Factor (EGF) manufactured by the Cuban institu-

tion. Remission was achieved in more than 80% of the patients and no side effects were reported by any of the patients taking EGF [1]. CIGB's scientists and engineers published the expression and scaling-up of a monoclonal antibody (MAb) by using tobacco plants as bioreactors. A praiseworthy work involving more than 30 highly skilled professionals was performed to obtain large amounts of the antibody. Among other advantages, lower production costs, a virtually unlimited scale-up potential, and no known susceptibility to human or animal diseases make the plant system a very attractive alternative [2]. The large-scale synthesis, at the CIGB production plant, the pharmaceutical development and clinical trials of the first synthetic vaccine have been published by Science Magazine [3]. These results were described as a sweet victory for Cuban science by two editorial comments of Nature and Science [4, 5].

Penetrating the most demanding markets with new products and overcoming regulatory barriers by developing safer and more economic technologies are major challenges for biotechnologists participating in this Scientific Workshop. Producing biomolecules in transgenic plants represents an attractive alternative for substituting microorganism and mammalian cells in the biotechnology industry, while CIGB's production staff still has the challenge of maintaining statistically consistent manufacturing processes in compliance with current Good Manufacturing Practices. Improving the recovery and lowering the costs of manufacturing processes were also focused in round tables, presentations and posters in this workshop. The discussions were basically on technologies of products that are currently in the market, but that will probably have an impact in the development of NME that could be eventually discovered by the CIGB research staff.

1. Atul S, Nightingale J, West KP, Berlanga-Acosta J, Playford RJ. Epidermal Growth Factor Enemas with Oral Mesalazine for Mild-to-Moderate Left-Sided Ulcerative Colitis or Proctitis. *Eng J Med* 2003;349(4):350-7.

2. Valdés R, Gómez L, Padilla S, Brito J, Reyes B, Álvarez T, et al. Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochem & Biophys. Res Commun* 2003;308:94-100.

3. Verez-Bencomo V, Fernández-Santana V, Hardy E, Toledo ME, Rodríguez MC, Heynngnezz L, et al. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science* 2004; 305:522-5.

4. Kaiser J. Synthetic vaccine is a sweet victory for Cuban science. *Science* 2004; 305:460.

5. Frantz S. Vaccines: Sweetness synthesized. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004;3 (7):1.

REPORT

Purificación de ADN plasmídico con fines terapéuticos, con ADN Gumboro como modelo

Raysa Vázquez, Ivonne Perera, Mariela Pérez, Inalvis Herrera, Madeline Paneque

Unidad de Desarrollo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: raysa.vazquez@cigb.edu.cu

En los últimos 10 años, la tecnología de vacunación con ADN se ha desarrollado rápidamente. En la actualidad, la producción eficiente de ADN plasmídico con calidad farmacéutica a gran escala constituye un proceso que requiere experiencia y un alto nivel tecnológico. En la unidad de Desarrollo del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología se desarrolló un método de purificación de plásmido superenrollado, con la calidad farmacéutica, y las especificaciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud para su empleo profiláctico en la enfermedad de Gumboro y como terapia, en la avicultura. Gumboro es una enfermedad que afecta a las aves al provocarles niveles de inmunosupresión elevados, de ahí su repercusión para la avicultura mundial. Se estableció una tecnología rentable, con resultados satisfactorios y reproducibles, con una pureza mayor del 90% y un rendimiento de 120 mg/lotos. El paso de diafiltración con membranas de poliethersulfone 0.1 μm es de relevante importancia, ya que logra eliminar más del 50% de los contaminantes tipo ARN y proteínas de bajo peso molecular. La cromatografía de intercambio iónico en Q-sefara elimina el ARN y las proteínas remanentes después del paso de diafiltración y el tamiz molecular elimina contaminantes como endotoxinas y lipopolisacáridos, además, separa las diferentes isoformas.

Avances en el desarrollo del proceso fermentativo de SK-plus

Jorge Valdés, Victoria Lugo, Sheyla Álvarez, Gabriel Márquez, Yanelys Pestana, Inalvis Herrera, Odaly Amarante, Aramis González, Edgar González, Héctor Lucas, Manuel Mansur

Unidad de Desarrollo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: jorge.valdes@cigb.edu.cu

