

MONTAJE Y VALIDACIÓN DE UN ELISA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE *Escherichia coli* EN LA ESTREPTOQUINASA RECOMBINANTE

Niubel Díaz,¹ Marisol Cruz,¹ Ileana Rosales,¹ Asterio Cruz,¹ Dermín Pérez,²
Lourdes Costa,¹ Eliana Pérez¹ y Luis Herrera²

¹Subdirección de Calidad. ²Subdirección de Producción. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162 Ciudad de La Habana, C.P. 10600, Cuba.

Introducción

La presencia de impurezas proteicas de la cepa hospedera en las proteínas farmacéuticas recombinantes pueden afectar la calidad bioquímica del producto o causar efectos adversos en los pacientes (1, 2), por lo que es necesario evaluar su contenido en el producto final. Los métodos para el análisis de la pureza, como la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y los cromatográficos, no se pueden emplear cuando se necesita detectar impurezas que comigran o coeluyen con el producto final y carecen de sensibilidad para detectar trazas. En este trabajo se describen los resultados obtenidos en el desarrollo y la validación de un ELISA multiantigénico, capaz de cuantificar de forma precisa y específica estos contaminantes.

Materiales y Métodos

Obtención y caracterización de la preparación de proteínas de *Escherichia coli*

Se obtuvo a partir de una corrida en blanco del proceso de producción. Se partió de la cepa W3110 transformada con el plásmido, sin el gen que codifica para la estreptoquinasa recombinante, hasta la etapa de intercambio iónico negativo. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (3) y se analizó su perfil por una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 % con SDS (4). Para detectar su presencia se realizó un Western-blotting según el método descrito por Towbin *et al* (5), incubando la preparación de proteínas de *E. coli* (pPEc) con un anticuerpo monoclonal contra la proteína recombinante (SK₁, CIGB).

Obtención de los anticuerpos policlonales contra la pPEc (anti-pPEc)

Se empleó el método de inmunización por cascada (6). Se evaluó el reconocimiento inmunológico de los antisueros mediante Western-blotting (5) y se evaluó el título de los anticuerpos por un ELISA indirecto semicuantitativo (6).

Los anti-pPEc se purificaron empleando un gel de siferosa CL-4B activado con Br-Cn (Pharmacia)

acoplado con la pPEc (7) y se conjugaron a peroxidasa de rábano picante (HRP) grado 1 (Sigma), por el método del periodato de sodio (8).

Procedimiento del ELISA multiantigénico

De forma general las placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) fueron recubiertas con los anti-pPEc diluidos en tampón bicarbonato de sodio / carbonato de sodio 0,1 M (Merck) pH 9,6 y se bloquearon durante 1 h a 37 °C con una solución de PBS-Tween al 0,05 %. Las muestras se prepararon en la misma solución de bloqueo y la pPEc se empleó como curva patrón del ensayo. Luego de los corrientes lavados, se dispuso el conjugado previamente diluido en PBS-Tween al 0,1 % y se incubó 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Como cromógeno se utilizó ortofenilendiamina (Merck) al 0,04 % en tampón citrato, pH 5,5, 0,04 % de peróxido de hidrógeno 30 % (Fluka). La reacción transcurrió en la oscuridad durante 20 minutos y se detuvo con 50 µL/pozo de H₂SO₄ 2M (Merck). La lectura de la placa se realizó a 492 nm. La solución de lavado empleada fue PBS-Tween al 0,05 %. El número de lavados fue de 3, 6 y 8 entre pasos sucesivos.

Validación del ELISA

Se analizaron los siguientes parámetros:

- **Límite de detección.** Se comparó la media de la absorbancia a 0 ng/mL y a 6,25 ng/mL de pPEc, mediante un test de comparación de medias, para 20 ensayos (9).
- **Límite de cuantificación.** Se analizó mediante una prueba de hipótesis para demostrar que la media de la concentración propuesta era igual al valor esperado.
- **Precisión intraensayo.** Se evaluó mediante el coeficiente de variación de los valores observados a esta concentración, para 20 ensayos (10).
- **Precisión interensayo.** Se tomaron tres muestras de estreptoquinasa recombinante e hicieron tres diluciones, cada una de ellas con cinco repeticiones, en los tres rangos de la curva de calibra-

1. Anicetti VR. Improvement and experimental validation DNA products. ACS Symposium series Analytical Biotechnology, Washington 1990;7:127-140.

2. Eaton CL. Host cell contaminant protein assay development for recombinant biopharmaceutical. J Chromatography 1995;705:105-114.

3. Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Andall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. Analytical Biochemistry 1951;193:265-275.

4. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly by bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.

5. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Nat Acad Sc USA 1979;76:4350-4354.

6. Anicetti VR, Simonetti MA, Blackwood LL, Jones AJ, Chen AB. Immunization procedures for *E. coli* proteins. Applied Biochemistry and Biotechnology 1989; 22:151-168.

7. Ternynck TH, Avrameas S. Immunoenzymatic techniques In. Kazatchkine, M., Turner, M.W. Techniques in immunology. Amsterdam: Elsevier, 1990;1:3-18.

8. Nakane P. Preparation and standardisation of enzyme labelled conjugates. In: Immunassays in the clinical laboratory. Eds.: Nakamura RM, Dito WR, Tucker ES, Liss AR. New York, 1974:81-87.

9. Rodbard D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration (sensitivity) for radioligand assay. Analytical Biochemistry 1978;90:1-12.

ción (alto, medio y bajo). Se analizó la repetibilidad, la reproducibilidad así como los resultados interanalistas.

- **Exactitud.** Se determinó mediante un experimento de recobrado, adicionando cantidades conocidas de la pPEc, en los tres rangos de la curva patrón a tres muestras de estreptoquinasa recombinante. El porcentaje de impurezas esperado incluyó desde 0,25 % a 1,2 %. Los resultados obtenidos se procesaron mediante un análisis de regresión (10).
- **Análisis de la linealidad de la dilución.** Se hicieron diluciones a tres muestras y se determinó su concentración (11, 12).
- **Especificidad.** Se prepararon curvas patrones de la pPEc en diferentes tampones B₁: Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,2M; B₂: Tris- HCl 0,02M; B₃: Sulfato de amonio 0,17 M, Tris HCl: 0,02 M. Los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), tomando como referencia la curva preparada en el tampón del ensayo.

Resultados y Discusión

Obtención y caracterización de la pPEc

La electroforesis de la pPEc, mostró la presencia de bandas en un rango de pesos moleculares, desde 14 kDa hasta 67 kDa, características de la mayoría de las proteínas de la cepa hospedera, que podrían encontrarse como impurezas en el producto final. La selección de estas impurezas es importante para garantizar la sensibilidad y especificidad de los ELISA multiantigénicos al ser empleadas como inmunógenos, en la inmunopurificación de los anticuerpos del ensayo y como curvas patrones contra las cuales se cuantifica la cantidad en los biofármacos (1, 2). La ausencia de estreptoquinasa recombinante en la pPEc es una alternativa válida (2, 11-13) por evitar que durante la inmunización se produzcan anticuerpos dirigidos contra el producto (1).

Obtención de los anticuerpos contra la pPEc

Se observó un incremento progresivo del reconocimiento inmunológico y del título de los antisueros anti-*E. coli* a la pPEc durante el esquema de inmunización en cascada. Anicetti (11) y Chen (12) emplearon métodos convencionales de inmunización para obtener los antisueros antiproteínas de *E. coli*, sin embargo el método de la cascada permite solucionar el fenómeno de competición antigénica, que se presenta frecuentemente durante la inmunización con mezclas complejas (6).

Validación del ELISA

Los resultados de la validación se presentan en la Tabla 1.

Los resultados obtenidos con el sistema propuesto concuerda con lo descrito en la literatura para los ELISA multiantigénicos. (11-13) que tienen una sensibilidad de 1 parte por millón y se pueden emplear siendo empleados para cuantificar trazas de impurezas en presencia de grandes cantidades de proteínas recombinantes. Con el desarrollo de métodos modernos de purificación y el aumento en los porcentos de pureza de los biofármacos recombinantes se requieren de métodos con un menor límite de detección. Nuestros resultados con-

Tabla 1. Resultados de los parámetros de la validación.

Parámetros de validación	Resultado		
Límite de detección	6,25 ng/mL, p = 0,00114		
Límite de cuantificación	12,5 ng/mL, p = 0,2		
Precisión intraensayo (coeficiente de variación)	Rango alto: 3-4 % Rango medio: 3-4 % Rango bajo: 8-11 %		
		Analista A	Analista B
Precisión interensayo (coeficiente de variación)	Rango alto Rango medio Rango bajo	11-14 % 10-14 % 14-17 %	12-13 % 9-16 % 17-20 %
Especificidad	No diferencias en la concentración de las proteínas de <i>E. coli</i> .		
Linealidad	Se mostró un valor constante de concentración para las tres muestras.		
Exactitud	Porcentos de recuperación: entre 89 y 107 %.		

cuerdan con los criterios aceptados para los inmunoensayos que aceptan con coeficientes de variación intraensayo menor que 10 % e interensayos menores que 20 % (11-13).

