

CRIOPRESERVACIÓN DE LA CEPA *Corynebacterium diphtheriae* EMPLEADA EN LA PRODUCCIÓN DE TOXOIDE DIFTÉRICO

Pineda K*, Gutiérrez A., Villarreal H.

RESUMEN

La difteria es una enfermedad aguda infecciosa causada por la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. Esta cepa es empleada en la producción del Toxóide Diftérico, uno de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) de la vacuna DPT (Difteria, Pertussis y Tétanos). La Federación Mundial de Colecciones de Cultivo señala que, las cepas deben ser conservadas por al menos dos procedimientos diferentes; sin embargo, actualmente los lotes semilla y trabajo de la cepa *C. diphtheriae* se conservan solo en forma Liofilizada, por lo cual, surgió la necesidad de establecer la Criopreservación como un método alternativo. El método de criopreservación evaluado mostró resultados satisfactorios en cuanto a pureza, viabilidad y estabilidad de la cepa *C. diphtheriae*, por lo cual, consideramos que podemos incluirlo como parte de nuestro procedimientos de rutina para el mantenimiento de los lotes trabajo de la cepa.

INTRODUCCIÓN

La bacteria *Corynebacterium diphtheriae* toxigenica es la causante de la difteria, una enfermedad aguda infecciosa que afecta al ser humano (1). Esta cepa es empleada en la producción del Toxóide Diftérico, uno de los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) de la vacuna DPT (Difteria, Pertussis y Tétanos) utilizada en la prevención de dicha enfermedad y que es base de las vacunas polivalentes producidas en Espromed Bio.

La Federación Mundial de Colecciones de Cultivo señala que siempre que sea posible las cepas deben ser conservadas por al menos dos procedimientos diferentes (2,3); sin embargo, actualmente los lotes semilla y trabajo de la cepa *C. diphtheriae* se conservan en forma Liofilizada, por lo cual, surgió la necesidad de establecer la Congelación o Criopreservación como un método alternativo. Estos métodos de preservación de microorganismos han sido descritos como los mejores a largo plazo (2,3) ya que, garantizan un cultivo puro, sobreviven al menos el 70-80 % de las células y estas permanecen genéticamente estables(4).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y Preservación

Se realizó el cultivo en medio Loeffler de las ampollas liofilizadas de la cepa *C. diphtheriae* por 72 horas. Luego sembró en medio líquido Stainer por 24 horas (5). Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó a 6000 rpm por 20 minutos, la biomasa se resuspendió en leche descremada al 20% y se repartió en crioviales a razón de 1 ml por vial. Los viales se almacenaron a -70°C. Fig.1. Se realizaron dos lotes manteniendo las mismas condiciones y controles de proceso.

Evaluación de la Cepa

Se descongelaron viales de dos lotes de la cepa *C. diphtheriae*, al inicio, 1, 6 y 7 meses de almacenamiento. Se evaluó pureza y morfología por tinción de Gram, Viabilidad (UFC/ml) en agar Tripticasa de Soya. La estabilidad se determinó a través de la verificación de la producción de toxina, utilizando la prueba de inmunodifusión en medio Elek(6,7) para toxicidad in vitro. Se tomaron como criterio de aceptación los descritos en la tabla 1.

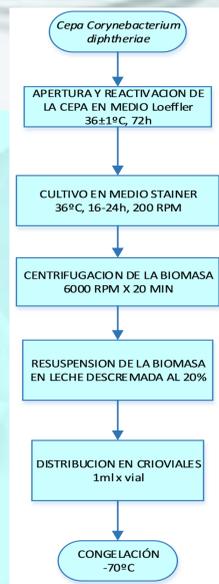


Fig.1. Flujograma del Proceso de Criopreservación

Prueba	Criterio de Aceptación
Morfología por Tinción de Gram	bacilos irregulares Gram + agrupados en forma de V (1)
Viabilidad en Tripticasa de Soya	≥ 10 ⁵ UFC/ ml (2)
Toxicidad in vitro por Inmunodifusión en Medio Elek	Presencia de halos de precipitación que se extienden fuera de la línea de crecimiento bacteriano formando un ángulo de alrededor de 45°, después de 24 horas de cultivo (7).

Tabla 1. Criterios de aceptación utilizados en la Evaluación de los Lotes de *C. diphtheriae* congelados a -70°C

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de las pruebas realizadas a los dos lotes de la cepa *C. diphtheriae* preservadas bajo congelación, pudimos observar que ambos presentaron el mismo comportamiento.

