

Incremento en la capacidad de procesamiento para la producción de N-Glicolil GM₃

Julia M. Gutiérrez-Anillo,^{1,2*} José A. González-Lavaut,¹ Layda González-Villanueva,¹ Yanelis Navarrete-Pita,¹ Jesús Cancio-Méndez,¹ Nelson García-González¹

¹ Instituto Finlay de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa, La Habana, Cuba.

² Facultad de Ingeniería Química, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echevarría. Boyeros, La Habana, Cuba.

email: jgutierrez@finlay.edu.cu

El N-Glicolil GM₃ es un monosialilgangliósido utilizado como antígeno y adyuvante en preparaciones vacunales para uso terapéutico contra cáncer de mama, pulmón y melanoma. La obtención de este gangliósido a partir de eritrocitos equinos consta de dos etapas: extracción y purificación, en las que se trabaja para incrementar los volúmenes de procesamiento. La evaluación del incremento en la capacidad de procesamiento, su influencia en el rendimiento y la evaluación del comportamiento del proceso de purificación utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución Preparativa constituyeron objetivos del presente trabajo. Se compararon los resultados obtenidos entre el procedimiento aprobado y la propuesta de cambio. Se controló el proceso evaluando las características organolépticas y el peso del extracto liofilizado, así como la detección y contenido de N-Glicolil GM₃ por Cromatografía de Placa Delgada cualitativa y análisis colorimétrico de ácido siálico; se utilizó el Software STATGRAPHICS para evaluar la variabilidad del proceso. El incremento del volumen de procesamiento respecto al procedimiento establecido mantuvo el rendimiento en la etapa de extracción y aumentó ligeramente el de la purificación, reduciéndose el tiempo de procesamiento con la utilización de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución Preparativa. El aumento de la capacidad de procesamiento mantuvo el rendimiento global del proceso en 0,006 g de N-Glicolil GM₃/g de Eritrocitos y el producto obtenido mediante el procedimiento propuesto cumplió las especificaciones de calidad establecidas para el mismo; permitiendo un aumento en la productividad de 30%, menor consumo de energía y desgaste de los recursos humanos, siendo factible implementar el cambio.

Palabras clave: gangliósidos, vacunas, cáncer.

Introducción

Los gangliósidos son constituyentes normales de la membrana plasmática de las células de vertebrados, involucrados en la regulación de importantes funciones celulares como el crecimiento y desarrollo embrionario, transducción de señales, receptores para virus y toxinas bacteriales, tumorigénesis y metástasis siendo uno de los sistemas antigénicos más estudiados y candidatos atractivos para la inmunoterapia del cáncer (1-7).

N-Glicolil GM₃ (NGcGM₃) es un monosialilgangliósido utilizado como antígeno y adyuvante en diversas preparaciones vacunales para uso terapéutico contra el cáncer de mama, pulmón y melanoma, las cuales producen un incremento significativo en la supervivencia y una reducción en el crecimiento tumoral, sin generar toxicidad aparente o mortalidad (2, 8-13).

La importancia socioeconómica que reviste la vacuna terapéutica NGcGM₃/VSSP para el país, demanda una

capacidad de producción superior de este gangliósido. La obtención de NGcGM₃ a partir de eritrocitos equinos se realiza mediante dos etapas fundamentales: extracción (sólido-líquido y líquido-líquido) y varios procesos de purificación (diálisis, liofilización, cromatografía de adsorción e intercambio iónico). Los métodos descritos por diferentes autores para la extracción y purificación de gangliósidos a partir de fuentes naturales coinciden, generalmente en cuanto a las operaciones empleadas y difieren en los disolventes, su polaridad y la proporción en que son utilizados, así como las relaciones entre la masa de material a extraer y el volumen de disolvente, la forma de adición de los mismos y el número de etapas de extracción (14-16).

La evaluación del incremento en la capacidad de procesamiento en las etapas de extracción y purificación, su influencia en el rendimiento y la evaluación del comportamiento del proceso de purificación utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

* Ingeniera Química, Especialista en Investigación, Innovación y Desarrollo.

Preparativa KNAUER constituyen objetivos del presente trabajo.

