

Trabajo Científico

Cuantificación de EPO humana recombinante por Fase Reversa-Cromatografía Líquida de Ultra Resolución

Quantification of recombinant human EPO by Reverse Phase-Ultra Performance Liquid Chromatography

Emilio Medina R, Carolina Ortiz E., Eduardo González R., Néstor O. Pérez R.

Probiomed S.A. de C.V., Departamentos de Calidad e Investigación y Desarrollo

Resumen

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) es producida a partir de células de ovario de hamster chino (CHO) mediante técnicas de ADN recombinante. Su cuantificación durante el proceso de producción se lleva a cabo predominantemente mediante técnicas de inmunoensayo, el cual presenta la desventaja de alto costo y largo tiempo de ejecución. El presente estudio propone una metodología para cuantificar rhEPO por fase reversa en cromatografía líquida de ultra resolución (FR-CLUR) en muestras de diversas etapas del proceso de manufactura de rhEPO. Se presentan los resultados de la validación del método que demuestran que el método es preciso, exacto y específico dentro de un coeficiente de variación del 5%.

Abstract

Recombinant human Erythropoietin (rhEPO) is produced through DNA recombinant technology in Chinese Hamster Ovary cells. Its quantification during the manufacturing process is usually performed with immunoassay techniques, which is expensive and time consuming. The present study proposes a methodology to quantify rhEPO by reverse phase-ultra performance liquid chromatography (RP-UPLC) in broad media culture and clarified media. The article presents the validation of the method that demonstrates its precision, accuracy and specificity with a CV below of 5%.

Palabras clave: eritropoyetina, fase reversa, CLUR, validación. **Keywords:** erythropoietin, reverse phase, UPLC, validation.

Correspondencia

Dr. Néstor O. Pérez R.
Investigación y desarrollo, Probiomed S.A. de C.V.
Cruce de Carr. Acatzingo-Zumpahuacán S/N
Tenancingo, Edo. de Mex., 52400
Tel: 01 (55) 1166 2305
e-mail: nestor.perez@probiomed.com.mx

Fecha de recepción: 11 de enero 2011
Fecha de recepción de modificación: 28 de marzo 2011
Fecha de aceptación: 13 de abril de 2011

Introducción

La Eritropoyetina es una glicoproteína que promueve la generación de glóbulos rojos en el torrente sanguíneo, que se utiliza en el tratamiento de pacientes con insuficiencia renal crónica.¹ La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) es idéntica en su secuencia de aminoácidos a la proteína nativa. Está constituida por 165 residuos de aminoácidos que forman dos puentes disulfuro y presenta cuatro sitios de glicosilación. Los diferentes patrones de glicosilación generan ocho isoformas principales por electroforesis capilar de zona (con pesos moleculares entre 34 y 39 kD).² Su producción se lleva a cabo mediante técnicas de ADN recombinante por el cultivo de células de Ovario de Hamster Chino (CHO). Durante esta etapa, las células CHO secretan al medio de cultivo rhEPO junto con otras proteínas de hospedero. Debido a esto su purificación incluye operaciones unitarias cromatográficas y de ultrafiltración para la separación de las proteínas presentes en el medio y la de interés. El control de este proceso requiere metodologías de cuantificación que permitan estimar el rendimiento de manera rápida, precisa y exacta. Usualmente, la cuantificación de rhEPO durante el cultivo y purificación se realiza a través de técnicas de ELISA.³ Las técnicas de inmunoensayo tienen la ventaja de ser específicas para la proteína de interés, sin embargo, presentan el inconveniente de ser costosas y debido a la duración del ensayo (entre 5 y 10 h) no pueden ser usadas como métodos de control de proceso. Por otro lado, la naturaleza de la metodología provoca que los coeficientes de variación del análisis (entre el 10 y el 20 %) sean mayores a los que se obtienen por métodos cromatográficos^[4], por lo que existe la necesidad de tener métodos más rápidos, precisos y con menor variación.

En el presente artículo se propone una metodología por Fase Reversa-Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (FR-CLUR) adecuada para la cuantificación de rhEPO, capaz de separar adecuadamente la proteína de interés.

