



COMPARACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS INTERFERONES BETA 1-B DE LOS MEDICAMENTOS URIBETA® Y BETAFERON®

Norma A. Valdez-Cruz¹, Octavio Tonatiuh Ramírez¹, Jaime Uribe²

¹ Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Cuernavaca Mor. 62250, México.

Fax: 777-3138811; adri@ibt.unam.mx

² PROBIOMED S.A. de C.V., PLANTA TENANCINGO. Cruce de Carret. Acatzingo-Zumpahuacan SN, C.P. 52400, Tenancingo Edo. de México. Tel 0155-11662279.

Palabras clave: interferón β -1b, proteína recombinante, esclerosis múltiple, biogénicos

Introducción. El interferón β -1b humano es una citoquina de 166 aminoácidos (1) cuyo peso molecular (PM) teórico es de 20,011 Da, en su forma nativa. Su estructura secundaria presenta cinco hélices alfa (2). La proteína recombinante carece de la metionina inicial y presenta una sustitución en el residuo 17, de cisteína por serina. Actualmente se expresa en la bacteria *E. coli* y se produce por diversas compañías. Esta proteína modula funciones antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras y se utiliza en el tratamiento de esclerosis múltiple (3), aunque su mecanismo de acción aún no está bien definido (3). El objetivo de este trabajo fue determinar el grado de similitud de la estructura primaria y la secundaria, entre los productos Uribeta® (Probiomed) y Betaferon® (Roche).

Metodología. Cada medicamento fue analizado en gel SDS-PAGE. El principio activo (PA) de cada medicamento fue purificado por cromatografía de fase reversa por HPLC usando una columna C-4 analítica, Phenomenex Jupiter. El PM de los PA fue determinado por espectrometría de masas (EM), en un espectrómetro Finnigan LCQduo IT. La secuencia de aminoácidos de los PA se determinó por EM mediante la digestión en gel con tripsina (4). La estructura secundaria fue caracterizada por dicroísmo circular (DC). Los datos de DC fueron adquiridos en un espectro-polarímetro Jasco-710 en UV-lejano de 195 nm a 260 nm a 25 °C.

Resultados y discusión. Diferentes bio-medicamentos son producidos de forma recombinante por lo que se requiere comprobar su identidad y seguridad. En este trabajo se muestran estudios bioquímicos de identidad de los PA de los medicamentos Uribeta® y Betaferon®. Una vez que se purificaron los PA, se determinó su PM por EM, y su estructura secundaria se determinó por DC. La purificación de ambas proteínas mostró pureza similar. El PM teórico de la proteína recombinante en forma reducida es de 19,877.83 Da. El PM experimental del PA del Betaferon® fue de 19,879 Da (Fig.1a) y para el PA de Uribeta® de 19,878 Da (Fig.1b), con ± 1 Da de error experimental. También se determinó el 89% de la secuencia de aminoácidos de ambos PA, siendo 100% idéntica. Además examinamos la integridad estructural y conformacional de ambas proteínas por DC, revelando identidad. Las formas de los espectros fueron dominados por la fracción alfa helicoidal (Fig.2). El análisis del porcentaje de segmentos por hélice fueron altamente similares.

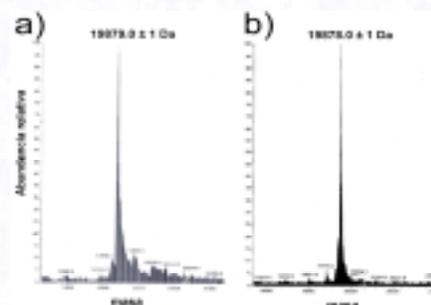


Figura 1. Determinación del PM por electrospray de los PA purificados de los medicamentos Betaferon® (a) y Uribeta® (b).

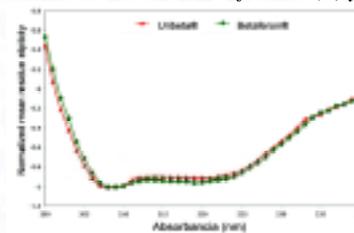


Figura 2. Espectro de dicroísmo circular de 0.1 mg/mL en agua MQ del PA de los medicamentos Uribeta® y Betaferon®.

Conclusiones. El análisis de espectrometría de masas muestra identidad del PM (fig. 1) de los PA de ambas formulaciones. La estructura secundaria es altamente similar en la región de 200 a 208 nm (fig. 2), indicando que no existen cambios estructurales aún después de la formulación. Por otro lado, la secuencia primaria y el punto isoeléctrico de los PA son idénticos (resultados no mostrados). De igual forma se ha comprobado que la formulación Uribeta® tiene actividad equivalente a la del interferon β -1b Betaferon®, mediante ensayos de protección viral.

Bibliografía

1. Mark DF, Lu SD, Creasy AA, Yamamoto R, Lin LS (1984) Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 5662-5666.
2. Karpusas M, Nolte M, Benton CB, Meier, W, Limpcomb WN, Goelz S. (1997) The crystal structure of human interferon β at 2.2 \AA resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 11813-11818.
3. Nakatsuji Y, and Osaka Neurological Research Consortium (2006) Beneficial effect of interferon-beta treatment in patients with multiple sclerosis is associated with transient increase in serum IL-6 level in response to interferon-beta injection. *Cytokine* 36: 69-74
4. Aebersold R, Goodlett DR (2001) Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 101: 269-295