Materiales y Métodos

Se evaluaron 25 lotes de producción de NGcGM₃ en los cuales se utilizaron como materia prima eritrocitos equinos suministrados por Internegocios S.A., Argentina. Se realizaron 17 lotes mediante el procedimiento que permite procesar 1,5 kg de eritrocitos y ocho lotes se desarrollaron procesando 3 kg de eritrocitos que constituye el cambio propuesto. La etapa extractiva se realizó mediante una extracción sólido-líquido de eritrocitos equinos en dos etapas, utilizando una mezcla cloroformo: metanol 1:1 (v/v) en la primera extracción y 2:1 (v/v) en la segunda extracción, durante 24 a 36 h a temperatura ambiente controlada y agitación de 300 a 500 rpm. La suspensión resultante fue filtrada al vacío y concentrada por rotoevaporación hasta sequedad. Posteriormente se realizó un proceso de eliminación de impurezas por hidrólisis básica con disolución de hidróxido de sodio/metanol 0,2 mol/L y extracción líquido-líquido con n-hexano; la fase metanólica se concentró hasta sequedad, se sometió a un proceso de diálisis durante 72 horas a 4°C. El producto se distribuyó en matraces de fondo redondo a razón de 100 mL, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó en un liofilizador de mesa CHRIST ALPHA 1-4 durante 24 a 48 h, con un vacío de 0,1 a 0,2 mbar, obteniendo un polvo seco de color pardo o carmelita.

En la etapa de purificación el extracto liofilizado se purificó por cromatografía de adsorción con un equipo de Cromatografía Líquida de Presión Media (MPLC), empleando cloroformo: metanol: amoniaco/agua (65:25:4; v/v) como fase móvil y sílica gel 60 como fase estacionaria.

Se colectaron las fracciones en que se detectó presencia de NGcGM₃ por Cromatografía de Placa Delgada (CCD) cualitativa y se concentraron por rotoevaporación hasta sequedad. Se realizó la purificación por intercambio iónico en DEAE Sephadex A-25 utilizando como fase móvil cloroformo: metanol: agua (30:60:8; v/v) y acetato de sodio/metanol 0,2 mol/L, evaluando el proceso por CCD. Las fracciones que contienen el gangliósido se concentraron por rotoevaporación hasta sequedad y se dializaron por 72 h a 4 °C. Se estableció el contenido de NGcGM₃ en el producto final dializado de acuerdo a la determinación de ácido siálico por colorimetría, se dosificó en matraces la cantidad requerida para garantizar 500 mg de NGcGM₃ por envase y se liofilizó durante 24 a 36 h en iguales condiciones de operación quedando

el producto como un polvo de apariencia esponjosa o granulada de color blanco a crema.

Paralelamente se evaluó la introducción de un HPLC Preparativo KNAUER en el proceso de purificación por adsorción. Se realizó un proceso isocrático con un flujo de 30 mL/min, utilizando un detector UV a una longitud de onda de 242 nm y el programa ChromGate para la adquisición de datos.

Se compararon los resultados para la propuesta de cambio evaluada entre los dos procesos cromatográficos (MPLC y HPLC). Se controló cualitativamente el comportamiento del proceso en la etapa extractiva, evaluando las características organolépticas y el peso del extracto liofilizado, estableciéndose el rendimiento de la etapa expresado como Masa de Extracto Liofilizado obtenido/ Masa de Eritrocitos consumidos. El desempeño del proceso durante la etapa de purificación se evaluó mediante CCD cualitativo y determinación del contenido de NGcGM₃ por el método Svennerholm (17), al concluir la purificación por adsorción y antes de liofilizar el producto final dializado para determinar los rendimientos de la etapa de purificación y el global del proceso expresados como Masa de NGcGM₃ obtenido/ Masa de Extracto Liofilizado purificado y Masa de NGcGM₃ obtenido/ Masa de Eritrocitos consumidos, respectivamente.

De manera gráfica se muestra el comportamiento del proceso mediante gráficos de control para los datos obtenidos de rendimiento de la etapa de extracción, rendimiento de la etapa de purificación y rendimiento global del proceso para ambos procedimientos; utilizando el Software STATGRAPHICS Plus Versión 5.1 para la evaluación de la variabilidad del proceso.

Los ensayos de identidad mediante la técnica espectroscópica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) constituyen parámetros de calidad establecidos para este producto. El RMN se registró en un espectrómetro Bruker/Avance DPX-250. El FID (Free Induction Decay o Caída Libre de Inducción) de RMN 1H se obtuvo a una frecuencia de 250,13 MHz con 16 barridos, 32 k de adquisición de datos y un ancho espectral de 2000 Hz.

Resultados y Discusión

La evaluación del incremento en los volúmenes de procesamiento para satisfacer la demanda de producto requerida, partió del análisis de la posibilidad de duplicar la cantidad de eritrocitos procesada mediante el procedimiento establecido, tomando como base el equipamiento disponible. La información referente a cada

uno de los lotes procesados con ambos procedimientos y los resultados de los principales parámetros del proceso se refleja en las Tablas 1 y 2.