Luego de siete meses de haber sido congelados la viabilidad se ve disminuida en un orden, como se observa en la Figura 2; sin embargo, se mantienen por encima del nivel de aceptación, un comportamiento similar ha sido reportado por otros investigadores para cepas de *C. diphtheriae* concluyendo que la leche descremada es uno de los mejores medios de soporte para la preservación de estos microorganismos(2).

BIBLIOGRAFÍA

- Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock Microbiología de los Microorganismos. 8ª ed. Madrid: Prentice Hall; 1999. pp 935
- Iglesias, E, Plascencia, Y, Morales, T, Izquierdo L. Conservación por congelación de *Boedetella pertussis* y *Corynebacterium diphtheriae*, empleados en la producción de vacunas para uso humano., *VacchiMonitor*.2000;(3): 6-12.
- Hawsworth DL, Sastramilhardja I, Kokke R y Stevenson R. Guidelines for the Establishment and Operations of Collections of Cultures of Microorganisms. WFCC Standards Committee. UK: Simworth, Press, Richmond, Surrey; 1990.
- García M, Fernández F. La conservación de cepas Microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)., *Actualidad SEM*. 2000; (30): 12-16.
- Stainer, D., Corkill, J and Scholte, M. Preparation and properties of diphtheria toxoids in submerged culture.III.Development of a new semisynthetic médium. *Canadian Journal of Microbiology*. 1968; (14):1155-1160.
- Colmal, G., Weaver, E, and Efstratiou, A. Screening tests for pathogenic corynebacteria. *J Clin Pathol*. 1992; (45):46-48
- Engler, K., Glushkevich, T., Mazurova, I., George, R and Efstratiou, A. A Modified Elek for Detection of Toxigenic Corynebacteria in the Diagnostic Laboratory. *J. Clin. Microbiol*. 1997; (35):495-498

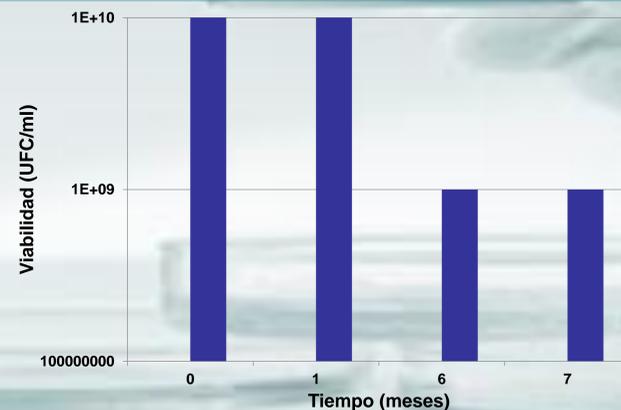


Fig.2 Comportamiento de la Viabilidad de la cepa *Corynebacterium diphtheriae* congelada a -70°C

De igual manera se pudo determinar, que bajo esta metodología se mantiene la morfología y pureza de los lotes, observándose las características típicas de la bacteria, bacilos irregulares Gram + agrupados en forma de V (1) (Fig.3).



Fig.3. Pureza de *Corynebacterium diphtheriae* por Tinción Gram

Por otra parte para verificar que la característica toxigénica de la cepa (estabilidad) no se pierde bajo esta metodología de preservación, realizamos la prueba en medio Elek. En la Figura 4, se observan las líneas de precipitación producto de la reacción entre la toxina producida por la bacteria y la anti-toxina presente en el medio de cultivo, demostrando así la estabilidad de la cepa después de siete meses de haber sido criopreservada. Se utilizó como control positivo una cepa de *C. diphtheriae* preservada por liofilización.

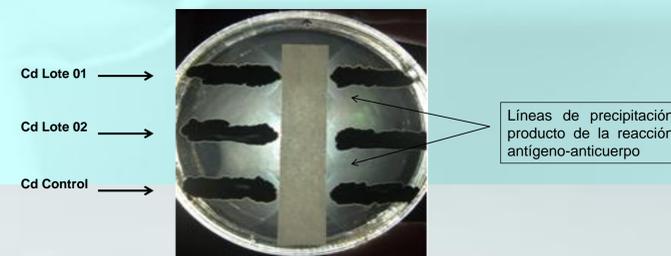


Fig.4. Estabilidad de los lotes congelados a -70°C de *Corynebacterium diphtheriae* (Cd) mediante la Prueba en Medio Elek para Toxicidad in Vitro.

CONCLUSIONES

El método de criopreservación mostro resultados satisfactorios en cuanto a pureza, viabilidad y estabilidad, por lo cual, consideramos que podemos incluirlo como parte de nuestro procedimientos de rutina para el mantenimiento de los lotes trabajo de la cepa *Corynebacterium diphtheriae* y de esta manera tener un método alternativo de preservación, como es recomendado. Es importante señalar, que continuaremos las evaluaciones de este método a largo plazo, con el fin de conocer el comportamiento de la cepa durante por lo menos 1 año.

