

MÉTODOS MULTIVARIADOS PARA ENCAUZAR LA MEJORA DE LA CALIDAD DE UNA VACUNA CONTRA EL CÁNCER

Resumen / Abstract

Este trabajo se realizó con el objetivo de encontrar las relaciones entre las variables del proceso productivo y el patrón cromatográfico de una vacuna terapéutica contra el cáncer, característica esta indicativa de la reproducibilidad del producto. Primeramente se empleó el análisis de conglomerados (análisis de cluster) para agrupar lotes de producción y posteriormente se empleó el análisis discriminante para encontrar la explicación de estas agrupaciones según las variables del proceso. La determinación de estas relaciones, unida a la búsqueda en la literatura, permitió señalar un camino para mejorar el proceso, dirigiendo el control hacia las variables más influyentes en la variabilidad del producto.

The objective of this work was to find the relationship between process variables and the chromatographic pattern, used as a product reproducibility measurement, of a therapeutic vaccine. First, cluster analysis was employed to group together production batches and later, a discriminant analysis was employed to explain this cluster formation with the process variables. The evaluation of these relationships, together with the literature review, allowed pointing out a way to improve the process, leading the control toward the variables more influential in the product variability.

Palabras clave / Key words

Mejora de la calidad, análisis de conglomerados, análisis discriminante, vacuna contra el cáncer

Quality improvement, cluster analysis, discriminant analysis, cancer vaccine

Lisel Viña Rodríguez, Licenciada en Biología, Máster en Bioquímica de las Proteínas, Departamento de Control de Calidad, Centro de Inmunología Molecular, Ciudad de La Habana, Cuba
e-mail:lisel@cim.sld.cu

Aida G. Rodríguez Hernández, Ingeniera Industrial, Doctora en Ciencias Técnicas, Profesora Titular, Facultad de Ingeniería Industrial, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, Cujae, Ciudad de La Habana, Cuba
e-mail:aida@ind.cujae.edu.cu

Recibido: Mayo del 2007
Aprobado: Julio del 2007

INTRODUCCIÓN

Como parte de la estrategia del desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer, en el Centro de Inmunología Molecular se encuentra en etapa de investigación-desarrollo una vacuna terapéutica obtenida mediante la reacción química de dos proteínas. Hasta el momento, esta vacuna ha sido evaluada en ensayos clínicos de fases I, II y III en Cuba y en varios países desarrollados, y estos ensayos clínicos han brindado evidencias alentadoras sobre su eficacia. La posibilidad de que esta vacuna transite hacia la etapa de registro farmacéutico depende de la posibilidad de establecer un proceso productivo reproducible. La obtención del registro de esta vacuna permitiría a Cuba contar con un producto biotecnológico propio, único en el mundo, para el uso en la terapia de una de las enfermedades de mayor prevalencia en el país y en los países desarrollados.

El proceso de producción de esta vacuna, consiste básicamente en la conjugación química de dos proteínas. Según la literatura, la principal desventaja del tipo de reacción química empleada en esta producción, es la posibilidad de que se cree una gran diversidad de especies moleculares,

obteniéndose un producto de elevada heterogeneidad. Por otra parte, hay autores que consideran que las peculiaridades de los reaccionantes (su elevada reactividad, los diferentes mecanismos de reacción dependientes del pH, de la edad de la solución de los reactivos, etc.), conducen a que la reacción de conjugación rinda productos diferentes cada vez que se realice. Sin embargo, un producto biotecnológico inyectable destinado al uso en humanos, debe cumplir requerimientos muy estrictos de calidad,¹ entre los que se encuentra la reproducibilidad lote a lote de sus características. Para evaluar esta propiedad en esta vacuna se requiere el empleo de métodos analíticos apropiados.

Los métodos analíticos para el control de la calidad deben ser sencillos, reproducibles y no muy costosos, para permitir la evaluación rutinaria de un gran número de lotes de producción. La exclusión molecular (EM) por HPLC (de las siglas en inglés de High Performance Liquid Chromatography) es una técnica analítica de alta reproducibilidad, por lo que es muy útil para la evaluación de la reproducibilidad del producto. La mejora del proceso productivo de esta vacuna debe estar dirigida a lograr un control estrecho de las variables que más inciden en la variabilidad del producto. Por tanto, se impone identificar cuáles son estas variables.