Se considera oportuno señalar que las variaciones observadas en los resultados para lotes procesados con igual procedimiento se deben en gran medida al hecho de que el tipo y la concentración de gangliósidos presentes en la membrana plasmática dependen de variados factores tales como la especie, edad, grado de desarrollo, el tejido considerado, estados fisiológicos, alimentación, temperatura ambiente y el efecto de compuestos químicos, entre otros; tributando de esta forma a la variabilidad propia de un proceso productivo desarrollado a partir de fuentes naturales (6, 16). El peso promedio del extracto liofilizado para los lotes procesados según el procedimiento establecido fue de 11,393 g mientras para la propuesta de cambio analizada fue 23,094 g. Puede notarse que el peso del extracto

liofilizado en esta última es el doble del obtenido para el procedimiento aprobado; sin embargo, se mantiene el rendimiento promedio de la etapa de extracción en 0,008 g de extracto liofilizado/ g de eritrocitos utilizados, para ambos.

Analizando el comportamiento del proceso en la etapa de purificación se observa que el contenido de NGcGM₃ en el volumen total de fracciones colectadas en la adsorción para la propuesta de cambio es 2,4 veces superior al obtenido con el procedimiento establecido, incrementándose el rendimiento de este proceso en un 15%. Al realizar igual análisis para la etapa de purificación incluyendo la adsorción, intercambio iónico y la diálisis se detecta que el peso de NGcGM₃ obtenido para la propuesta de cambio es 2,2 veces el alcanzado con el procedimiento establecido mientras el rendimiento de la etapa es ligeramente superior para el cambio evaluado (incremento aproximado de 5%).

Tabla 1. Resumen de los parámetros evaluados para lotes procesados con 1,5 kg de eritrocitos como sustancia de partida.

No. Lote	Peso de Extracto Liofilizado (g)	Rendimiento Extracción (g Ext. Liof./ g Eritrocitos)	Contenido NGcGM ₃ Purificación Adsorción (g)	Rendimiento Purificación Adsorción (g NGcGM ₃ / g Ext. Liof.)	Peso de NGcGM ₃ obtenido (g)	Rendimiento Purificación (g NGcGM ₃ / g Ext. Liof.)	Rendimiento global (g NGcGM ₃ / g eritrocitos)
NGL.01	9,51	0,006	0,8069	0,0848	0,7270	0,0764	0,0048
NGL.02	9,30	0,006	1,1234	0,1208	0,8134	0,0875	0,0054
NGL.03	14,19	0,009	1,3503	0,0952	0,9754	0,0687	0,0065
NGL.04	12,07	0,008	1,4444	0,1197	1,2623	0,1046	0,0084
NGL.05	10,94	0,007	1,4744	0,1348	1,1307	0,1034	0,0075
NGL.06	10,65	0,007	1,3295	0,1248	0,6336	0,0595	0,0042
NGL.07	13,55	0,009	1,2309	0,0908	1,0042	0,0741	0,0067
NGL.08	12,46	0,008	1,5482	0,1243	1,0512	0,0844	0,0070
NGL.09	14,02	0,009	1,1363	0,0810	0,9166	0,0654	0,0061
NGL.10	11,42	0,008	1,0708	0,0938	1,0506	0,0920	0,0070
NGL.11	10,75	0,007	0,8928	0,0831	0,8632	0,0803	0,0058
NGL.12	10,67	0,007	0,9706	0,0910	0,8692	0,0815	0,0058
NGL.13	11,63	0,008	0,9558	0,0822	0,7837	0,0674	0,0052
NGL.14	10,85	0,007	0,8966	0,0826	0,6245	0,0576	0,0042
NGL.15	11,50	0,008	1,1387	0,0990	1,0746	0,0934	0,0072
NGL.16	11,02	0,007	0,6298	0,0571	0,4844	0,0440	0,0032
NGL.17	8,75	0,006	0,7387	0,0844	0,6058	0,0692	0,0040
Promedio de los parámetros evaluados:	11,393	0,008	1,102	0,097	0,875	0,077	0,006

Tabla 2. Resumen de los parámetros evaluados para lotes procesados con 3,0 kg de eritrocitos como sustancia de partida.