El ensayo fue específico para la cuantificación de las impurezas, lo que coincide con lo reportado, que los inmunoensayos, basados en la reacción antígeno-anticuerpo deben ser altamente específicos capaces de detectar el analito de interés y no otros componentes dentro de la preparación (14). Se demostró la linealidad de la dilución demostrándose la condición requerida de un exceso de anticuerpos dirigidos contra la mayoría de los componentes de la pPEc (1, 11, 12). El porcentaje de recobrado por ELISA obtenido coincide con los valores reportados entre 80 % y 120 %. La pendiente y el intercepto no fueron significativamente diferentes de 1 y 0, respectivamente (6, 11).

10. Bernard Ostle. Estadística Aplicada. Editorial Científico-Técnica 1979.

11. Anicetti VR, Fehskens EF, Reed BR, Chen AB, Moore P, Geier MD, Jones AS. Immunoassay for the detection of *E. coli* proteins in recombinant DNA derived human growth hormone. *J Immunol Met* 1986;91:213-224.

12. Chen AB, Championsmith AA, Blanchard J, Gorrell J, Niepelt BA, Federica MM et al. Quantitation of *E. coli* protein impurities in recombinant human interferon γ . *App Biochemistry and Biotechnology* 1992;36:137-152.

13. Garnick RL, Ross MJ, Baffi RA. In: *Drugs Biotechnology Regulation Scientific Basis and Practices*. Eds: Chiu YH, Guerguian JL. Marcel Dekker 23New York 1991:263-313.

14. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugala M. A strategy for validation of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* 1996;14:375-388.

Conclusiones

Se obtuvieron los reactivos biológicos, no disponibles comercialmente. Los antisueros fueron capaces de reconocer todos los componentes dentro de las pPEc. Este ensayo es exacto, sensible específico, preciso (coeficientes de variación menores que el

20 %) y capaz de cuantificar los niveles de impurezas proteicas durante el proceso de purificación de la estreptoquinasa recombinante y no los diferentes tampones donde se encuentra la estreptoquinasa recombinante.

WOCMAP II II CONGRESO MUNDIAL DE PLANTAS AROMATICAS Y MEDICINALES PARA EL BIENESTAR DE LA HUMANIDAD

10-15 de noviembre de 1997, Centro de Convenciones Emilio Civit, Mendoza, Argentina

Organizado por:

- International Council for Medicinal and Aromatic Plants (ICMAP)
- International Society for Horticultural Science (ISHS)
- Sociedad Argentina para la Investigación de Productos Aromáticos (SAIPA)

Buenos Aires, diciembre de 1996.

Estimado colega:

Me dirijo a usted en nombre del Comité Organizador, con el objeto de invitarlo a participar en el 2^{do} Congreso Mundial de Plantas Aromáticas y Medicinales para el Bienestar de la Humanidad (WOCMAP II), que se llevará a cabo en Mendoza, Argentina entre los días 10 y 15 de noviembre de 1997.

Los principales objetivos del Congreso son:

- *Promover la cooperación internacional en el amplio campo de la investigación de las plantas aromáticas y medicinales y su tecnología.*
- *Ofrecer una vía de intercambio de experiencias e información entre expertos de países desarrollados y en vías de desarrollo.*
- *Hacer un relevamiento de la situación actual del sector de plantas aromáticas y medicinales en la región, teniendo en cuenta que América Latina es una de las áreas claves en el mundo con respecto a la biodiversidad, la disponibilidad de materias primas y la cultura del uso de sus recursos naturales en la medicina tradicional.*
- *Contribuir a un mejor conocimiento, a la revalorización, al uso correcto y a la protección de los recursos genéticos vegetales utilizados, por sus propiedades medicinales o aromáticas.*

Cumplir con estos objetivos no será una tarea sencilla en un mundo tan cambiante. Es por eso que estamos organizando nuestro Congreso bajo el siguiente slogan: Un desafío para el siglo XXI. Programamos para ello conferencias plenarias, mesas redondas, talleres, paneles y otras actividades. En forma paralela se llevará a cabo una exposición, EXPOAROMED, donde productores, fabricantes, editoriales y todas las organizaciones del sector de plantas aromáticas y medicinales podrán presentar y ofrecer sus productos y servicios.

Le hacemos llegar esta invitación para que nos ayude a cumplir con los objetivos fijados hace cinco años en Maastricht, Holanda, con las recomendaciones y conclusiones de WOCMAP I, para el bienestar de la humanidad.

¡Esperamos verlo en Mendoza, la tierra del sol y del buen vino!

*Dr. Arnaldo L. Bandoni
Presidente Ejecutivo, WOCMAP II.*