BIOSIMILARES

Pineda K

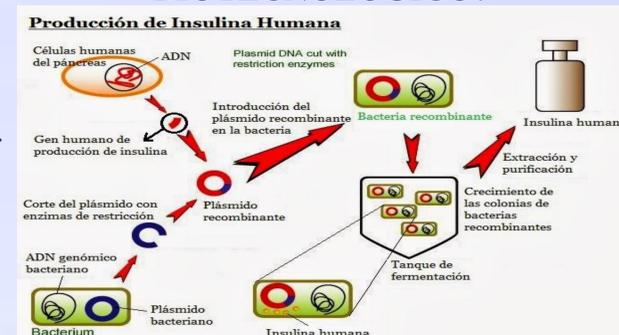
¿QUÉ ES UN MEDICAMENTO BIOTECNOLÓGICO?

Medicamento Biotecnológico
son medicamentos biológicos (sintetizados o derivados de una fuente biológica) obtenidos por tecnología de ADN recombinante o ingeniería genética. En estos se usa información genética y tecnologías especiales para que las células actúen como fábrica de sustancias para luego convertirlas en medicamentos.

¿QUÉ ES UN MEDICAMENTO BIOSIMILAR?

Medicamento Biosimilar
es un medicamento biotecnológico que se desarrolla para que sea similar a un medicamento biológico ya existente (el «medicamento de referencia») que ha perdido su patente.

¿CÓMO SE PRODUCE UN MEDICAMENTO BIOTECNOLÓGICO?



¿ QUIÉNES EVALUAN Y AUTORIZAN LA COMERCIALIZACION DE ESTOS MEDICAMENTOS?

AGENCIAS REGULATORIAS



En el 2005 dictó las primeras directrices relacionadas con las especialidades Farmacéuticas Biológicas Similares.

En el 2010 la OPS/OMS publicó la Guía de Recomendaciones para la evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares.

En el 2015 publicó la guía para Consideraciones científicas para demostrar biosimilaridad a un producto Referencia