No. Lote	Peso de Extracto Liofilizado (g)	Rendimiento Extracción (g Ext. Liof./ g Eritrocitos)	Contenido NGcGM ₃ Purificación Adsorción (g)	Rendimiento Purificación Adsorción (g NGcGM ₃ / g Ext. Liof.)	Peso de NGcGM ₃ obtenido (g)	Rendimiento Purificación (g NGcGM ₃ / g Ext. Liof.)	Rendimiento global (g NGcGM ₃ / g eritrocitos)
NGL.18	25,19	0,008	2,7880	0,1107	1,8563	0,0737	0,0062
NGL.19	22,73	0,008	2,4184	0,1064	1,7383	0,0765	0,0058
NGL.20	23,27	0,008	2,7675	0,1189	2,0541	0,0883	0,0068
NGL.21	20,80	0,007	1,8889	0,0908	0,5935	0,0285	0,0020
NGL.22	24,01	0,008	3,0978	0,1290	2,6018	0,1084	0,0087
NGL.23	21,13	0,007	1,8686	0,0884	1,2921	0,0612	0,0043
NGL.24	23,49	0,008	3,0293	0,1290	2,0284	0,0864	0,0068
NGL.25	24,13	0,008	3,1025	0,1286	1,7544	0,0727	0,0058
Promedio de los parámetros evaluados:	23,094	0,008	2,620	0,113	1,904	0,081	0,006

Comparando el rendimiento global del proceso para la propuesta de cambio con el del procedimiento aprobado, puede notarse que este parámetro se mantiene para ambos procedimientos en 0,006 g de NGcGM₃/g de eritrocitos, obteniéndose con el cambio evaluado 2,2 veces la cantidad de NGcGM₃ alcanzada con el proceso aceptado. Estos resultados indican que el incremento en los volúmenes de procesamiento permite aumentar la cantidad de producto obtenido sin afectar los rendimientos del proceso.

La utilización del HPLC Preparativo en la purificación por adsorción en las condiciones establecidas, reduce el tiempo de procesamiento de 12 a 8 h, considerando que se procesara la cantidad de extracto liofilizado obtenida con el incremento del volumen de producción en el sistema establecido (columna de vidrio borosilicato, de longitud 460 mm y diámetro interno 26 mm, flujo de 10 - 15 mL/min. utilizando bomba de MPLC) para el procedimiento instituido.

El nuevo sistema permite la adquisición de los datos en tiempo real, brindando evidencia confiable del comportamiento del proceso; contribuye además al ahorro de disolventes y energía, así como la disminución del tiempo de operación y manipulación logrando un proceso más eficaz, con un aumento del 30% en la productividad.

Se realizaron de forma preliminar gráficos de control para los datos obtenidos de rendimiento de la etapa

de extracción, rendimiento de la etapa de purificación y rendimiento global del proceso para ambos procedimientos.

El gráfico de control permite analizar el comportamiento de un proceso, determinando si los datos de los parámetros del mismo están en un estado de control estadístico; para ello es preciso que los datos analizados procedan de una distribución normal y por tanto previo a la confección de un gráfico se requiere realizar pruebas de normalidad.

Con el objetivo de facilitar la interpretación de los parámetros evaluados, los valores de rendimiento global del proceso fueron afectados por múltiplos de 10. El procesamiento de los datos para este propósito se efectuó mediante el Software STATGRAPHICS Plus Versión 5.1 y los resultados se muestran en las Figuras 1, 2 y 3.

Se observa en los gráficos (Figura 1) que de los 17 y 8 puntos incluidos para el procedimiento establecido y la propuesta de cambio, respectivamente, ningún valor se encuentra fuera de los límites de control.

Puesto que la probabilidad de que aparezcan 0 o más puntos fuera de límites sólo por azar es 1,0, si los datos proceden de una distribución normal, no puede rechazarse la hipótesis de que ambos procesos se encuentran en estado de control estadístico para un nivel de confianza del 95%.