Luego de evaluar las consideraciones anteriores, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar el proceso productivo desde el punto de vista teórico, buscando en la literatura cuáles son los factores que se han descrito como de mayor influencia en la baja reproducibilidad de este proceso.

2. Estudiar el proceso específico de la producción de esta vacuna en el CIM y cuáles son los controles que se aplican.

3. Agrupar, según su patrón cromatográfico, lotes consecutivamente producidos.

4. Investigar estadísticamente la relación entre diferentes parámetros del proceso productivo y el perfil cromatográfico, para determinar cuáles son las variables más incidentes en la variabilidad del proceso.

MÉTODOS

Análisis de la literatura sobre variables que afectan la conjugación química de las proteínas

Fueron analizados artículos de la literatura que tratarán el tema de la caracterización de conjugados químicos proteína-proteína.^{2,3} La mayoría de los trabajos publicados sobre el control de la calidad de conjugados están referidos a conjugados proteína-polisacárido. Estos trabajos no son de utilidad para el estudio de los conjugados proteína-proteína, pues precisamente, la mayor dificultad que se encuentra en la caracterización de estos conjugados, es que todos los componentes del producto final son de la misma naturaleza química y por tanto sus propiedades son muy similares lo que obstaculiza la identificación de cada uno en el producto final. Recientemente se han utilizado el análisis de aminoácidos y la espectrometría de masas,^{4,5} métodos muy costosos y engorrosos que no los hacen útiles para el control rutinario de la calidad. Por lo tanto, son difíciles de encontrar artículos que traten este tema y que a la vez empleen métodos analíticos

sencillos, además de que casi todos datan de fechas lejanas (década de los 70)⁶⁻⁹. No obstante, se pudieron encontrar artículos que trataran sobre la mayor influencia en la reproducibilidad de las reacciones químicas empleadas en el proceso.

Estudio del proceso productivo de la vacuna según la documentación de aseguramiento de la calidad

Se estudiaron expedientes de lotes donde se recogía la información sobre la producción de 39 lotes a granel de la vacuna. De ellos se extrajo la información sobre las variables que se controlan durante el proceso. También se consultaron los procedimientos normalizados de operación según los cuales se producen los lotes de la vacuna.

Exclusión molecular por HPLC

Todas las corridas cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente en un equipo HPLC. El análisis de los cromatogramas se realizó mediante el programa Class VP Chromatography Laboratory Automated Software System (Versión 4.2, Shimadzu). Para la obtención de los cromatogramas se utilizaron los parámetros de realización y evaluación¹⁰ expuestos en la tabla 1.

TABLA 1	
Umbral (mínima altura de pico detectada): 500	Velocidad de fase móvil: 1 mL/min
Ancho de pico mínimo detectado: 1	Volumen de inyección: 100 μ L
Sensibilidad de hombro: 6	Longitud de onda de la detección : 226 nm
	Columna: TSK 3000 SWxl

Análisis de conglomerados

Los lotes de vacunas fueron agrupados según las características de sus perfiles cromatográficos. Se analizaron por HPLC 39 lotes a granel de la vacuna. Los cromatogramas se integraron y se calculó el porcentaje del área correspondiente a las especies conjugadas.

Para esto se utilizó la técnica de análisis de conglomerados por observaciones¹¹. De cada lote se tomaron solo los picos más característicos, es decir, los de mayor porcentaje de área y aquellos que aparecen en todos los cromatogramas, incluyendo además alguno que de forma muy significativa caracterizara a un lote. Para hacer esta selección se tuvo en cuenta el tiempo de retención como una medida de comparación entre cromatogramas que permitiera determinar si dos picos pertenecientes a dos cromatogramas diferentes se trataban de picos homólogos. De los picos seleccionados se tomó el dato de porcentaje de área que representa ese pico con respecto al área total del cromatograma (% A), y su altura relativa con respecto al pico mayor (H %), resultando un total de 12 variables. Los lotes se clasificaron según el porcentaje de área y altura relativa de los picos (% A y H %) mediante la técnica de análisis de conglomerados por observaciones (*cluster observations*), utilizando distan-