Las técnicas de CLUR tienen ciertas ventajas sobre las de alta resolución (CLAR). Las columnas de CLUR son empacadas con partículas de 1.7 μm , 2.9 veces menores a las usadas en CLAR que son de aproximadamente 5 μm incrementando la resolución, reduciendo los tiempos de corrida y el gasto de disolventes⁵ utilizados como fase móvil. Esta técnica ha sido utilizada recientemente en la cuantificación de muestras complejas como el Interferón alfa-2b en cuerpos de inclusión^[6] y flavonoides en orina.⁷

Las técnicas de fase reversa están basadas en la separación de sus componentes por su polaridad. La fase estacionaria está constituida por ligandos de cadenas carbonadas de entre 4 y 18 carbonos⁸ que retiene moléculas con características hidrofóbicas. La elución de los componentes de una muestra se obtiene al hacer pasar como fase móvil un gradiente con disolventes

orgánicos (por ejemplo: acetonitrilo), que al lograr un equilibrio determinado desprenden los compuestos retenidos en la fase estacionaria.⁸

Estos métodos reducen los costos por análisis (comparados con los costos por ELISA) y tienen la ventaja de poder ser usados como métodos para control de proceso por sus cortos tiempos de análisis (5 a 10 minutos). La muestra sólo necesita filtrarse para evitar tapar las columnas, por lo que los coeficientes de variación del método son menores al 5%. Nuestro grupo de investigación ha reportado anteriormente la aplicación de los criterios de validación de las guías de la ICH⁹ para un método espectrofotométrico,¹⁰ ahora presentamos el montaje y la validación de un método cromatográfico.

Materiales y métodos

Reactivos y muestras

Para la validación se utilizó estándar de Eritropoyetina (estándar interno de Probiomed SA de CV) a una concentración de 0.65 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 y muestras de diferentes etapas del proceso de cultivo y purificación, que incluyen el medio libre de células acondicionado y de tres operaciones unitarias del proceso de purificación. Para la preparación de las fases móviles se empleó acetonitrilo (J.T. Baker) grado HPLC, ácido trifluoroacético (TFA, J.T. Baker) y agua desionizada.

Preparación de las muestras

Las muestras de las diferentes etapas del proceso y el estándar se filtraron a través de acrodiscos (Pall) de 0.2 μm previo a su inyección en el cromatógrafo. El estándar se diluyó con agua desionizada para la preparación de las muestras de validación y las muestras de proceso se diluyeron con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 y con Tris-NaCl pH 7.2 según fuera el caso.

El medio Mock se obtuvo del cultivo de una clona transformada con el mismo vector de expresión que la clona de producción, pero sin el gen de EPO, y se utilizó para la prueba de especificidad.

Cuantificación de rhEPO por FR-CLUR

Durante el desarrollo y la validación del método se empleó un sistema de CLUR Acquity (Waters). El procesamiento de la información se llevó a cabo con el software Empower[®] (Waters). La separación se llevó a cabo en una columna Acquity BEH300 C₁₈ 2.1 x de 150 mm (Waters), a una temperatura de 45°C. Los cromatogramas se adquirieron con un detector UV a 214 nm. El flujo de trabajo fue 0.2 mL/min. La fase móvil A (FMA) fue compuesta de 0.1% de TFA en agua desionizada, la fase móvil B (FMB) se constituyó con 0.1% de TFA en acetonitrilo. El tiempo de corrida fue de 6 minutos: La separación se obtuvo con un gradiente lineal de 30% FMB, en un minuto, posteriormente

se llevó al 100% de FMB en un minuto adicional y se mantuvo otro minuto, nuevamente se llevó a las condiciones iniciales para equilibrar la columna durante 3 minutos.

Validación del método de cuantificación de rhEPO por FR-CLUR

El método se validó considerando los parámetros establecidos para un método cuantitativo en la guía de la ICH⁹ para la validación de métodos analíticos. Por lo tanto se evaluaron los siguientes atributos de medición:

Linealidad del sistema. Se prepararon por triplicado soluciones de estándar interno de EPO recombinante a una concentración de 0.15 µg/µL. Se inyectaron 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 y 0.75 µg de proteína.

Linealidad de método. Se prepararon por triplicado muestras de medio acondicionado y adicionadas con estándar interno. Se obtuvo una concentración final de 0.15 µg/µL. Se inyectaron 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 y 0.75 µg de proteína.

Precisión del sistema. Se inyectaron 0.45 µg de estándar interno por sextuplicado.

Precisión del método (repetibilidad). Esta prueba se evaluó con 4 muestras de diferentes etapas del proceso de fabricación de EPO. Primero se prepararon muestras de medio acondicionado adicionadas con estándar para tener concentraciones de 0.15, 0.20 y 0.25 µg/µL. Se inyectaron por triplicado 0.30, 0.40 y 0.50 µg de proteína.