El aumento de la productividad de los procesos fermentativos constituye una estrategia para lograr una capacidad productiva elevada y un costo unitario competitivo del producto. En años anteriores se logró establecer un cultivo discontinuo de *Escherichia coli* en un medio complejo, en el que la expresión de la proteína es inducida por ácido-3 β -indolacrílico. Mediante este proceso fermentativo se alcanzó una concentración celular de 7.1 ± 1.0 UDO y $11.7 \pm 0.7\%$ de expresión. El costo de los insumos de fermentación fue de 2.3 dólares por litro. Con estos niveles de rendimiento es inviable una producción futura, por lo que se realizó un estudio para aumentar la densidad y así mejorar el rendimiento fermentativo. Se diseñó un medio de cultivo para alcanzar entre 130 y 150 g/L de peso húmedo con un cultivo incrementado (CI), con tres variantes de suplemento al medio de cultivo. Una variante fue la adición de extracto de levadura en el incremento, otra fue el suplemento mínimo de una mezcla de extracto de levadura e hidrolizado de caseína, y la última fue sin adicionar ningún suplemento de medio complejo. La densidad celular alcanzada con el medio suplementado con extracto de levadura fue de 145 ± 8 g/L PH y la expresión fue superior al 12%. Con esta condición se realizaron 15 fermentaciones, de las cuales 3 se purificaron hasta el final, hasta obtener la SK-plus con la calidad requerida. El costo específico de las materias primas se redujo de 0.24 a 0.02 dólares por gramo.

Estabilidad de sobrenadantes del cultivo de células CHO ricas en una proteína recombinante humana

Yalina Ordaz, Lázaro Martínez, Noel Herrera, Maribel Vega, Niurmys Martínez, Michel Diéguez, Osnel García, Dayamy González, Nelson Rodríguez, Raudel Sosa, Margela Montañez, René Gallo, Alay Velazco

Unidad de Desarrollo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: yalina.ordaz@cigb.edu.cu

La conservación de materiales biológicos en etapas del proceso productivo es un punto clave en la industria biofarmacéutica actual, porque permite su uso controlado de acuerdo con las demandas de productos. Es posible que las proteínas de los sobrenadantes celulares puedan ser susceptibles a las condiciones adversas, debido a la concentración de solutos que se produce durante el proceso de congelación, además de las propias interacciones que hay entre ellas. Por ello, es de suma importancia determinar las condiciones ideales para su conservación durante períodos predeterminados. Para eso se llevó a cabo un estudio de estabilidad de las cosechas filtradas, obtenidas a partir de una línea celular CHO que produce una proteína humana recombinante de manera estable. Este estudio se hizo en 6 meses, a temperaturas controladas entre 4 y -20 °C. Se desarrolló según un cronograma de muestreo, el cual se estableció antes, y se evaluaron las especificaciones de calidad: western-blot, cuantificación por ELISA y control microbiológico. Al final, las especificaciones de calidad se mantuvieron dentro de los límites establecidos, entre 4 y -20 °C, lo que permitió determinar la temperatura de almacenamiento adecuada para los sobrenadantes de cultivo en un período de 6 meses.

Expression of streptokinase in *Escherichia coli* under the control of the T7 RNA polymerase promoter

Amado León, Marbel Ramos, Yaquelin Puchades, Caridad A. Gasmuri, Diliiana Pérez, Raudel Sosa, Zeila Santana, Adelina Pérez, René Meynardiez, Yanara García, Gabriel Márquez, Yai Cruz, Luciano Hernández

Planta de producción de estreptokinasa recombinante, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 / 158 and 190, Playa, PO Box 6162, Havana 10600, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: amado.leon@cigb.edu.cu

The use of β -lactamic antibiotics in the production process of recombinant proteins with therapeutic purposes is forbidden by the World Health Organization in the Technical Report N° 771 of 1988. Also, under the pTrp promoter the recombinant streptokinase (rec-Sk) is repressed only for a short period, enabling the expression of the protein of interest since the first hours of the culture. The repression time of foreign proteins is very important, since it may enable a greater cell growth. The present study evaluates a new genetic construction at bench scale (5 L), in which we transformed the strain of *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (Δ DE3) with the expression vector pET-3b/SKC-2/Kan, which is under the promoter's regulation T7 RNA polymerase and it encodes the synthesis of the rec-Sk, using Kanamycina as the selection marker. With the expression system described here, we achieved an expression level of rec-Sk of 25%, the growth of *E. coli* of 85 uO.D, a volumetric production of 2 600 mg/L (2.6 times higher) and a specific productivity of 104 mg/L/h, wich is 1.9 fold higher than the one obtained with the strain W3110.