cias euclidianas, sin que fuera necesario estandarizar porque todas las variables están medidas en la misma escala, y enlazamiento por centroides. Ese procedimiento usa un algoritmo jerárquico de aglomeración de observaciones mediante el cual todos los lotes quedan clasificados dentro de diferentes subgrupos que a su vez quedan agrupados dentro de conjuntos mayores, y así sucesivamente hasta que todos están agrupados en una clase única. Ese grupo final no tiene utilidad con fines clasificatorios, por lo cual en una segunda corrida se detuvo el proceso de clasificación según los grados de similitud que se fueron obteniendo dentro de cada grupo formado y según la lógica del resultado obtenido.

Análisis discriminante

Para investigar cómo los grupos de lotes formados mediante el análisis anterior se relacionan con las variables del proceso productivo, se usó el análisis discriminante lineal y los resultados fueron evaluados mediante una técnica de validación cruzada que repite el cálculo de la función discriminante tantas veces como individuos a agrupar haya, eliminando del procedimiento de estimación el dato cuyo grupo se quiere determinar.

RESULTADOS

Análisis de la literatura sobre variables que afectan la conjugación química de las proteínas

Según la literatura consultada el pH de la reacción, el tipo de reactivo enlazador,¹² la concentración de los reaccionantes, la reacción molar entre el reactivo enlazador y las proteínas reaccionantes, la edad del reactivo enlazador y la cantidad de pasos en que ocurre la reacción son los parámetros más influyentes.¹³

Estudio del proceso productivo de la vacuna según la documentación de aseguramiento de la calidad

Según la documentación de Aseguramiento de la Calidad del CIM el proceso productivo de esta vacuna consiste en la conjugación química de dos proteínas (proteína-1 como antígeno, proteína-2 como portadora) mediante la reacción de ambas moléculas con un reactivo enlazador homobifuncional. La reacción ocurre en un solo paso, pues ambas proteínas se mezclan con anterioridad a la reacción con el enlazador. La reacción transcurre a temperatura ambiente durante una hora, luego de lo cual, y sin que se añada ningún reactivo para detener la reacción, el exceso de enlazador es eliminado por diálisis. No se realiza ningún otro paso de purificación. Se compararon los parámetros controlados durante el proceso y sus características y se encontró que no se controlaban el pH, ni el lote de reactivo enlazador por lo tanto no se podía conocer su edad. Que la reacción ocurra en un solo paso y empleando un reactivo homobifuncional es la causa de la elevada heterogeneidad del producto y por tanto contribuye a disminuir la reproducibilidad.

Análisis de conglomerados

Siguiendo el método antes expuesto, cuando los lotes se encuentran agrupados en ocho conjuntos, la similitud dentro de grupos es del 81,24 %. Al fusionarse dos de los ocho grupos anteriores, la similitud aumenta hasta 84,46 %. Sin embargo, se decidió detener el proceso de clasificación luego de un paso de fusión adicional, al quedar definidos seis grupos, a pesar de que

disminuyó ligeramente el grado de similitud (83,04 %), con respecto al agrupamiento en siete conjuntos, debido a que esta disminución es pequeña y no son evidentes las diferencias del último grupo fusionado que justifiquen la formación de un grupo adicional. Un nuevo paso adicional de fusión en solo 5 grupos produce un decaimiento brusco de la similitud hasta un 78,92 %. En la figura 1 se observan los dendogramas que representan la clasificación de los lotes en los grupos formados.