Como segundo paso, se utilizó una muestra proveniente de la operación unitaria 1 y se adicionaron con muestras de un estándar a 0.65 µg/µL con diferentes soluciones amortiguadoras como se indica en la Tabla 1. Procedimientos similares se utilizaron para las operaciones unitarias 2 y 3.

Exactitud. Se prepararon muestras de proceso (medio acondicionado y operaciones unitarias 1, 2 y 3) adicionadas con estándar para obtener concentraciones de 0.10, 0.15 y 0.20 µg/µL. Se inyectaron 0.30, 0.45 y 0.60 µg de proteína.

Especificidad. Se determinó inyectando por triplicado una muestra de cultivo Mock y muestra de cultivo de EPO.

Intervalo de análisis. Se determinó como el intervalo evaluado en donde la respuesta cumplió con el parámetro de linealidad.

Límite de detección. Se determinó usando la fórmula $LD = 10s/m$. Donde s es la desviación estándar de la ordenada al origen de la curva tipo y m es la pendiente de la curva tipo.

Comparación del método propuesto contra el inmunoensayo

Se llevó a cabo una demostración de la comparabilidad del método de FR-CLUR contra el Inmunoensayo tradicional utilizando diferentes muestras, tanto de cultivo como del proceso de purificación. El inmunoensayo se llevó a cabo utilizando el kit comercial Human Erythropoietin ELISA Kit (R&D Systems).

Resultados y discusión

El método descrito en el presente artículo es capaz de separar un pico definido correspondiente a rhEPO con un tiempo de retención de 3.2 minutos. La Figura 1 muestra un cromatograma típico del estándar de EPO. Debido a la especificidad y tiempo de análisis, esta metodología puede utilizarse para diferentes muestras a lo largo del proceso con diferentes grados de pureza, como muestras complejas de medio acondicionado (extracto crudo), que contienen proteínas diferentes de EPO y componentes del medio de cultivo. La Figura 3 muestra cromatogramas típicos de muestras de las diferentes operaciones unitarias, puede notarse la disminución de picos adicionales conforme aumenta el grado de pureza de la muestra.

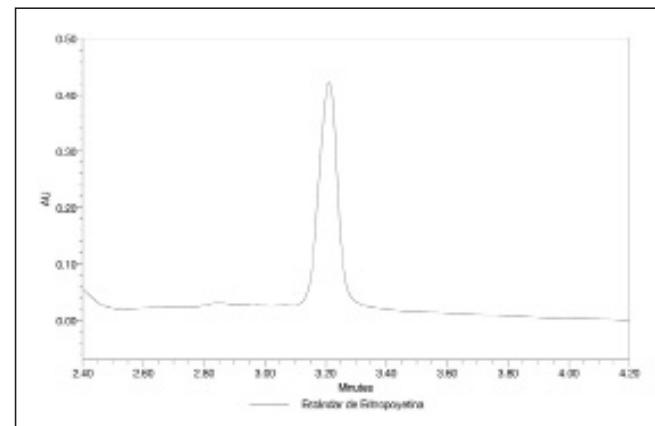


Figura 1. Cromatograma típico del estándar interno de EPO recombinante humana, el tiempo de retención es de 3.2 minutos.

La validación del método se llevó a cabo evaluando los parámetros establecidos por la ICH⁹. La linealidad del sistema se determinó con una curva estándar de 5 puntos en un intervalo de contenido entre 0.15 y 0.75 µg, mientras que para la linealidad del método se construyó una curva equivalente con muestras de proceso adicionadas con estándar en el mismo intervalo de concentración. La Figura 2 muestra las curvas tipo obtenidas; ambas curvas tienen un coeficiente de correlación superior a 0.99 y tienen la misma pendiente, por lo que la linealidad del sistema

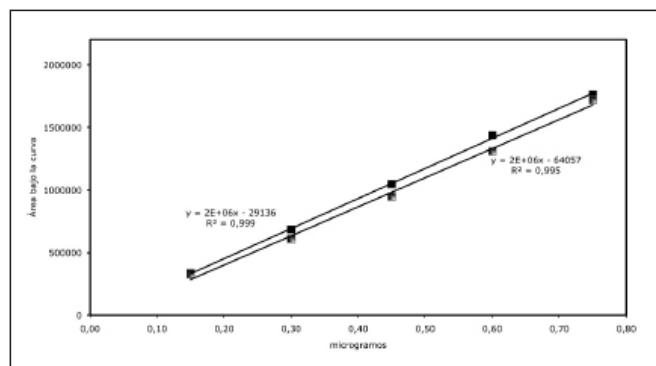


Figura 2. Curvas tipo que demuestran la linealidad del sistema y la linealidad del método (■) Curva tipo con estándar. (■) Curva tipo con muestra de proceso adicionada con estándar.

y del método cumple de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos para este atributo de medición (Tabla 2).