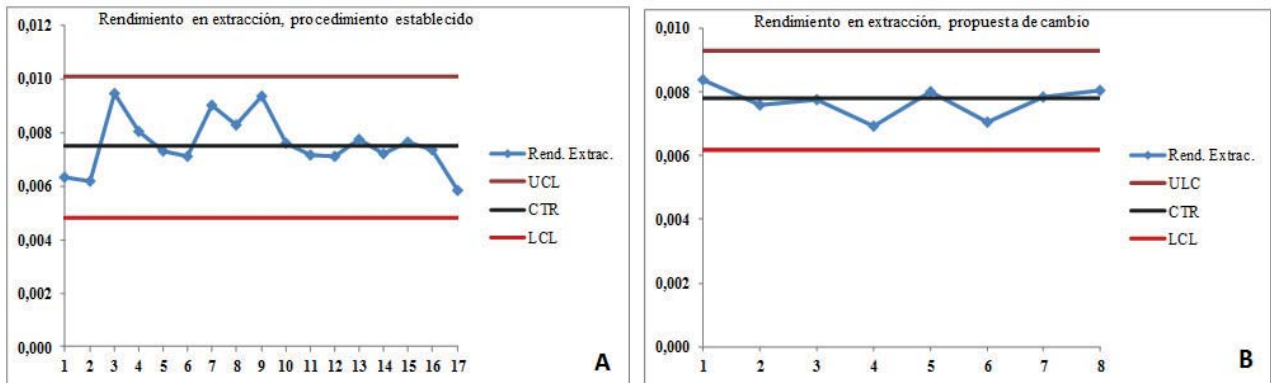


Fig. 1. Gráficos de control para rendimiento de la extracción (A: procedimiento establecido, B: propuesta de cambio). El número de observaciones es 17 (A) y 8 (B), proceden de una distribución normal, no se excluyeron observaciones, Límite de Control Superior (UCL)+3,0 sigma = 0,0101 (A) y 0,0093 (B), Línea central = 0,0075 (A) y 0,0078 (B), Límite de Control Inferior (LCL) - 3,0 Sigma = 0,0048 (A) y 0,0062 (B), no existen observaciones fuera de los límites, Media del Proceso = 0,0075 (A) y 0,0078 (B) y Sigma del Proceso = 0,0009 (A) y 0,0005 (B).

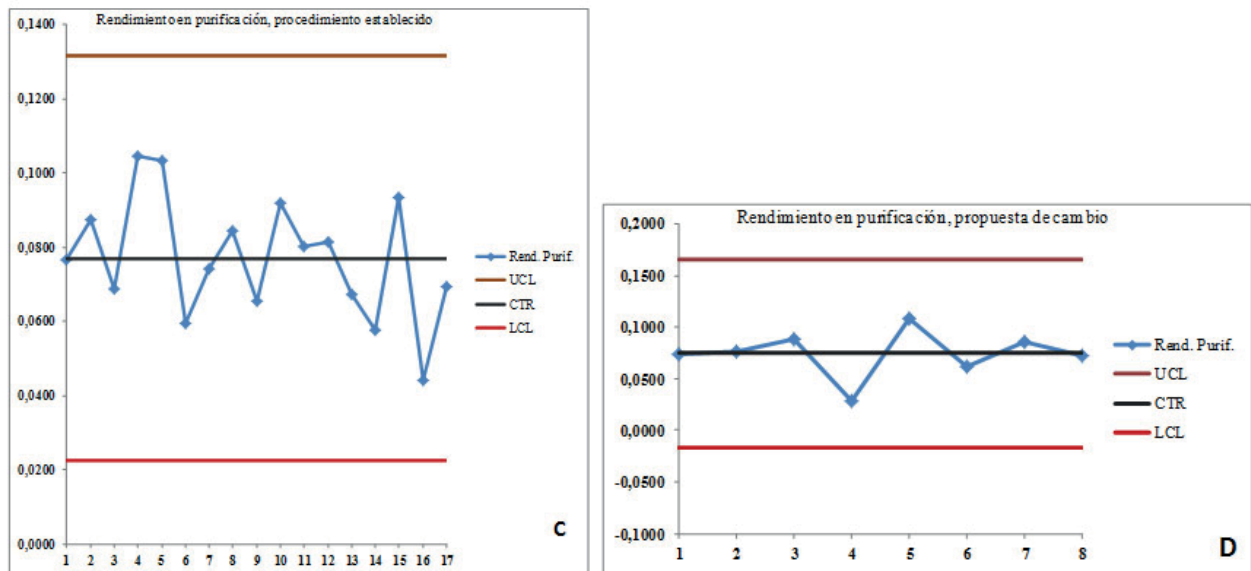


Fig. 2. Gráficos de control para rendimiento de la purificación (C: procedimiento establecido, D: propuesta de cambio). El número de observaciones es 17 (C) y 8 (D), proceden de una distribución normal, no se excluyeron observaciones, Límite de Control Superior (UCL) + 3,0 Sigma = 0,1316 (C) y 0,1658 (D), Línea central = 0,0770 (C) y 0,745 (D), Límite de Control Inferior (LCL) - 3,0 Sigma = 0,0224 (C) y -0,0169 (D), no existen observaciones fuera de los límites, Media del Proceso = 0,0770 (C) y 0,745 (D) y Sigma del Proceso = 0,0182 (C) y 0,0304 (D).