Al analizar el dendograma se observa que según el % A y la

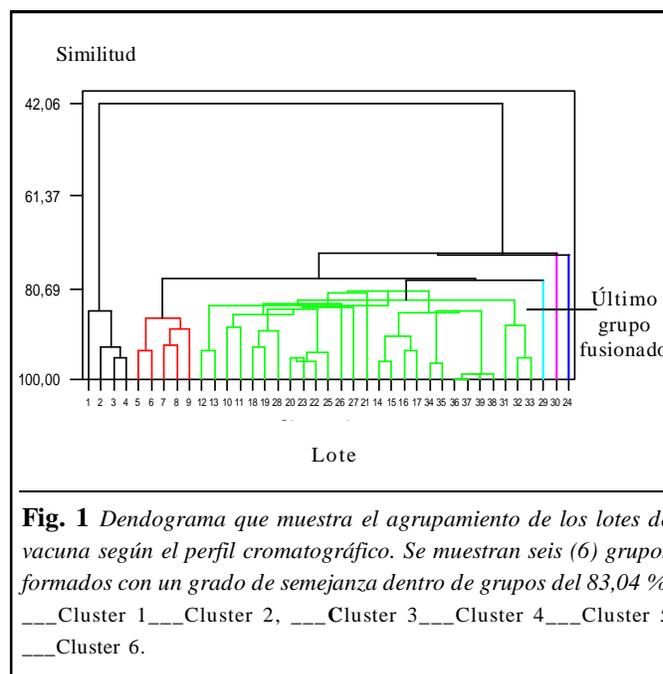


Fig. 1 Dendograma que muestra el agrupamiento de los lotes de vacuna según el perfil cromatográfico. Se muestran seis (6) grupos formados con un grado de semejanza dentro de grupos del 83,04 %.

--- Cluster 1 --- Cluster 2, --- Cluster 3 --- Cluster 4 --- Cluster 5
--- Cluster 6.

H% de los picos característicos de la vacuna, los lotes estudiados se agruparon en tres perfiles, y tres lotes no se correspondieron con ningún perfil, pudiéndose considerar como lotes anómalos. Si se observa la fecha de los lotes y se contrasta con los grupos y subgrupos formados, se comprueba que la similitud creció notablemente en el tiempo. Los lotes anómalos aparecían de forma esporádica en el tiempo.

Determinación de los parámetros del proceso productivo que más influyen en el perfil cromatográfico

Luego de establecer la clasificación anterior, se estudió si existía relación entre las características del perfil cromatográfico y las variaciones de los parámetros del proceso. Este estudio se realizó mediante la técnica de análisis discriminante.

En el estudio solo se tuvieron en cuenta los grupos de perfiles 1, 2 y 3, debido a que el método requiere más de un caso por clasificación y los grupos de lotes anómalos (4, 5 y 6) solo contienen un lote cada uno. Como respuesta se tomó el número del grupo y como posibles predictores se tomaron los siguientes parámetros del proceso productivo:

- Datos de la proteína -1: Concentración, pureza, pH, edad del lote.
- Datos de la proteína 2: Concentración, pureza, edad del lote

• Datos del proceso de conjugación: pH del tampón de conjugación, volúmenes de proteína -1 y proteína 2

Entre todas las variables analizadas los mejores predictores resultaron ser la edad, la pureza y el volumen utilizado de la proteína -1 (tabla 2).

La combinación de estas variables fue capaz de explicar hasta un 91,2% de las clasificaciones obtenidas en el análisis de conglomerados.

Clasificado dentro del grupo	Grupo verdadero		
	1	2	3
1	3	0	0
2	1	5	2
3	0	0	23
N Total	4	5	25
N Correcta	3	5	23
Proporción	0,750	1,00 0	0,92

DISCUSIÓN

Al hacer el análisis de los factores que determinan las características del producto obtenido luego del proceso de conjugación química de dos proteínas, según la literatura,¹⁶ se aprecia que el procedimiento de conjugación de esta vacuna, combina algunos de los aspectos que más contribuyen a una alta heterogeneidad del producto y a una baja reproducibilidad del resultado del proceso. Estos aspectos son:

1. El empleo de un reactivo homobifuncional.
2. La ejecución de la reacción de conjugación en un solo paso.^{14,15}
3. La carencia de un paso para detener la reacción y bloquear los sitios reactivos remanentes.
4. La no purificación de los conjugados heteroligoméricos.
5. La falta de control del envejecimiento de la solución de reactivo enlazador.