GCSF, demostración de la consistencia del proceso productivo

Marbel Ramos, Natacha Pérez, Catalina Álvarez, Yai Cruz, Rogers Moya, Herma Cuesta, Lázaro Estenoz, Yohanix López, Oleg Evio Savinova, Abel Domínguez, Mayra Ponce

Unidad de desarrollo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: marbel.ramos@cigb.edu.cu

El factor estimulador de colonias de granulocitos recombinante (GCSFr), se produce en el CIGB. Es un medicamento que incrementa el valor de los granulocitos neutrófilos en sangre periférica, en 24 horas. Se indica para reducir la duración de la neutropenia y su incidencia en pacientes con neoplasias. Se realizó un análisis del proceso productivo que condujo al establecimiento de los puntos de inspección y ensayo, y de las especificaciones de los productos intermedios; lo cual se corroboró en campañas productivas posteriores. Para determinar los límites de aceptación de cada producto, se utilizaron técnicas de control microbiológico, de determinación del crecimiento celular, de la pureza de la proteína de interés y se realizaron gráficos de control. La demostración de que el proceso de obtención del ingrediente farmacéutico activo (IFA) es reproducible de acuerdo con los resultados de los diferentes pasos se aprecia en las tablas y gráficos de control. Los límites de aceptación de los parámetros que conforman las especificaciones para el control de la biomasa de fermentación, la biomasa rota lavada y el purificado quedaron establecidos.

Ausencia del gen *nptII*, procedente de *Escherichia coli*, en las aguas residuales del cultivo de tabaco transgénico productor del anticuerpo HB-01: estudio preliminar

Diamilé González, José E Brito, Yenay Díaz, Juana M Hernández, Meilyn Rodríguez, Nadia Ramírez, Pedro L Ramos, Miriam Cisneros

Unidad de desarrollo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: diamile.gonzalez@cigb.edu.cu

La liberación al ambiente de cultivos transgénicos es preocupante debido a la posibilidad de dispersión del ADN transgénico por polinización cruzada con especies relacionadas o por transferencia de genes a otras especies. Las plantas de tabaco transgénico que se emplean en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) para la producción del anticuerpo HB-01 contienen el gen *nptII*, que confiere resistencia a varios antibióticos cuando es transferido a microorganismos. Por ello, es crucial asegurarse de su ausencia en las aguas residuales del cultivo de estas plantas y testar su habilidad para integrarse al genoma de microorganismos. Este trabajo reporta el análisis de esos residuos líquidos con el objetivo de verificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la ausencia de trazas de ADN portadoras del gen *nptII*, y elucidar el gen es capaz de transformar microorganismos competentes una vez integrado al genoma vegetal. Mediante la PCR, no se detectó el gen *nptII* en las aguas residuales y es imposible recuperarlo por transformación de células competentes de *Escherichia coli* con 10 mg de ADN cromosomal de plantas transgénicas. Se aislaron cinco microorganismos resistentes a la kanamicina de los residuales, cuyo fenotipo no se debió a la presencia del gen *nptII*.

Evaluación de la insulina humana recombinante en el cultivo de una línea celular CHO productora de eritropoyetina humana recombinante

Elias Nelson Rodríguez, Yalina Ordaz, Lázaro Martínez, Noel Herrera, Pedro Casanova, Mayté Pérez, Juan Manuel Ruiz, Osmani Rodríguez, Rachel Berrio, Dianelys Cabrera, Leandro Godínez, Rebeca Bouyón

Planta de producción de eritropoyetina recombinante, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: elias.nelson@cigb.edu.cu

La insulina se emplea como suplemento del medio D-MEM para el cultivo de las células de la línea de producción CHO en la obtención de eritropoyetina humana recombinante (EPO rec). Se conoce que el empleo de insulina en los medios de cultivo para células de mamíferos, reacciona ante la acción preponderante que tiene en la internalización y metabolismo de la glucosa en estas líneas celulares. Con el objetivo de introducir la insulina humana recombinante en sustitución de la insulina de origen bovino en el proceso de producción de EPO rec se realizaron los ensayos a escala de laboratorio, y posteriormente, los lotes a escala piloto. Ambos estudios confirmaron la consistencia y reproducibilidad de los resultados, lo cual hace posible la introducción de este cambio de proceso en la producción. Se demostró que no existen diferencias en el comportamiento de la línea celular y el proceso productivo con respecto al uso de tres tipos de insulina: insulina bovina Gibco, insulina recombinante Novo-Nordisk en cristales y en suspensión. Se hizo un análisis económico que indicó la importancia de la sustitución para la reducción de los costos.

