ESTUDIO DE UNA PREPARACION DE INTERFERON ALFA 2b HUMANO RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA EN FASE REVERSA. VALIDACION DEL METODO

Galina Moya, Lourdes Costa y Ernesto González

Subdirección de Calidad, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba

Recibido en noviembre de 1993. Aprobado en febrero de 1994

Key words: HPLC, reversed phase, quality control, interferon.

SUMMARY

Reversed phase high performance liquid chromatography was applied for the study of a sample of recombinant human alfa 2b interferon (IFN). The method was selective to the different structurally modified IFN, it was also able to detect degration products. The variation coefficient for the percent of the principal peak was less than 0.4% within-day and less than 0.5% interday. Both parameters were less than 0.4% for the retention time. There were not significative differences between analysts when one way ANOVA was carried out for the percent of the principal peak area and the retention time. The method was linear from 20 to 120 μg of protein.

RESUMEN

La cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa se utilizó para el estudio de una preparación de interferón alfa 2b humano recombinante (IFN). El método fue selectivo para diferentes modificaciones de la molécula y degradaciones de ésta. El coeficiente de variación para el por ciento del área del pico principal fue menor de 0.4% por día y menor de 0.5% entre días. Ambos parámetros fueron menores de 0.4% para los tiempos de retención. Al realizar el análisis de varianza no hubo diferencias significativas entre analistas. El método fue lineal entre 20 y 120 μg de proteína.

INTRODUCCION

La cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (HPLC-RP) es una poderosa herramienta para el Contol de Calidad de productos recombinantes, permitiendo la identificación y la determinación de pureza de proteínas obtenidas por la vía de la recombinación del ADN (Garnick *et al.*, 1991).

Todas las técnicas analíticas utilizadas en el Control de Calidad de productos farmaceúticos deben ser validadas para asegurar la obtención de resultados confiables. La selección de los parámetros adecuados para la validación de métodos analíticos depende de cada técnica, sus objetivos y de la experiencia y criterio del analista (Rampazzo, 1990).

En este trabajo se describe la aplicación de la HPLC-RP al estudio del IFN, así como la validación de la técnica. El método resultó ser selectivo y preciso para el IFN degradado y otras moléculas de IFN modificadas en su estructura.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó un sistema de HPLC LKB (Bromma, Suecia) equipado con dos bombas modelo 2150, un controlador de gradiente 2152, un detector UVICORD 2158, un desgasificador ERC-3320 (ERMA, Japon) y un horno para columna (KNAUER, RFA). La separación se efectuó en una columna C_8 (4.6 x 100 mm, 5 μm) de la J.T. Baker (Pilipburg, NJ) acoplada a una precolumna C_2 Lichroprep (Merck, RFA) empacada en nuestro laboratorio.

La solución A contenía 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) (grado Sequanal, Pierce, IL) en agua y la solución B 0.05% de TFA en acetonitrilo (grado HPLC, Rathburn, Scotland).

Se aplicó un gradiente lineal desde 15 hasta 60% de B durante 45 minutos, a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, la temperatura fue constante a 34°C y la detección se efectuó a una longitud de onda de 226 nm. Para la adquisicion y procesamiento de los datos, así como para su análisis estadístico se usaron los programas BioCrom versión 2.0 (CIGB, Cuba) y Microstat (Ecosoft Inc., 1984), respectivamente.

Para probar la selectividad del método, se aplicó a la columna una muestra de IFN degradado.

Con el objetivo de conocer la precisión del método, se inyectaron 60 μg de la muestra a la columna por duplicado durante trece días; se calcularon la media, la desviación estándar (ds), y el coeficiente de variación (CV) para los análisis intra e inter-día. Para conocer la variación del método, tres analistas independientes efectuaron dos análisis diarios durante tres días, aplicando 60 μg de muestra. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de un solo factor de variabilidad.

La linealidad del método fue verificada al aplicar a la columna 20, 30, 40, 60, 100 y 120 μg de proteína.

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

RESULTADOS Y DISCUSION

Selectividad

Este parámetro es una medida de la sensibilidad del ensayo a las impurezas, compuestos relacionados y productos de degradación. La selectividad mide el grado de interferencias (De Sain, 1992), constituye un elemento fundamental en ensayos de identificación y en los métodos cuantitativos utilizados en estudios de estabilidad de ingredientes activos y de formulaciones (Rampazzo, 1990). El método cromatográfico es capaz de resolver mezclas que contienen la molécula de IFN y dos moléculas diferentes de IFN modificado (figura 1). Estas dos especies fueron estudiadas por espectometría de masas (SM-FAB) y correspondieron con IFN acetilado e IFN incorrectamente foldeado (Padrón *et al.*, 1989). Las degradaciones del IFN también pueden ser detectadas por el método. Al aplicar a la columna una muestra de IFN degradado, verificada por electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 2) y western-blot utilizando suero anti IFN en conejo (datos no mostrados), dos picos adicionales se detectaron en el perfil cromatográfico del IFN (figura 3) Ambos picos fueron colectados, llevados a sequedad y aplicados en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS (figura 2), observándose que ambas fracciones son IFN de menor talla molecular.