Sin embargo, otros factores como el pH en el que ocurre la reacción y la baja disponibilidad de Lys en la proteína -1, ayudan a contrarrestar el efecto que producen los aspectos anteriores. El pH resultante de la mezcla de las proteínas 1 y 2 y el tampón de conjugación debe encontrarse alrededor de siete o por debajo (este pH no se medía hasta el momento del estudio, luego se

confirmo que oscila alrededor de 6-6,5) y según la literatura consultada esto limita la extensión de la reacción, es decir, que no intervienen todos los potenciales sitios de reacción. Esto disminuye las combinaciones posibles de conjugación y, por tanto, disminuye también la heterogeneidad del producto y aumenta la reproducibilidad del proceso.

Para obtener un rendimiento adecuado sin que se produzcan polimerizaciones extensivas, se recomienda que el reactivo enlazador se añada en un exceso molar de 10 veces con respecto a los grupos reactivos a modificar (Lys más aminos terminales).¹⁶ En la reacción de conjugación tratada, la concentración molar de las Lys aportadas por la proteína -1 es de 425 μ M y por la proteína 2, aún considerando solo las Lys más expuestas al solvente y el extremo N-terminal, la concentración molar alcanza los 158 μ M, al sumarlas se obtiene una concentración de Lys de 583 μ M. Dado que el reactivo enlazador está a una concentración de 5 mM, solo se encuentra en un exceso de 8.7 veces con respecto a los grupos a modificar. Por lo tanto, esta es otra condición que contribuye a disminuir la posibilidad de producir polimerizaciones extensivas.

A juzgar por los resultados obtenidos de la evaluación de los lotes por HPLC los factores que contribuyen a la homogeneidad del producto y a la reproducibilidad del proceso productivo, tuvieron mayor influencia que los que producen el efecto contrario. Y a pesar de la extendida creencia de que la conjugación de proteínas mediante el reactivo enlazador utilizado es necesariamente un proceso poco reproducible,^{5,16} el resultado de este trabajo indica que la reproducibilidad de este proceso es posible.

Para tratar de encontrar cuáles son las fuentes de variabilidad del proceso productivo, se investigó cómo los grupos de lotes formados mediante el análisis de conglomerados de observaciones, se relacionan con las variables del proceso productivo y para esto se empleó el análisis discriminante lineal.

Entre todas las variables analizadas relativas a las materias primas empleadas y al proceso productivo, los mejores predictores de la clasificación de los lotes en conglomerados, resultaron ser la edad, la pureza y el volumen utilizado de la proteína -1 (tabla 2).

Ya con anterioridad, se analizó cómo influye el pH en el resultado de la reacción de conjugación y cómo este pH era el resultado de la mezcla de varios tampones. Además del pH de cada tampón, también influye en el pH final alcanzado por la mezcla, el volumen que se adicione de cada uno de ellos. Mientras mayor sea el volumen que se adicione de un tampón particular, mayor influencia tendrá en el pH final. Por esto, no es de extrañar que el volumen de proteína -1 añadido, tenga un valor predictor del agrupamiento de los lotes en cada conglomerado.

La pureza y la edad del lote de proteína -1 también resultaron ser buenos predictores de la clasificación de los lotes según el perfil cromatográfico. Cuando se analizaron los valores de pureza de estos lotes se observó que, de manera general, los lotes de vacuna han sido producidos con una proteína-1 de pureza cada vez mayor (hasta un 97,2 %). Esto pudiera haber contribuido a la

disminución de la variabilidad que se ha estado produciendo. Este resultado de pureza parece haber sido modulado por la estabilidad de la molécula en el tiempo, pues aunque varios lotes de vacuna se producen con un mismo lote de proteína -1, no se producen al mismo tiempo, por lo tanto, la pureza de la proteína -1 no debe haber sido la misma para cada uno de ellos (los datos de estabilidad de la proteína -1, muestran lotes que disminuyeron hasta en un 5,6 % de pureza al cabo de los 12 meses). Sería interesante estudiar a qué se deben los diferentes grados de impurezas (agregados, productos de degradación, contaminantes, y otros) y cómo estos influyen en las especies moleculares obtenidas en la conjugación con la proteína-2.