La precisión del sistema se determinó inyectando por sextuplicado 0.45 µg de estándar de EPO, el coeficiente de variación de la prueba fue de 1.89 %. La precisión del método se determinó al adicionar a muestras del proceso de concentración conocida una muestra de estándar para llevarlos a una concentración final conocida en tres niveles diferentes (Tabla 1). Las muestras se analizaron por triplicado y se calcularon sus coeficientes de variación. Todas las muestras, en todos los niveles de la prueba tuvieron coeficientes de variación menores al 5 %, en el caso de las muestras del proceso de purificación su matriz no tuvo efecto sobre la precisión (Tabla 2).

La exactitud se determinó por el porcentaje de recobro obtenido en muestras adicionadas con el estándar de diferentes etapas del proceso, desde la más compleja (medio acondicionado) a la más pura (operación unitaria 3), en la Figura 3 se muestran cromatogramas típicos de las 4 etapas del proceso. Los recobros cumplieron con los criterios establecidos entre 95 al 105%, exceptuando el nivel 1 de la operación unitaria 1 que tuvo 108% de recobro, esta muestra cumple en un intervalo de concentración entre 0.45 y 0.75 µg (Tabla 2), demostrando que el método es exacto, que las matrices evaluadas del proceso

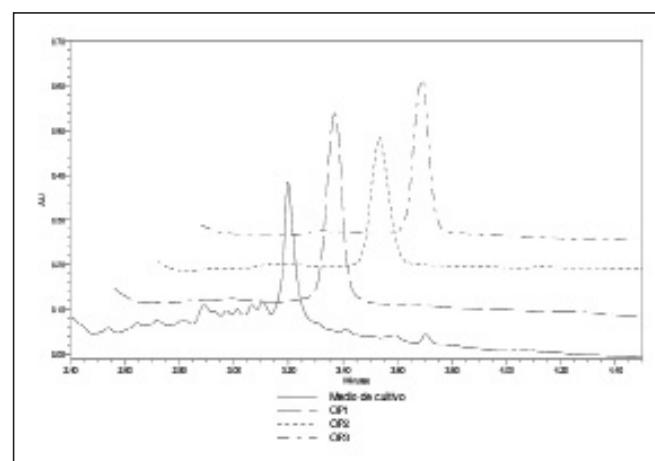


Figura 3. Cromatogramas típicos de muestras de diferentes etapas del proceso de obtención de EPO recombinante.

y el tratamiento de la muestra, no interfieren en la exactitud del método.

La especificidad del método se determinó utilizando una muestra obtenida de un cultivo con células mock, que contiene los mismos componentes del medio, pero sin EPO, el cromatograma no presenta ningún pico en el tiempo de retención de EPO (Figura 4). La muestra mock es muy compleja ya que tiene compuestos provenientes del medio de cultivo y del metabolismo celular. Ninguno de estos interfiere con el análisis. No se demostró interferencia mediante la adición de otras proteínas recombinantes.

Por último, se llevó a cabo una comparación de las estimaciones obtenidas por el método propuesto en este artículo y el método tradicional por ELISA de muestras de cultivo, los resultados muestran que ambos métodos presentan estimaciones comparables, después de convertir el resultado a sus unidades respectivas usando la equivalencia descrita en la farmacopea de EPO de 100,000 UI/mg.¹¹ Las diferencias de cuantificación entre los dos métodos presenta CV entre 0.07 y 21%, estas diferencias las podemos atribuir al método de ELISA que tiene coeficientes de variación alrededor de 15%, mientras que la

Tabla 1. Preparación de muestras adicionadas de la operación unitaria 1.

Operación unitaria 1 0.70 µg/µL (µL)	Amortiguador Tris-NaCl (µL)	Estándar 0.65 µg/µL (µL)	Amortiguador de fosfatos (µL)	Volumen de inyección (µL)	Cantidad inyectada (µg)
70	210	17	103	2	0.25
70	210	63	57	2	0.45
70	210	110	10	2	0.60

Tabla 2. Criterios de aceptación y resultados de la validación de rhEPO por FR-CLUR.