Precisión

Este término define la variación de una medición simple comparada con la media de una serie de réplicas y está determinada por los análisis independientes de una misma muestra homogénea, y por la evaluación su media y su desviación estándar.

Fig. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS teñida con azul de Coomassie de una muestra de IFN. Línea 1- Patrón de IFN, Línea 2- IFN degradado, Línea 3 y 4- Picos 1 y 2 de la figura 2, Line 5- Patrones de peso molecular Figura 4. Curva de calibración (área total contra microgramos aplicados).

Es una medida de la reproducibilidad y repetibilidad del método (Inman, 1987). La repetibilidad (datos de los análisis de un mismo día) es una evaluación de la precision durante un análisis. La reproducibilidad (datos de los análisis en diferentes días) muestra la variación de la precision con el tiempo y también puede incluir la variación debida a diferentes componentes analíticos, equipamiento y reactivos (Buick, 1990).

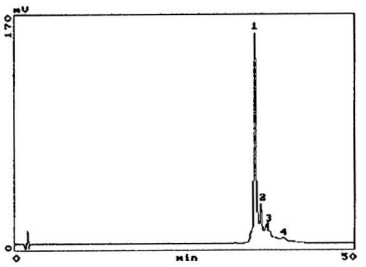

Fig. 1. Perfil cromatográfico en fase reversa de una preparación de interferón alfa 2b humano recombinante. 1-IFN, 2-IFN acetilado, 3 y 4- IFN incorrectamente foldeado.

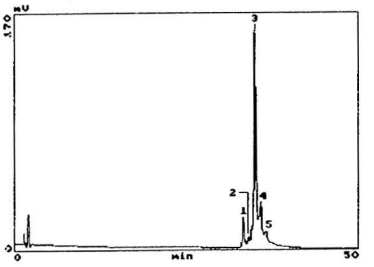

Fig. 3. Perfil cromatográfico en fase reversa de una preparación de interferón alfa 2b humano recombinante degradado. 1 y 2- IFN degradado.

Tabla 1.
Datos de precisión para los tiempos de retención.

DIA	PICO 1			PICO 2			PICO 3			PICO 4		
	t(min.	d.s	C.V(%)	t(min.	d.s	C.V(%)	t(min.	d.s	C.V(%)	t(min.	d.s	C.V(%)
1	34.98	0.04	0.12	36.00	0.04	0.10	36.79	0.04	0.10	39.45	0.06	0.10
2	34.89	0.09	0.20	35.90	0.10	0.20	36.69	0.12	0.32	39.38	0.13	0.30
3	35.00	0.01	0.04	36.01	0.01	0.02	36.82	0.00	0.00	39.57	0.04	0.10
4	34.90	0.02	0.06	35.09	0.00	0.00	36.68	0.00	0.00	39.33	0.03	0.08
5	34.75	0.00	0.00	35.75	0.01	0.02	36.52	0.01	0.02	39.20	0.02	0.05
6	35.04	0.01	0.03	36.03	0.00	0.00	36.81	0.04	0.10	39.40	0.12	0.30
7	34.91	0.56	0.16	35.91	0.05	0.10	36.70	0.03	0.09	39.36	0.02	0.02
8	34.84	0.00	0.00	35.81	0.00	0.00	36.58	0.00	0.00	39.26	0.01	0.03
9	34.80	0.04	0.14	35.79	0.04	0.10	36.57	0.02	0.05	39.24	0.02	0.05
10	34.97	0.00	0.00	35.97	0.02	0.05	36.73	0.02	0.05	39.34	0.06	0.10
11	34.80	0.07	0.20	35.77	0.07	0.20	36.55	0.09	0.24	39.20	0.10	0.20
12	34.85	0.02	0.06	35.89	0.04	0.10	36.65	0.04	0.11	39.28	0.11	0.20
13	34.88	0.10	0.30	35.87	0.07	0.10	36.65	0.05	0.13	39.33	0.02	0.05
TOTAL	34.89	0.09	0.25	35.89	0.10	0.27	36.67	0.10	0.28	39.33	0.11	0.27

Tabla 2.
Datos de precisión para el porciento de área del pico principal. (2 d.s = 0.94)

DIA	% DE AREA	d.s	C.V(%)
1	87.50	0.28	0.30
2	87.80	0.28	0.30
3	87.15	0.07	0.08
4	87.45	0.07	0.08
5	87.35	0.21	0.02
6	87.00	0.14	0.10
7	87.25	0.07	0.08
8	87.35	0.07	0.08
9	87.05	0.07	0.08
10	86.95	0.21	0.30
11	86.95	0.21	0.20
12	87.00	0.28	0.30
13	86.95	0.07	0.08
Valores medio de la población (n = 39)	87.28	0.48	0.50

n = tamaño de la muestra.