Los gráficos de control para el parámetro de rendimiento de la purificación (Figura 2) muestran de igual forma que de los 17 y 8 puntos no excluidos mostrados para cada procedimiento, ninguno está fuera de los límites de control. Realizando el mismo análisis, no puede rechazarse la hipótesis de que los procesos evaluados están en estado de control estadístico para un nivel de confianza del 95%.

Referente al rendimiento global del proceso los gráficos de control, tanto para el procedimiento establecido como para la propuesta de cambio evaluada (Figura 3),

muestran igualmente que de los 17 y 8 puntos no excluidos respectivamente, no existe ninguno fuera de los límites de control. Considerando iguales observaciones en cuanto a la probabilidad que en los gráficos anteriores, puede considerarse que ambos procesos están en estado de control estadístico con un nivel de confianza del 95%. La data del proceso utilizada para realizar los gráficos de control no es suficiente para efectuar un análisis estadístico completo, pero permite tener una idea del comportamiento del proceso productivo establecido y de la propuesta de cambio evaluada.

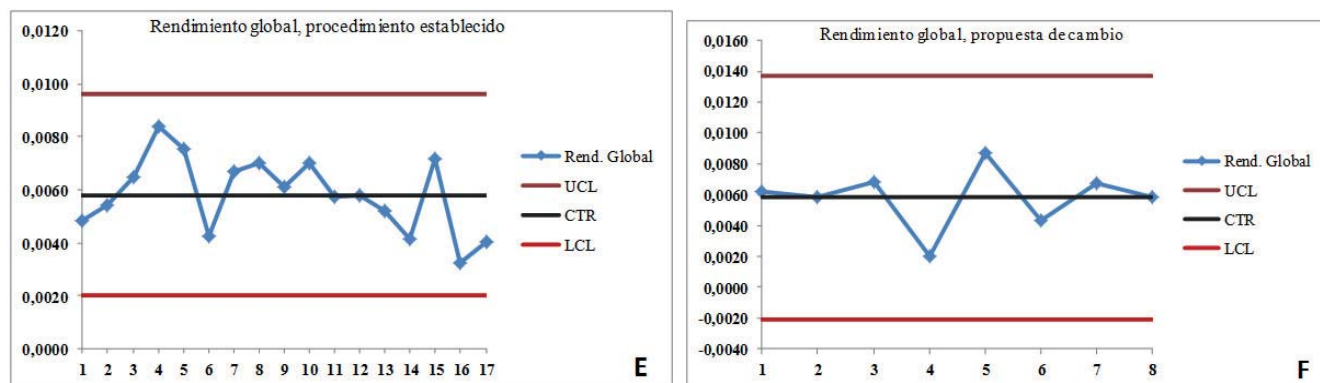


Fig. 3. Gráficos de control para rendimiento global del proceso (E: procedimiento establecido, F: propuesta de cambio). El número de observaciones es 17 y 8, proceden de una distribución normal, no se excluyeron observaciones, Límite de Control Superior (UCL) + 3,0 Sigma = 0,0096 (E) y 0,0137 (F), Línea central = 0,0058 (E) y 0,0058 (F), Límite de Control Inferior (LCL) - 3,0 Sigma = 0,0020 (E) y -0,0021 (F), no existen observaciones fuera de los límites, Media del Proceso = 0,0058 (E) y 0,0058 (F) y Sigma del Proceso = 0,0012 (E) y 0,0026 (F).

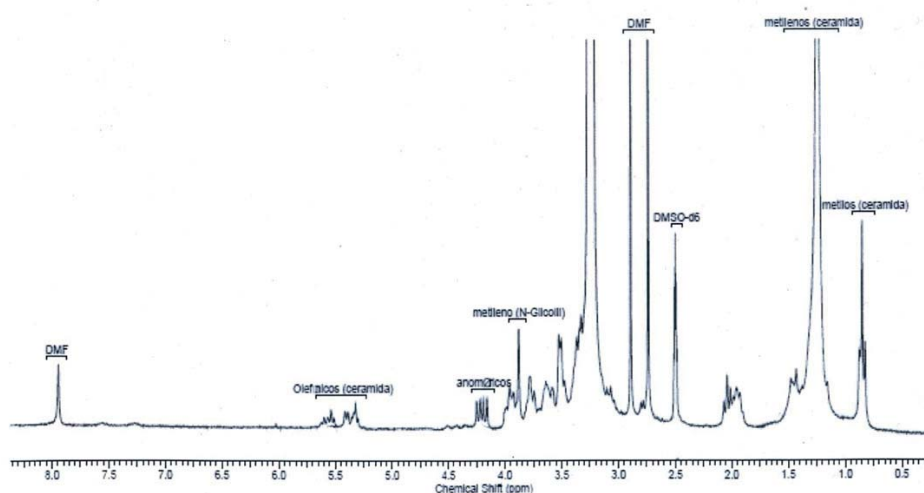


Fig. 4. Espectro de RMN 1H representativo del NGcGM3 obtenido. Espectrómetro Bruker/Avance DPX-250, frecuencia de 250,13 MHz con 16 barridos, 32 k de adquisición de datos y ancho espectral de 2000 Hz.