Atributo de Medición	Parámetro	Criterio	Resultado	Dictamen
Linealidad del sistema	m	$\neq 0$	2288819-2516383	Cumple
	R^2	≥ 0.98	0.99	Cumple
Linealidad del método	Relación x/y	$Fr \geq F(g_{l_r}, g_{l_{cr}}, 0.99)$	Cumple	Cumple
	b	Estadísticamente=0	-136447-8333.87	Verdadero
	m	$\neq 0$	2178580-2469603	Cumple
	R^2	≥ 0.98	0.99	Cumple
Precisión del sistema	CV (%)	≤ 5.00	1.89	Cumple
Precisión del método	Medio Acondicionado	CV (%)	≤ 5.00	Nivel 1 2.20
				Cumple
				Nivel 2 1.47
	Operación unitaria 1	CV (%)	≤ 5.00	Nivel 3 1.49
				Cumple
				Nivel 1 0.64
	Operación unitaria 2	CV (%)	≤ 5.00	Nivel 2 0.45
				Cumple
				Nivel 3 1.04
	Operación unitaria 3	CV (%)	≤ 5.00	Nivel 1 1.00
				Cumple
				Nivel 2 1.45
Exactitud	Medio Acondicionado	\bar{Y} de % del recobro	$\bar{Y} = 100 \pm 5.00\%$	Nivel 3 0.47
				Cumple
				Nivel 1 0.33
	Operación unitaria 1	\bar{Y} de % del recobro	$\bar{Y} = 100 \pm 5.00\%$	Nivel 2 3.02
				Cumple
				Nivel 3 0.48
	Operación unitaria 1	CV (%)	$\leq 5.00 \%$	Nivel 1 102
				Cumple
				Nivel 2 100.3
	Operación unitaria 1	CV (%)	$\leq 5.00 \%$	Nivel 3 97.89
				Cumple
				Nivel 1 2.59
	Operación unitaria 1	CV (%)	$\leq 5.00 \%$	Nivel 2 1.80
				Cumple
				Nivel 3 1.29
	Operación unitaria 1	\bar{Y} de % del recobro	$\bar{Y} = 100 \pm 5.00\%$	Nivel 1 108
				No cumple*
				Nivel 2 99.56
	Operación unitaria 1	CV (%)	$\leq 5.00 \%$	Nivel 3 97.61
				Cumple
				Nivel 1 3.51
	Operación unitaria 1	CV (%)	$\leq 5.00 \%$	Nivel 2 2.20
				Cumple
				Nivel 3 1.66

continuación Tabla 2

Atributo de Medición		Parámetro	Criterio	Resultado	Dictamen
Exactitud (continúa)	Operación unitaria 2	\bar{Y} de % del recobro	$\bar{Y} = 100 \pm 5.00\%$	Nivel 1 100.22	Cumple
				Nivel 2 97.48	Cumple
		CV (%)		Nivel 3 96.44	Cumple
	Operación unitaria 3			Nivel 1 1.02	Cumple
	\bar{Y} de % del recobro	$\bar{Y} = 100 \pm 5.00\%$	Nivel 2 1.52	Cumple	
			Nivel 3 1.61	Cumple	
	CV (%)		Nivel 1 104.78	Cumple	
			Nivel 2 102.44	Cumple	
			Nivel 3 100.39	Cumple	
Especificidad		Respuesta de muestra negativa	No presenta respuesta en el tiempo de retención de EPO	Cromatograma sin pico de EPO	Verdadero

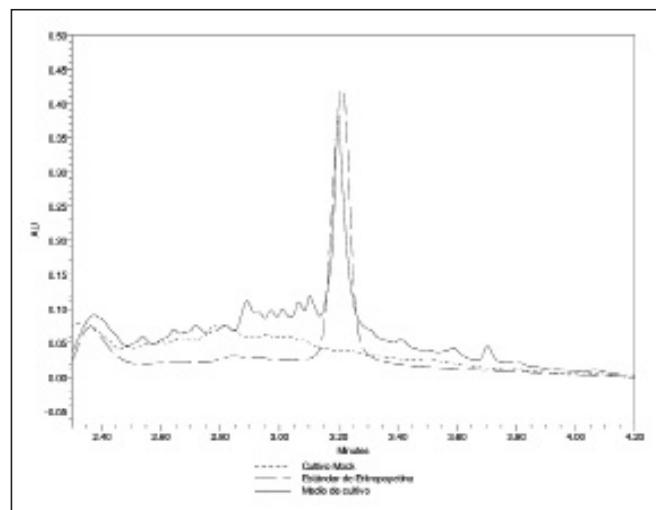


Figura 4. Especificidad del método cromatográfico de cuantificación de EPO por FR-CLUR.