Para los estudios de precisión fueron seleccionados dos parámetros: 1- El tiempo de retención (caracteriza cada pico y es usado en su identificación), y 2- El porciento de área del pico principal.

1-Tiempo de retención

La tabla 1 muestra la repetibilidad y la reproducibilidad para el tiempo de retención de cada pico. El CV para el tiempo de retención fue menor que 0.33% dentro de un mismo día y menor que 0.30% entre días para cada pico. Cuando se realizó un análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas entre analistas.

2- Por ciento del área del pico principal

El CV para el por ciento del área del pico principal dentro de un mismo día fue menor de 0.4% y menor de 0.5% entre días (tabla 2). Ha sido reportado que una variación hasta el 2% es generalmente aceptada para la mayoría de los ensayos analíticos (DeSain, 1992; Wiggin, 1989). No se encontraron diferencias significativas entre analistas (tablas 3 y 4) cuando se realizó el análisis de varianza. El cálculo del área de los picos se realizó empleando la opción manual del

Tabla 3
Datos de los porcientos de áreas de los diferentes analistas.

	ANALISTAS					
DIA	1		2		3	
1	88.0	88.1	88.5	87.2	87.6	86.7
2	87.0	87.1	87.4	87.0	87.0	87.3
3	87.2	87.2	87.0	87.7	87.1	87.3
4	87.1	86.8	86.3	86.8	87.1	87.0
5	87.0	86.8	87.3	87.3	86.8	87.1

Tabla 4
Análisis de varianza para el porciento de área del pico principal.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F CALCULADA	F TABULADA
Analista	2	0.269	0.137	0.577	3.39
Error	27	6.290	0.233		
TOTAL	29	6.559			

programa BioCrom. Para avaluar el error de la detección manual dos cromatogramas fueron procesados diez veces, el CV obtenido fue menor de 0.2%.

Linealidad

La proporción entre el por ciento del área y la cantidad de proteína inyectada en la columna se estudió usando el método de los mínimos cuadrados. Se encontró una relación lineal desde 20 hasta 120 μg de proteína (figura 4). La pendiente de la curva fue 1.45 y el coeficiente de correlación 0.996.

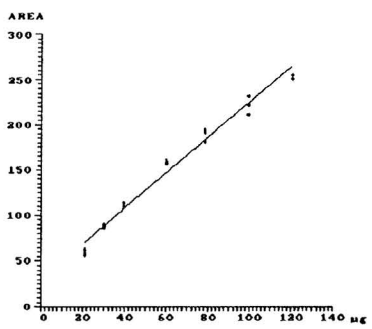

Fig. 4 Curva de calibración (área total vs microgramos aplicados)

CONCLUSIONES

El método mostró buena selectividad al poder separar el IFN intacto del IFN degradado y el IFN modificado (interferón acetilado e interferón incorrectamente foldeado). Se obtuvo una buena precision para el tiempo de retención (CV%) y el por ciento del área del pico principal (CV%). El método es lineal en el rango de 20 a 120 μg of proteína con una pendiente igual a 1.45 y un coeficiente de correlación de 0.996.

REFERENCIAS

BUICK, A.R.; M.V. DOIS; S. C. JEAL; G.S. LAND y R.D. McDOWALL (1990). Method validation in Analytical laboratory J. Pharm. & Biomed. Analysis, 8 (8-12): 629-637.

DESAIN, C. (1992). Master Method Validation Protocol. Biopharm, June: 30-34.

GARNICK, R.L.; M.J. ROSS y R.A. BAFFI (1991). Characterization of Proteins from Recombinant DNA Manufacture. In: Drug Biotechnology Regulation Scientific Basis and Practices. Marcel Dekker, Inc., New York 263-313.

INMAN, E.L.; J.K. FRISCHMANN; P.J. JIMENEZ; G.D. WINKEL; M.L. PERSINGER y B.S. RUTHERFOR (1987). General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples, J. Chrom. Sci. **25**:252-256.

PADRON, G.; V. BESADA; A. AGRAZ; Y. QUIÑONES y L. HERRERA (1989) Mass Spectrometric Analysis of Recombinant Human α-2 Interferon, Analytical Chimica Acta, **223**:361-370.

RAMPAZZO, P. (1990) Standardisation and Validation of Analytical Method in the Pharmaceutical Industry. Il Farmaco, **45(6)**:807-817.

WIGGIN, D.E. (1989). How to set Realistic System Suitability Criteria? LC.GC, **7(10)**:851-854.