El análisis de los gráficos y parámetros estadísticos permite además establecer que para ambos procedimientos el proceso está en estado de control para un nivel de confianza del 95%. Es necesario señalar que estos resultados, a pesar de brindar una noción preliminar, no son conclusivos; es imprescindible analizar la información recopilada de mayor número de lotes.

El NGcGM₃ obtenido con el incremento en la capacidad de procesamiento evaluado, muestra un espectro de RMN 1H correspondiente con el espectro de referencia. Aparecen dos multipletos en $\delta = 5,5$ y 5,38 ppm correspondientes a los protones olefinicos de la ceramida, dos dobletes en $\delta = 4,23$ y 4,17 ppm de los protones

anómicos de la β -D-galactosa y la β -D-glucosa, un singuleto en $\delta = 3,87$ ppm propio de los protones metilénicos del grupo N-glicolil del ácido siálico, señales múltiples de $\delta = 1,6$ a 1,1 ppm de los protones metilénicos de la ceramida, un tripleto en $\delta = 0,86$ ppm de los protones metílicos de la ceramida, además de las señales correspondientes a la dimetilformamida y el dimetilsulfóxido empleados en la preparación analítica.

Estos resultados permiten corroborar que el NGcGM₃ obtenido mediante la propuesta evaluada cumplió los requerimientos de calidad establecidos para este producto. En la figura 4 se muestra el espectro de RMN 1H, donde se identifican las señales antes descritas.

Los resultados expuestos indican que el incremento del volumen de procesamiento respecto al procedimiento establecido mantuvo el rendimiento en la etapa de extracción y en el proceso de forma global y alcanzó rendimientos ligeramente superiores en la purificación. El producto obtenido a partir de la propuesta de cambio evaluada cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para NGcGM₃, por lo que es factible implementar el cambio.

Conclusiones

El incremento de la capacidad de extracción mantuvo el índice de rendimiento de la etapa extractiva del procedimiento establecido. Mientras, el incremento de la capacidad de procesamiento en la purificación aumentó ligeramente el rendimiento en esta etapa y se mantuvo el rendimiento global del proceso en 0,006 g de N-Glicolil GM₃/g de Eritrocitos.

Paralelamente la utilización del nuevo sistema HPLC Preparativo KNAUER permite reducir el tiempo de procesamiento, brindando evidencia confiable del comportamiento del mismo; lográndose un proceso más eficaz con menor consumo de disolventes, energía y tiempo de operación y manipulación del personal.

De igual forma el análisis del comportamiento de la producción durante las etapas de extracción y purificación, así como del proceso en su conjunto permitió establecer que tanto para el procedimiento aprobado como para la propuesta de cambio evaluada el proceso está en estado de control estadístico para un nivel de confianza del 95%.

El producto obtenido mediante el procedimiento a escala superior cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el mismo; permitiendo un aumento en la productividad de un 30%, menor consumo de energía y menor desgaste de los recursos humanos, por lo que se propone implementar el cambio de escala productiva.