OPORTUNIDADES PARA INCREMENTAR LA REPRODUCIBILIDAD DEL PROCESO PRODUCTIVO DE LA VACUNA

Los trabajos más ampliamente difundidos sobre caracterización de conjugados químicos, se han realizado utilizando el modelo de conjugación enzima-anticuerpo, moléculas mucho mayores y, por tanto, con mayor disponibilidad de Lys, que las dos moléculas empleadas en la obtención de la vacuna proteína-1/proteína-2. El mayor éxito del uso del reactivo enlazador empleado en este tipo de reacciones ha sido reconocido como la conjugación con proteínas que tienen baja disponibilidad de Lys.^{16,17}

A pesar de que la reproducibilidad del proceso analizado resultó mayor de lo esperado, el análisis de los factores que influyen en su variabilidad indica, que aún se pueden alcanzar mejores resultados si se introducen algunos cambios y se implementan algunos controles en el proceso productivo de la proteína-2.

El pH de la reacción podría ser mejor controlado si todos los componentes de la mezcla de reacción se adicionasen en el mismo tampón. Es decir, que la proteína -1 y/o la proteína-2 deberían sufrir un cambio de tampón antes de ser añadidos a la reacción.

La reacción debe ser detenida con algún reactivo que bloquee los sitios reactivos remanentes, como el Tris o el aminoácido Lys.

Los dos aspectos anteriores solo disminuyen la variabilidad de las condiciones ya establecidas, sin embargo, también se pudieran realizar otras modificaciones, que aunque implicarían quizás la realización de nuevos ensayos clínicos, desde el punto de vista regulatorio y económico serían muy adecuados.

Por ejemplo, si se realizase la conjugación en dos pasos, muy probablemente la composición del conjugado proteína-1/proteína-2 presente en la vacuna no cambiaría mucho, pues el patrón de los conjugados homoligoméricos de la proteína-2 es muy similar al de los conjugados heteroligoméricos de la vacuna. Con este procedimiento se eliminaría la posibilidad de la polimerización de la proteína -1, lo que contribuiría a la eficiencia del proceso y a la disminución de los costos. También brindaría un producto menos complejo, al que sería más fácil realizar los controles de calidad y el paciente recibiría un producto más homogéneo. En el caso de que el procedimiento en dos pasos alterase mucho la

composición de los conjugados heteroligoméricos de la vacuna, lo cual podría tener implicaciones en su eficacia, al menos podría agregarse un paso de purificación adicional que eliminase los conjugados homoligoméricos de la proteína -1.

CONCLUSIONES

1. La mayor variabilidad del proceso productivo estudiado ocurrió durante el primer año, correspondiente con la fase de estandarización del proceso, y las principales variaciones entre lotes se encuentran en los picos correspondientes a los conjugados heteroligoméricos.

2. Es posible establecer un proceso productivo reproducible basado en la conjugación química de la proteína-1 y la proteína-2 mediante el agente enlazador utilizado.

3. La edad, la pureza y el volumen de la proteína-1 utilizada como materia prima son determinantes en la eficiencia de conjugación del proceso. 

RECOMENDACIONES

1. Mantener bajo control las variables que determinan la eficiencia de la conjugación, es decir, la edad, la pureza y el volumen de la proteína -1 utilizado como materia prima. Podrían requerir especificaciones con un rango de aceptación más estrecho.

2. Controlar el pH de la reacción de conjugación mediante:

a) El cambio de tampón de la proteína -1 y/o la proteína-2 antes de ser añadidas a la reacción.

b) El control del pH resultante con límites de aceptación estrechos.

3. Identificar y controlar otras variables que pudieran estar influyendo en las variaciones entre lotes, como el envejecimiento de la solución del reactivo enlazador.

4. Introducir modificaciones al proceso productivo luego de haber demostrado su utilidad en el aumento de la reproducibilidad sin que se produzcan afectaciones de la eficacia de la vacuna. Estas modificaciones pueden ser:

a) La introducción de un paso para detener la reacción de conjugación

b) La conjugación en dos pasos o la purificación de los conjugados homoligoméricos de proteína -1.