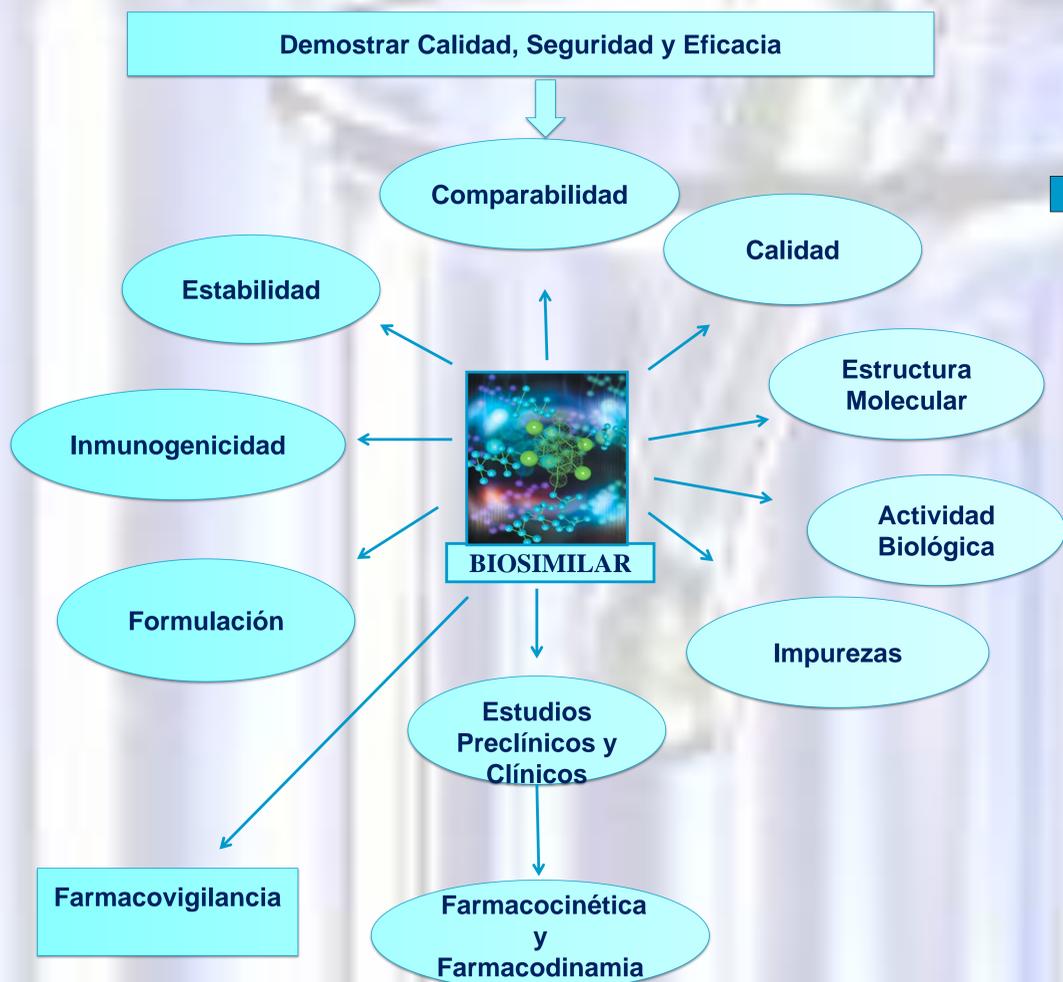


Actualmente existe un proyecto de Norma para el Registro Sanitario y Farmacovigilancia de Productos Bioterapéuticos Similares que hasta ahora no ha sido aprobada.

GUÍAS APLICABLES A LOS MEDICAMENTOS BIOSIMILARES

Entidad Regulatoria	Norma
EMA/CPMP/BWP/328/99	Desarrollo farmacéutico para productos biotecnológicos y biológicos
EMA/CPMP/BWP/3207/00	Directriz de comparabilidad de medicamentos que contienen proteínas obtenidas por biotecnología como principio activo- aspectos de calidad
EMA/CHMP/BWP/101695/06	Directriz de comparabilidad de medicamentos obtenidos por biotecnología tras un cambio en el proceso de fabricación –aspectos no clínicos y clínicos
ICH Q5C	Ensayos de estabilidad de productos biotecnológicos y biológicos, Dic. 95.
ICH Q6B	Ensayos y criterios de aceptación para productos biotecnológicos y biológicos, Marzo 99.
ICH S6	Evaluación de la seguridad preclínica de productos biotecnológicos y biológicos, Sept.97.

¿CUÁLES SON LOS LINEAMIENTOS PARA LA EVALUACIÓN DE UN BIOSIMILAR?



(OPS/OMS,2011)

¿ QUÉ BIOSIMILARES HAN SIDO APROBADOS PARA LA COMERCIALIZACIÓN?

PRODUCTO	COMPAÑÍA	BIOSIMILAR A	FECHA APROBACIÓN
Somatropina (Hormona de Crecimiento Humano) • Omnitrope • Valtropin	• Sandoz (Novartis) • BioPartners	• Genotropin (Pfizer) • Humatrope (Lilly)	04/ 2006 por EMEA
Epoetina alfa (Eritropoyetina) • Binocrit • Epoetin alfa hexal • Abseamed	• Sandoz • Hexal Biotech • Medice Arzneimittel	• Eprex/Erypo	08/ 2007 por EMEA
Epoetina zeta (Eritropoyetina) • Silapo • Retacrit	• Stada Arzneimittel • Hospira		12/ 2007 por EMEA
Filgrastim (Factor estimulante de colonias de granulocito) • Filgrastim Hexal • Zarxio • Nivestim	• Hexal • Sandoz • Hospira	• Neupogem/Amgen	02/ 2009 por EMEA 06/ 2010 por EMEA
Infectra (anticuerpo monoclonal) Remsima	• Celltrion	• Remicade/Infliximab	09/ 2013 por EMEA
Filgrastim (Factor estimulante de colonias de granulocito) • Zarxio	• Sandoz	• Neupogem	03/ 2015 por FDA Primer Biosimilar aprobado Estados Unidos

¿ CUÁLES SON LAS VENTAJAS DE PRODUCIR UN BIOSIMILAR?

La ventaja de producir biosimilares se basa en demostrar ante las autoridades regulatorias sus similitudes con el producto de referencia en cuanto a calidad, seguridad y eficacia. Esto puede dar como resultado:

- La reducción o abreviación de los datos preclínicos y clínicos a ser incluidos en el expediente del producto.
- La extrapolación a otras indicaciones que no hayan sido directamente puestas a prueba en los ensayos clínicos, presentando justificación científica apropiada.
- Disminución de costos frente al precio del producto de referencia.
- Mayor accesibilidad del medicamento al paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. OPS/OMS2011 Recomendaciones para la evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares (Junio 2011)
2. Pérez N, Cruz Y, Moya G, Costa L, Betancourt L, Besada V, Ferrero J, Lopéz J. Caracterización estructural del factor estimulador de colonia de los granulocitos, Hebevital. VaccinMonitor.2014; 23(1): 3-10