Referencias

- Mulens V, Marinello P, Carr A, Mazorra Z, Fernández LE. Gangliósidos en la Biología e Inmunoterapia del Cáncer: la Experiencia Cubana. *Cancerología* 2009;4:155-67.
- Zancada L. Estudio del contenido de oligosacáridos, glicolípidos y fosfolípidos de la leche de oveja. Participación en la defensa del recién nacido frente a infecciones [Tesis Doctoral]. Salamanca: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca; 2008.
- Bada A, Casacó A, Arteaga M, Martínez J, León A, Santana E, et al. Toxicity of a GM₃ cancer vaccine in *Macaca fascicularis* monkey: a 12-month study. *Human & Experimental Toxicology* 2002;21(5):263-7.
- Hanais N, Dohi T, Norese G, Hakomori S. A Novel Ganglioside, De-N-acetyl-GM₃ (II3NeuNH₂LacCer), acting as a Strong Promoter for Epidermal Growth Factor Receptor Kinase and as a Stimulator for Cell Growth. *The Journal of Biological Chemistry* 1988;263(13):6296-301.
- Izquierdo N, Lorizate M, Contreras FX, Rodríguez MT, Glass B, Erkizia I, et al. Sialyllactose in Viral Membrane Gangliosides Is a Novel Molecular Recognition Pattern for Mature Dendritic Cell Capture of HIV-1. *PLoS Biol* 2012;10(4):e1001315. doi:10.1371/journal.pbio.1001315
- Puente R. Gangliósidos de la leche: variaciones de su contenido en diferentes etapas de la lactación. Estudio de su posible función. [Tesis Doctoral]. León: Facultad de Biología, Universidad de León; 1992.
- Regalado A, Mesa M, Chávez D, González R, Monteserín LA, Rodríguez MC, et al. A New and Efficient Approach to Prepare N-acetyl GM Ganglioside Via Trisaccharide [1→4] Lactone. *Organic Process Research & Development* 2013;17(1):53-60.
- Mazorra Z. El gangliósido GM₃ como blanco en la inmunoterapia del melanoma. [Tesis Doctoral]. La Habana: Centro de Inmunología Molecular; 2007.
- Garrido R, Veloso RC, López M, González JA, Rodríguez MC, Vélez H, et al. Evaluation and evidences of natural gangliosides with two unsaturated bonds in the ceramide structure by combination of MALDI-MS and NMR. *Anal Bioanal. Chem.* 2011;400(10):3675-80.
- Carr A, Mazorra Z, Alonso DF, Mesa C, Valiente O, Gómez DE, et al. A purified GM₃ ganglioside conjugated vaccine induces specific, adjuvant-dependent and non-transient antitumour activity against B16 mouse melanoma *in vitro* and *in vivo*. *Melanoma Research* 2001;11:219-27.
- Arango MC, González A. Vacunas terapéuticas en cáncer: Ensayos clínicos actuales. *Revista Cubana de Medicina* 2002;41(6). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232002000600009&lng=es.
- Portoukalian J, Carrel S, Doré JF, Rümke P. Humoral Immune Response in Disease-free Advanced Melanoma Patients after Vaccination with Melanoma-associated Gangliosides. *Int. J. Cancer* 1991;49(6):893-9.
- Alvarez N, Desselle A, Cochonneau D, Chaumette T, Clemenceau B, et al. A Monoclonal Antibody to O-Acetyl-GD2 Ganglioside and Not to GD2 Shows Potent Anti-Tumor Activity without Peripheral Nervous System Cross-Reactivity. *PLoS ONE* 2011;6(9):e25220. doi: 10.1371/journal.pone.0025220
- Folch-Pi J, Arsove S, Meath JA. Isolation of Brain Strandin, a New Type of Large Molecular Tissue Component. *The Journal of Biological Chemistry* 1951;191:819-31.
- Wang WQ, Gustafson A. Erythrocyte Lipid Extraction in Alcohol-Chloroform Ganglioside Systems: A Comparative Study. *Acta Chemica Scandinavica* 1994;48:753-8.

16. Wang WQ, Gustafson A. Ganglioside Extraction from Erythrocytes: a Comparison Study. *Acta Chemica Scandinavica* 1995;49:929-36.

17. Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochimica et Biophysica Acta* 1957;24:604-11.

Increase in processing capacity for N-Glicolil GM₃ production

Abstract

The N-Glicolil GM₃ is a monosialilganglioside used as antigen and adjuvant in vaccines preparations for therapeutic use against breast, lung and melanoma cancer. The obtaining process of this ganglioside from equine erythrocytes comprises two stages: extraction and purification, in which we work to increment processing volumes. The assessment of increment in the processing capacity, its influence on the performance and the evaluation of purification process behavior by Preparative High-Performance Liquid Chromatography (Prep HPLC) constituted the objectives of this paper. The results obtained from the approved procedure and the proposal of change were compared. The process was controlled by evaluating the organoleptic characteristics and weight of lyophilized extract, as well as the detection and content of N-Glicolyl GM₃ by Qualitative Thin Layer Chromatography and colorimetric analysis of sialic acid; STATGRAPHICS software was used to assess the process variability. The increment in processing volume regarding the established procedure remained the extraction stage performance and incremented slightly the purification performance, by reducing the processing time with the use of Prep HPLC. The increment of processing capacity maintained the overall performance of the process in 0,006 g of N-Glicolyl GM₃/g of erythrocytes and the product obtained by means of the proposed method fulfilled the quality specifications established for the same; allowing an increment in productivity by 30%, less energy consumption and less exhaustion of human resources, being feasible to implement the change.

Keywords: gangliosides, vaccines, cancer.

Recibido: Mayo de 2016

Aceptado: Julio de 2016