REFERENCIAS

1. ICH. Guideline Specifications: Test procedure and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. Q6B. http://www.ich.org/UrlGrpServer.jserv?@_ID=363&@_TEMPLATE=272#Q6B. ICH. 1999.
2. TACAL, O. E. I. OZER: "A Comparison between SDS-PAGE and Size Exclusion Chromatography as Analytical Methods for Determining Product Composition in Protein Conjugation Reactions", *J Biochem Biophys Method*, 52:161-168. 2002.

- 3 **JINNO, H. et al.:** "Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Cytotoxic Effect by an EGF-Ribonuclease Conjugate on Human Cancer cell Lines,-A Trial For Less Immunogenic Chimeric Toxin-", *Cancer Chemother Pharmacol*, 38:303-308,1996.
4. *Kratos Analytical. Analysis of Protein Conjugates*, Reporte No.A532-0793GSD, 2000.
5. **WILLEM, J. B. et al.:** "Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry for Protein Structural Modeling", *J Mol Bio*, 331:303-313,2003.
6. **TSANG, V. C. W.; K. HANCOCK AND S. MADDISON:** "Quantitative Capacities of Glutaraldehyde and Sodium m-Periodate Coupled Peroxidase-Anti-human IgG conjugates in Enzime-Linked Immnuoassays", *J. Immunol Method*, 70:91-100, 1984.
7. **BOORSMA, D. M Y J. G. STREEFKERK:** "Peroxidase-Conjugate Chromatography Isolation of Conjugates Prepared with Glutaraldehyde or Periodate Using Polyacrylamide-Agarose Gel", *J Histochem Cytochem*, 24(3):481-486,1976.
8. ———.: "Periodate or Glutaraldehyde for Preparing Peroxidase Conjugates?" *J Immunol Method*, 30:245-255,1979.
9. **AVRAMEAS, S. AND T. TERNYNCK:** "Peroxidase Labeled Antibody and Fab Conjugates with Enhanced Intracellular Penetration", *Immunochemistry*, 8:1175-1179, 1971.
10. *Class-VP Chromatography Laboratory Automated Software System* (Programa de computadora), Versión 4.2 Shimadzu, 1996.
11. **HAIR, JOSEPH et al.:** *Análisis Multivariado*, 5ta. ed., Prentice Hall, Iberia, Madrid, España, 1999.
12. **VEGA, J. et al.:** "Targeting Doxorubicin to Epidermal Growth Factor Receptors by Site Specific Conjugation of C225 to Poly (L-glutamic acid) through a Polyethylene Glycol Spacer", *Pharmaceutical Research*, 20(5):826-832, 2003.
13. **LÖSTER, K. AND D. JOSIÆ:** "Analysis of Protein Aggregates by Combination of Cross-Linking Reactions and Chromatographic Separations", *J Chromatogr B.*, (699):439-461, 1997.
14. **BOORSMA, D. MAND G. L. KALSBECK:** "A Comparative Study of Horseradish Peroxidase Conjugates Prepared with a One Step and a Two Step Method", *J Histochem Cytochem*, 23(3):200-207, 1975.
15. **NYGREN, H. Y A. A. HANSSON:** "Conjugation of Horseradish Peroxidase to Staphilococcal Protein A with Benzoquinone, Glutaraldehyde, or Periodate as Cross-Linking Reagents", *J. Histochem Cytochem*, 26(2):266-270, 1981.
16. **HERMANSON, G.T.:** *Bioconjugate Techniques*, first edition, Acad Press, Rockford, Illinois, 1996.
17. **NYGREN H.; A. HANSSON AND S. LANGE:** "Studies on the Conjugation of Horseradish Peroxidase to Immunoglobulin G Via Glutaraldehyde", *Med Biol*, 57:187-191,1979.

***Disponemos de un departamento informatizado,
dotado con tecnologías que nos permiten realizar
todo el proceso de edición de revistas científicas
así como de otros materiales.***

Visítenos!!!