Kinetics of the expression of the Plantibody-HB01 specific for the surface antigen of hepatitis B virus in *Nicotiana tabacum*

Leonardo Gómez, Merardo Pujol, Rodolfo Valdés, William Ferro, Roberto Pérez, Sigifredo Padilla, José Brito, Carlos Borroto, Alberto Núñez, Milagro Font, René Gallo, Julio César Sánchez

Monoclonal antibody department, Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB)
Ave. 31 / 158 and 190, Playa, PO Box 6162, Havana 10 600, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: Leonardo.gomez@cigb.edu.cu

In this study, a recombinant monoclonal antibody specific for the Hepatitis B surface antigen (HBsAg) was expressed in *Nicotiana tabacum* plants to be used for the immunopurification of HBsAg for human use as a vaccine preparation. Tobacco plants were grown in green houses under controlled conditions at the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). Three variants of substrates were evaluated; Zeolite, Zeolite + Soil, and Soil and leaf samples of fifteen plants per now were studied weekly. The samples were analyzed by ELISA, and Lowry. The mass of the plants was also determined, as well as parameters such as temperature and humidity. These determinations enable the evaluation of the kinetics of expression for determining the moment of crop and the best variants for scaling up the production of plantibody-HB01. The highest expression level of plantibody HB01 was obtained after 6 weeks in the variant using soil with 42.95 mg/kg of leaves followed by the variant using Zeolite + Soil with 30.94 mg/kg and 24.53 mg/kg of leaves in Zeolite. During the following weeks, the Zeolite + Soil variant showed slightly higher values than those obtained with the Soil variant. These determinations allowed us to evaluate the kinetics of expression to optimize the harvesting time and the best variant for scaling up the production of this plantibody. The variant using Zeolite was nevertheless selected due to regulatory constraints, since this is a controlled substrate.

Purification of the antibody for HBsAg from the *N. tabacum* plant at different scales

Sigifredo Padilla¹, Rodolfo Valdés¹, Leonardo Gómez¹, José Brito⁵, Otto Mendoza¹, Luis Y Pol¹, Leonardo Pacín¹, Orlando Herrera¹, William Ferro¹, Merardo Pujol², Cristina García¹, Lorely Milá³, Marbelis Linares⁴, Yasser Hevia⁴, Rolando Paez⁴, Jorge L Vega⁵, Carlos Borroto⁶

¹Monoclonal antibodies production department

²Plants research department

³Quality Control Department

⁴Development of production department

⁵Production Direction

⁶Agriculture Direction

Center for Genetic Engineering and Biotechnology, CIGB

Ave. 31 / 158 and 190, Playa, PO Box 6162, Havana 10600, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: sigifredo.padilla@cigb.edu.cu

The use of plants to produce diverse recombinant proteins such as antibodies, vaccines, hormones, additives, oils, etc. has now been widely extended. One of the main challenges is to purify the target protein contained in the complex tobacco extract. Considering this difficulty, numerous experiments were made at an analytic scale to decide the best purification strategy, in order to obtain the protein with a high purity and recovery. Once the best alternative was chosen, we decided to increase the production scale little by little, to be able to check if the quality of the target protein is maintained. In this paper we compare the yield, recovery and purity at (10, 60, 100 and 450) Kg of plants. The purification process consists of a milling step, a clarification step and a main step consisting of affinity in expanded bed chromatography with r-protein A. In all batches the results obtained were similar to those at the analytic scale. The yield of the process ranged from 10 to 12 mg IgG/Kg of processed biomass.

Metodología para la detección de trazas de ADN de tabaco transgénico en muestras de planticuerpo HB-01

Diamilé González, Arianne Castro, Maida Candelario, José E Brito, Cecilia Cabello, Iliana Delgado, Alberto Salazar

Unidad de Desarrollo, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: diamile.gonzalez@cigb.edu.cu

En la División de Investigaciones Agropecuarias del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se expresó el anticuerpo anti-HBsAg en plantas de tabaco transgénico que se emplean en la producción de la vacuna contra la hepatitis B, como una alternativa al CB Hep-1. En el CIGB no existía una técnica analítica que posibilitara determinar las cantidades de ADN que pudieran contaminar las muestras finales de CB Hep-1 obtenido en plantas. Se realizó un análisis de la concentración de ADN cromosomal del hospedero en muestras finales e intermedias del proceso de producción de CB Hep-1 recombinante, a partir de plantas de tabaco transgénico. Como resultados, se logró el establecimiento del protocolo de hibridación por dot-blot, el cual permite la detección de hasta 100 pg de ADN del hospedero. Además, se midió la cantidad de ADN a lo largo del proceso de purificación establecido. También se comprobó que las muestras finales del anticuerpo CB Hep-1 purificado, a partir de plantas de tabaco transgénico, de todos los lotes de la campaña de establecimiento del proceso de purificación a gran escala, contenían menos de 100 pg de ADN del hospedero.