validación del método de FR-CLUR tiene coeficientes menores al 5%. Así mismo las diferencias de cuantificación medidas en % van de 1.3 al 25%. Estos resultados se muestran en la Tabla 3. La sensibilidad del método de ELISA es alrededor de 25 pg/mL, esto es muy útil para medir concentraciones séricas de EPO, pero incrementa el error de preparación de muestras de procesos productivos por la dilución que se lleva a cabo en

el orden de 100,000 veces, con la finalidad de se interpole el valor de la señal dentro de la curva estándar. El método de FR-CLUR reportado aquí tiene un límite de detección mayor (0.04 μ g, Tabla 2), pero % CV menores que el ELISA tradicional, los límites de cuantificación e intervalo de medición son adecuados para las muestras intencionadas. Además el tiempo de análisis es muy diferentes, de 4.5 h para el ELISA y 5 minutos para el FR-CLUR, favoreciendo de esta forma el control de procesos.

Tabla 3. Comparación entre el método de ELISA y FR-CLUR para la cuantificación de rhEPO.

Muestra	ELISA		FR-CLUR	Diferencia en %	%CV
	UI/mL	mg/mL	mg/mL		
1	3739	0.037	0.034	8.1	6.71
2	5089	0.051	0.039	23.5	19.60
3	5767	0.058	0.045	22.4	17.45
4	5503	0.055	0.041	25.5	21.5
5	6502	0.065	0.060	7.7	6.26
6	7243	0.072	0.073	1.3	0.07
7	8738	0.087	0.097	11.5	7.01
8	9245	0.092	0.099	7.6	4.83
9	8636	0.086	0.089	3.4	2.129

Conclusiones

En este estudio se demostró que el método de cuantificación por FR-CLUR es adecuado para estimar la concentración de EPO en muestras de medio acondicionado y de las operaciones unitarias 1, 2 y 3, según los atributos de medición evaluados de linealidad, precisión, exactitud y especificidad que cumplieron con los criterios establecidos. Además, las diferentes matrices en las que se encuentra el analito durante su purificación no tienen efecto sobre la exactitud y precisión del método. Esta técnica puede ser utilizada para el seguimiento del proceso y se considera factible sustituir el método de ELISA por el método de FR-CLUR que es más económico y rápido.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo la Dirección de Biotecnología de Probiomed, SA de CV y la colaboración de los grupos de Cultivo y Purificación por las muestras utilizadas en el presente trabajo. A Maricela Cruz Soto por el medio Mock.

Referencias

1. Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, Reddan D. Correction of anemia with Epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2006; 355(20):2085-2098.
2. Bietlot HP, Girard M. Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high -performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 1997; 759(1-2):177-184.
3. Ahn WS, Jeon JJ, Jeong YR, Lee SJ, Yoon SK. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 2008; 101(6):1234-1244.
4. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *J Chromatogr B. Biomed Sci App.* 1997; 689(6):175-180.
5. Nováková L, Matysová L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta.* 2006; 68(3):908-918.
6. Cueto-Rojas HF, Pérez NO, Pérez-Sánchez G, Ocampo-Juárez I, Medina-Rivero E. Interferon α 2b quantification in inclusion bodies using Reversed Phase-Ultra Performance Liquid Chromatography (RP-UPLC). *J Chromatogr B. Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878(13-14):1019-1023.
7. Baranowska I, Magiera S. Analysis of isoflavones and flavonoids in human urine by UHPLC. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 399(9):3211-3219.
8. Szepesi G. How to use reverse-phase HPLC. 1^a. Ed. New York: John Wiley & Sons. 1992, p. 356.
9. International Conference on Harmonisation (ICH). Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validations of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005. Q2 (R1): 1-13.
10. Medina R. E, López M. CA, Pérez R. NO, Ferlan I. Determinación de Tween-20 en AgsHB por un método espectrofotométrico. *Rev Mex Cienc Farmac.* 2008; 39(2):11-15.
11. Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe. Capítulo 01/2008:1216 Erythropoietin concentrated solution In: European Pharmacopoeia 6.0. 2008. Vol. 2. p. 1813-1817.